

## THE EFFECTIVENESS OF MICRO FERTILIZERS IN THE CULTIVATION OF WINTER RAPESEED ON SOD-PODZOLIC HIGHLY CULTIVATED LIGHT LOAMY SOIL

M. V. Rak, E. N. Pukalova, N. S. Guzova, L. N. Guk

### Summary

The article presents the results of research on the effectiveness of the use of liquid micro-fertilizers MicroStim in the cultivation of winter rapeseed on sod-podzolic highly cultivated light loamy soil. It has been established that foliar top dressing of plants with various brands of micronutrients MicroStim increases the yield and oil content of winter rape seeds and is an economically justified technique.

*Поступила 25.03.2022*

УДК 632.15: 579.64

[https://doi.org/10.47612/0130-8475-2022-1\(68\)-200-212](https://doi.org/10.47612/0130-8475-2022-1(68)-200-212)

## СКРИНИНГ СПОСОБНОСТИ КАЛИЙМОБИЛИЗУЮЩИХ РИЗОБАКТЕРИЙ МЕТАБОЛИЗИРОВАТЬ ГЕРБИЦИД ГЛИФОСАТ

Н. А. Михайловская, Т. Б. Барашенко, Т. В. Погирницкая, С. В. Дюсова

*Институт почвоведения и агрохимии,  
г. Минск, Беларусь*

### ВВЕДЕНИЕ

Фосфорорганические соединения, содержащие углерод-фосфорную С–Р связь, относятся к опасным загрязнителям. Органофосфаты входят в состав гербицидов, инсектицидов, антибиотиков. По объемам применения лидируют гербициды. Наиболее широко применяется глифосат (N-фосфонометилглицин) – не-селективный гербицид системного действия, который служит основой множества препаратов под разными коммерческими названиями.

Эффективность и невысокая стоимость глифосата, а также создание устойчивых к гербициду трансгенных сортов важнейших сельскохозяйственных культур способствовали его глобальному применению [1, 2, 3]. Глифосат активно используется в сельскохозяйственных посевах, в лесном хозяйстве, на городских территориях, в садоводстве, для очистки водоемов, что привело к практически повсеместному присутствию гербицида и его остатков в окружающей среде. По литературным данным остаточные количества ГФ и его основного метаболита практически повсеместно обнаруживаются в почве [2–5, 9–11], в воде [2, 5–8], в воздухе [2, 3], продукции растениеводства [3, 12–14].

Основным аргументом в пользу безопасности глифосата (ГФ) считалось быстрое снижение его концентрации в почве после применения. Однако известно,

что природные микробные сообщества почвы и воды разлагают глифосат преимущественно до аминометилфосфоновой кислоты (АМФК) – основного метаболита, который по-прежнему содержит ковалентную связь С–Р и представляет гораздо большую опасность, чем глифосат, так как сильнее адсорбируется компонентами почвы и дольше сохраняется [8, 9, 11]. К настоящему времени накоплено достаточно научной информации, подтверждающей, что АМФК разлагается значительно медленнее, чем глифосат [3, 8, 11]. В экспериментах с радиоактивной меткой Al-Ragab and Schiavon установили, что 85–99% исходной радиоактивности глифосата трансформировались в АМФА при инкубации в супесчаной и суглинистой почвах в течение 80 дней [15]. Основную проблему представляет первичный метаболит глифосата – аминометилфосфоновая кислота.

Как правило, глифосат применяется ежегодно на одном и том же поле. При изучении влияния пятикратного применения глифосата на скорость его минерализации в суглинистой почве Lancaster et al. [16] показали, что константа скорости минерализации первого порядка для однократного применения больше, чем для пяти последовательных применений глифосата. Это указывает на замедление минерализации гербицида при его повторяющихся применениях.

Значительно возросло количество научных публикаций о негативном экологическом действии глифосата и необходимости его детоксикации. Современные научные исследования свидетельствуют о токсическом действии ГФ на живые организмы. Глифосат и его коммерческие формы оказывают цитотоксическое действие на клетки человека и вызывают их апоптоз [17–19]. На основании накопленной информации об экологической опасности и токсическом действии ГФ на живые организмы Всемирная организация здравоохранения в 2015 году признала глифосат карциногенным для человека [3].

Для снижения негативных последствий многократного применения глифосата, восстановления биологической активности почвы и получения экологической продукции необходимы периодические ремедиации загрязненных природных объектов. Глифосат может быть обезврежен с применением микробных (микробная детоксикация) или абиотических методов (адсорбция, термолиз, фотодеградация). Наиболее адекватно применение микробных деструкторов гербицида. Микроорганизмы, главным образом бактерии, способны расщеплять С–Р связь в глифосате за счет действия своих ферментных систем. Анализ научной литературы свидетельствует, что наиболее перспективны микробные методы детоксикации, которые могут обеспечить разложение глифосата до безопасных соединений [20–24]. Биологические методы ремедиации экологически наиболее приемлемы, эффективны и не требуют высоких экономических затрат.

Поиск и разработка способов микробной детоксикации глифосата является приоритетной задачей. Основное внимание целесообразно уделить бактериям, так как наибольшее число деструкторов глифосата обнаружено среди прокариотов. Способность к биодegradации органофосфатов в почве и воде проявляют бактерии родов *Pseudomonas* [3, 25, 26], *Rhizobium* sp. [3, 27], *Arthrobacter* [3, 28], *Bacillus* sp. [3, 29] и некоторых других. Эффективность процесса катаболизма (разложения) глифосата существенно зависит от родовой и видовой принадлежности бактерий.

В задачи наших исследований входили поиски деструкторов глифосата среди RGP-ризобактерий, применяемых в качестве инокулянтов. Калиймобилизующие

ризобактерии *Bacillus* spp. представляют особый интерес как объекты исследований. Калиймобилизующие бактерии (слизеообразующие бациллы), сохраняемые в нашей коллекции, эффективно воздействуют на метаболизм растений. Применение инокулянтов на их основе активизирует потребление разных по степени подвижности форм почвенного калия [30, 31], индуцирует гормональный эффект [31, 32], улучшает качество зерна по содержанию и аминокислотному составу белка [31, 33]. Установлено, что слизеообразующие бациллы нашей коллекции проявляют высокую антагонистическую активность в отношении корневых фитопатогенов [34]. Вопросы взаимодействия PGP-ризобактерий с глифосатом и другими гербицидами практически не исследованы.

**Цель исследований** – скрининг способности зональных калиймобилизующих бактерий *Bacillus* spp. метаболизировать гербицид глифосат.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами скрининга служили зональные калиймобилизующие ризобактерии *Bacillus* spp. из коллекционного фонда лаборатории микробиологии и биохимии почв. Изучение способности ризобактерий метаболизировать глифосат проведено в серии *in vitro* экспериментов по их культивированию на минеральных твердых и в жидких питательных средах.

Состав среды DN (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,4;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{NaCl}$  – 0,1;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,02;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,01;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,002; яблочная кислота – 3,6; дрожжевой экстракт – 0,05; спиртовой раствор бромтимолового синего (0,5%) – 5,0 мл; агар – 20,0; 1000 мл воды;  $\text{NaOH}$  – для доведения pH – до оптимального уровня 6,8–7,0.

Состав среды Nfb (г/л): яблочная кислота – 5,0;  $\text{KOH}$  – 4,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5;  $\text{NaCl}$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{CaCl}_2$  – 0,02;  $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,01 г;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,002 г; бромтимоловый синий (0,5% спиртовой раствор) – 2 мл; агар – 20,0; 1000мл воды; оптимальный уровень pH – 6,8. При использовании глифосата в качестве источника углерода состав среды Nfb следующий:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5;  $\text{NaCl}$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{CaCl}_2$  – 0,02;  $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,01г;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,002г; агар – 20,0. При использовании глифосата в качестве источника фосфора состав среды Nfb следующий: яблочная кислота – 5,0;  $\text{KOH}$  – 4,0;  $\text{NaCl}$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{CaCl}_2$  – 0,02;  $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,01г;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,002г; агар – 20,0.

Состав среды Муромцева (г/л): глюкоза – 10,0; аспарагин – 1,0;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 0,2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,4; дрожжевой автолизат – 0,5; агар – 17,0, вода дистиллированная – до 1 л с добавлением  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  непосредственно перед использованием. При исследовании глифосата в качестве источника фосфора трикальцийфосфат в среду не добавляется.

Состав среды Дворкина-Фостера (г/л): глюкоза – 1,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,375,  $\text{MgSO}_4$  – 0,075,  $\text{CaCO}_3$  – 0,03,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,000001,  $\text{MnSO}_4$  – 0,000001,  $\text{NaHPO}_4$  – 6,0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,0, дрожжевой экстракт – 0,0053 (121 °C, 1,5 атм., 15 мин.). При использовании глифосата в качестве источника углерода состав среды Дворкина-Фостера следующий (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,375,  $\text{MgSO}_4$  – 0,075,  $\text{CaCO}_3$  – 0,03,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,000001,  $\text{MnSO}_4$  – 0,000001;  $\text{NaHPO}_4$  – 6,0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,0. При использовании глифосата в качестве источника фосфора состав среды (г/л):

глюкоза – 1,0 г/л,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,375,  $\text{MgSO}_4$  – 0,075,  $\text{CaCO}_3$  – 0,03,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,000001,  $\text{MnSO}_4$  – 0,000001; трис-буфер – 6,05.

Для хранения калиймобилизующих бактерий *Bacillus sp.* (на косяках при температуре + 4,0 °С) использовали картофельную среду. Картофельный агар: 200 г очищенного картофеля варят в 1 л дистиллированной воды 30 минут. Отвар охлаждают и фильтруют через ватный фильтр, (оптимальный уровень pH фильтра – 6,8), вносят агар 20,0 г/л и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 20 мин. (давление 1 атм.).

Для проведения исследований использован гербицид Торнадо-500: в. р., 500 г/л глифосата кислоты (изопропиламинная соль). Изготовитель: АО Фирма «Август», Россия, ТУ 20.20.12-071-18015953-2017 г.

Для стерилизации питательных сред и посуды используются стерилизатор паровой ГК-100-3, стерилизатор паровой ГК-10-1, облучатели ультрафиолетовые УГД-2 и УГД-3.

Для культивирования бактерий в жидких культурах используются: Экрос (№ 6410), шейкер орбитальный KS-501 digital IKA WERKE (GmbH & Co.KG), перемешивающее устройство ЛАБ-ПУ-01 (2007 г.) и термостат ТПС – 1.

Для учета микроорганизмов применяется прибор для счета бактерий ПСБ. Определение оптической плотности бактериальных суспензий проводили на фотоэлектрическом колориметре КФК-2-УХЛ-4,2.

**Тестирование устойчивости калиймобилизующих бактерий к глифосату на твердых питательных средах.** Для первичного тестирования толерантности к глифосату использованы двухсуточные культуры коллекционных калиймобилизующих ризобактерий, выращенные на картофельном агаре (28 °С). При соблюдении правил асептики в конические колбы (объем 300 мл) вносили стерильный (110°, 20 мин.) раствор гербицида Торнадо-500 различных концентраций, затем приливали по 100 мл расплавленной питательной среды (КА, DN, Муромцева), тщательно перемешивали и разливали в чашки Петри (20 мл в каждую). Концентрации глифосата в питательных средах составили (мг/мл): 0 ( $C_0$ ), 0,25 ( $C_1$ ), 0,50 ( $C_2$ ), 0,75 ( $C_3$ ), 1,0 ( $C_4$ ), 2,0 ( $C_5$ ) и 3,0 ( $C_6$ ). После застывания питательной среды чашки Петри подсушивали. Культуры ризобактерий высевали методом штриха и инкубировали в термостате (28 °С). Периодичность визуального мониторинга активности роста ризобактерий – каждые 2–3 суток. Повторность в опытах пятикратная.

**Скрининг способности ризобактерий *Bacillus sp.* развиваться на питательных средах с разными источниками углерода.** Первый этап скрининга был выполнен на твердой питательной среде DN, в состав которой входили разные источники углерода (глифосат, глифосат + яблочная кислота, яблочная кислота). Исследования проведены при содержании глифосата в среде 3,0 мг/мл.

Следующий этап скрининга выполнен в жидкой минеральной среде (MSM) Дворкина-Фостера [36]. В ходе экспериментов в конические колбы объемом 1000 мл, содержащие 450 мл жидкой питательной среды Дворкина-Фостера (без источника углерода), вносили 5 мл инокулюма исследуемой двухсуточной бактериальной культуры. Начальные титры бактериальных суспензий определяли по оптической плотности бактериальной суспензии на фотоэлектрическом колориметре КФК-2-УХЛ-4,2 ( $\lambda = 590$  нм, кювета 10 мм, контроль – питательная среда) в соответствии с калибровочным графиком, построенными для калиймобилизующих бактерий *Bacillus sp.*

Стерильный 50 %-ный раствор гербицида Торнадо (110 °С, 20 мин.) и стерильный 10 %-ный раствор глюкозы (110 °С, 1,0 атм) готовили отдельно для использования в качестве источников углерода. Бактериальные культуры тестировали по следующей схеме:

- 1) среда Дворкина-Фостера с глюкозой (ГЛ)
- 2) среда с глифосатом (ГФ)
- 3) среда с глифосатом и глюкозой (ГЛ + ГФ).

При соблюдении правил асептики в 9 конических колб вносили по 50 мл инокулированной питательной среды (без источника углерода). Затем в три опытные колбы (повторность в опыте трехкратная) вносили стерильную глюкозу (стандартная среда – ГЛ) из расчета конечной концентрации 1,0 г/л, в следующие три опытные колбы вносили стерильный раствор глифосата (среда ГФ) до конечной концентрации 3,0 мг/мл, в остальные опытные колбы вносили последовательно глюкозу и глифосат (среда ГЛ + ГФ) и тщательно перемешивали. Колбы помещали в термостат при температуре 28 °С. Проводили периодическое перемешивание с помощью устройства ЛАБ-ПУ (90 об/мин.).

Для мониторинга роста исследуемых ризобактерий из каждой опытной колбы отбирали аликвоты по 5 мл с интервалом 8 часов при первом измерении и через каждые 24 часа – при последующих определениях. Критерием активности роста ризобактерий служили показатели оптической плотности бактериальной суспензии ( $\lambda = 590$  нм, кювета 10 мм, контроль – питательная среда). Плотность популяции определяли по калибровочному графику. Получены экспериментальные кривые роста для протестированных бактерий, характеризующие зависимость плотности популяции от источника углерода в питательной среде и длительности эксперимента.

**Скрининг способности ризобактерий *Bacillus* sp. развиваться на питательных средах с разными источниками фосфора.** Для оценки активности роста двухсуточные культуры зональных штаммов и изолятов калиймобилизующих бактерий *Bacillus* sp. культивировали на твердых питательных средах с разными источниками фосфора. В первом блоке *in vitro* экспериментов оценка роста проведена на питательной среде Муромцева, содержащей следующие источники фосфора:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  + глифосат, а также глифосат как единственный источник фосфора. По аналогичной схеме проведен скрининг на твердой питательной среде Nfb, где источниками фосфора служили  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , глифосат +  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  и собственно глифосат.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Первичное тестирование калиймобилизующих ризобактерий на твердых питательных средах с глифосатом.** Начальные этапы тестирования включали оценку показателей роста ризобактерий на твердых питательных средах (DN и картофельный агар), с возрастающими концентрациями глифосата. По способности развиваться в присутствии глифосата проведена первичная дифференциация зональных штаммов калиймобилизующих ризобактерий.

Микробиологические *in vitro* исследования с возрастающими концентрациями глифосата показали, что калиймобилизующие ризобактерии существенно различались по активности роста на картофельном агаре и плотной питательной среде

DN. По результатам первичного тестирования отмечены следующие перспективные объекты: *Bacillus* sp. K-62, *Bacillus* sp. K-65, *B. circulans* K-81 и *Bacillus* sp. Kт (табл. 1). Аналогичная серия *in vitro* экспериментов была выполнена на плотной питательной среде DN. Лучший рост также давали *Bacillus* sp. K-62, *Bacillus* sp. K-65, *B. circulans* K-81 и *Bacillus* sp. Kт.

Таблица 1

**Показатели активности роста калиймобилизующих бактерий при возрастающей концентрации глифосата в картофельном агаре (*in vitro*)**

Штамм	Концентрация глифосата в питательной среде						
	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
<i>Bacillus</i> sp. K-2	+++	+++	++	+	+	+	-
<i>Bacillus</i> sp. K-25	+++	+++	++	++	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp. K-30	+++	+++	++	+	+	-	-
<i>Bacillus</i> sp. K-31	+++	+++	+++	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp. K-51	+++	+++	++	++	+	+	-
<i>Bacillus</i> sp. K-54	+++	+++	+++	+	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. K-62	+++	+++	+++	+++	++	++	++
<i>Bacillus</i> sp. K-65	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
<i>Bacillus</i> sp. K-70	+++	+++	+++	+	+	+	-
<i>Bacillus</i> sp. K-72	+++	+++	+++	++	++	++	+
<i>Bacillus</i> sp. K-86	+++	+++	+++	++	+	-	-
<i>B. circulans</i> K-81	+++	+++	+++	+++	++	++	++
<i>Bacillus</i> sp. Kт	+++	+++	+++	+++	+++	++	++

+++ хороший рост, ++ средний рост, + слабый рост, - отсутствие роста.

Результаты, полученные на двух питательных средах разного состава, показали перспективность дальнейшей работы с отобранными штаммами калиймобилизующих ризобактерий рода *Bacillus*. Определен круг перспективных объектов для продолжения исследований.

**Скрининг калиймобилизующих ризобактерий по способности метаболизировать глифосат в качестве источника углерода.** Процесс скрининга включал несколько этапов. На первом этапе проведена оценка роста слизееобразующих бацилл на двух твердых питательных средах – DN и Nfb. В качестве источников углерода в *in vitro* экспериментах изучали яблочную кислоту (как компонент обеих сред), яблочную кислоту в сочетании с глифосатом и глифосат как единственный источник углерода. Целью первого этапа исследований был отбор перспективных объектов для последующего скрининга в жидкой минеральной среде Дворкина-Фостера.

В процессе скрининга калиймобилизующих ризобактерий отмечено, что большинство зональных изолятов слабо развивались на питательных средах DN и Nfb, содержащих в качестве источника углерода яблочную кислоту в сочетании с глифосатом. Рост ризобактерий на обеих питательных средах DN и Nfb, содержащих глифосат в качестве единственного источником углерода, практически отсутство-

вал или был незначительным. По результатам скрининга можно заключить, что коллекционные калиймобилизующие бактерии практически не способны использовать гербицид глифосат как единственный источник углерода для собственного метаболизма. Относительно активный рост протестированных ризобактерий получен только на стандартных питательных средах DN и Nfb с яблочной кислотой в качестве источника углерода.

**Скрининг зональных калиймобилизующих ризобактерий в жидкой питательной среде Дворкина-Фостера.** На завершающем этапе проведен количественный скрининг способности ризобактерий метаболизировать глифосат как единственный источник углерода. Для этого бактерии культивировали в жидкой питательной среде Дворкина-Фостера [36]. Скрининг в жидких питательных средах позволяет количественно оценивать рост по плотности популяции микроорганизмов.

По результатам первичного этапа скрининга среди зональных калиймобилизующих бактерий были отобраны штаммы *Bacillus circulans* K-81, *Bacillus* spp. Kт, K-62 и *Bacillus* sp. K-65 для количественного тестирования в жидкой минеральной среде Дворкина-Фостера.

Проведено сравнение активности роста бактериальных культур в жидкой среде с разными источниками углерода: с глюкозой (ГЛ), с глифосатом (ГФ) и с двумя источниками углерода – глюкоза + глифосат (ГЛ + ГФ) на протяжении 9 суток эксперимента. Критерием активности роста бактерий служили показатели оптической плотности ( $OD_{590}$ ) бактериальных суспензий, которые регистрировали в *in vitro* экспериментах каждые 24 часа. Плотность популяции ризобактерий рассчитывали по калибровочному графику.

Экспериментальные кривые роста, полученные для ризобактерий *Bacillus* sp. Kт, *Bacillus circulans* K-81, *Bacillus* sp. K-62 и *Bacillus* sp. K-65, подтвердили, что ризобактерии активно развивались только в полноценной среде Дворкина-Фостера с глюкозой (ГЛ) в качестве источника углерода. При наличии в питательной среде глифосата в сочетании с глюкозой (ГЛ+ГФ) происходило значительное снижение плотности популяций испытуемых ризобактерий. В жидкой среде Дворкина-Фостера с глифосатом в качестве единственного источника углерода (ГФ) калиймобилизующие бациллы развивались очень слабо, что практического значения не имеет (рис.).

Таким образом, проведена качественная оценка роста зональных калиймобилизующих ризобактерий на твердых питательных средах (DN и Nfb) и количественная оценка роста в жидкой минеральной среде Дворкина-Фостера в присутствии разных источников углерода. Анализ экспериментальных кривых роста, характеризующих зависимость плотности популяции от источника углерода в питательной среде и длительности эксперимента, показал, что зональные ризобактерии рода *Bacillus* практически не способны метаболизировать глифосат как единственный источник углерода. Активность их роста в присутствии глифосата в качестве единственного источника углерода практического интереса не представляет.

В соответствии с литературными данными абсолютное большинство известных к настоящему времени бактериальных деструкторов глифосата метаболизируют его как источник фосфора [3, 21, 22, 28, 29]. Ризобактерии, способные метаболизировать гербицид глифосат как источник углерода или азота [3] встречаются значительно реже.

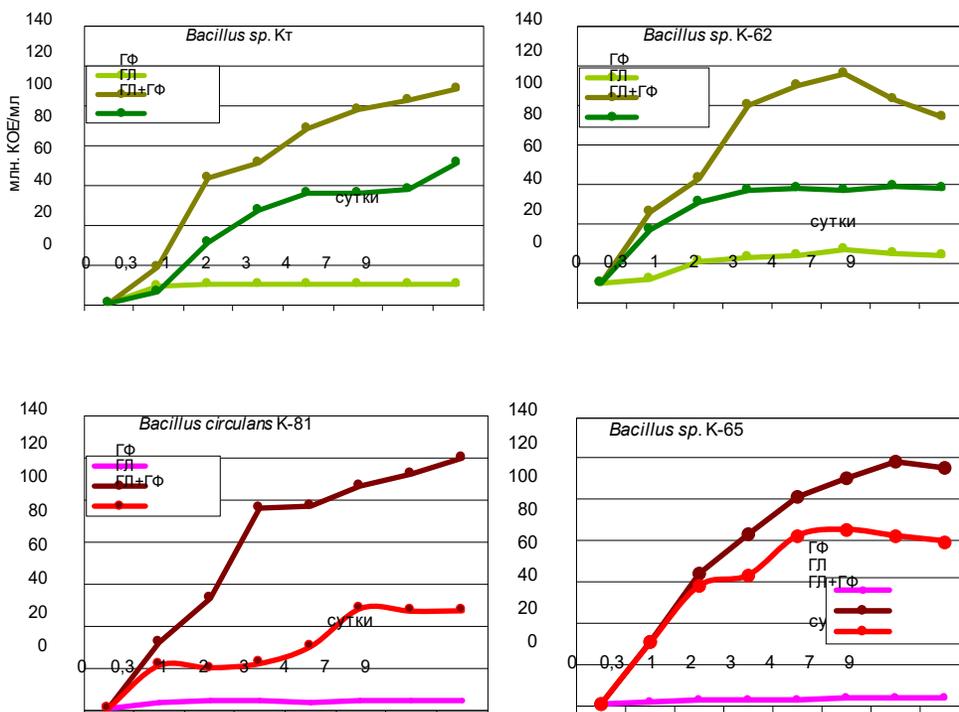


Рис. Влияние источника углерода (глюкоза – ГЛ, глифосат – ГФ, глюкоза + глифосат – ГЛ+ГФ) на плотность популяций калиймобилизующих ризобактерий в среде Дворкина-Фостера

**Скрининг способности зональных ризобактерий рода *Bacillus* метаболизировать глифосат в качестве единственного источника фосфора.** Ризосферные бактерии рода *Bacillus* представляют интерес как потенциальные биодеструкторы глифосата [3, 29]. Для оценки активности роста двухсуточные культуры штаммов калиймобилизующих бактерий культивировали на твердых питательных средах с разными источниками фосфора. В первом блоке *in vitro* экспериментов оценка роста проведена на питательной среде Муромцева, содержащей следующие источники фосфора для ризобактерий:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  + глифосат, а также глифосат как единственный источник фосфора. По аналогичной схеме был проведен второй блок *in vitro* экспериментов на твердой питательной среде Nfb, где источниками фосфора для ризобактерий служили  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , глифосат +  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  и собственно глифосат. По результатам скрининга установлено, что протестированные штаммы калиймобилизующих бацилл относительно хорошо развивались на твердой питательной среде Nfb с глифосатом в присутствии дополнительного источника фосфора в форме  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (табл. 2). При проведении скрининга на питательной среде Nfb с глифосатом как единственным источником фосфора относительно лучший рост отмечен у штаммов *Bacillus* sp. Kт и *Bacillus circulans* K-81 (табл. 2).

Таблица 2

**Активность роста калиймобилизирующих бактерий на питательной среде Nfb  
с разными источниками фосфора и концентрациями глифосата**

Наличие источника фосфора в среде	Штаммы бактерий	Концентрация глифосата в питательной среде						
		C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + ГФ	<i>Bacillus</i> sp. Кт	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
	<i>B. circulans</i> К-81	+++	+++	+++	+++	++	++	++
	<i>Bacillus</i> sp. К-62	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
	<i>Bacillus</i> sp. К-65	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
ГФ	<i>Bacillus</i> sp. Кт	+++	++	+	+	-	-	-
	<i>B. circulans</i> К-81	+++	++	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus</i> sp. К-62	+++	+	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus</i> sp. К-65	+++	+	-	-	-	-	-

+++ хороший рост, ++ средний рост, + слабый рост, - отсутствие роста.

При культивировании на плотной питательной среде Муромцева с глифосатом в сочетании с Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> получены хорошие показатели роста для протестированных калиймобилизирующих бактерий (табл. 3). В экспериментах по культивированию слизистых бацилл на твердой среде Муромцева, содержащей глифосат как единственный источник фосфора (без ортофосфата кальция), более активный рост отмечен для штамма *Bacillus* sp. Кт. Ризобактерии *Bacillus circulans* К-81, *Bacillus* spp. К-62 и К-65 развивались в этих условиях менее активно (табл. 3).

Таблица 3

**Активность роста калиймобилизирующих бактерий на среде Муромцева  
с разными источниками фосфора и концентрациями глифосата**

Наличие источника фосфора в среде	Штаммы бактерий	Концентрация глифосата в питательной среде						
		C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> + ГФ	<i>Bacillus</i> sp. Кт	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
	<i>B. circulans</i> К-81	+++	+++	+++	+++	++	++	++
	<i>Bacillus</i> sp. К-62	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
	<i>Bacillus</i> sp. К-65	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
ГФ	<i>Bacillus</i> sp. Кт	+++	+++	+	+	+	-	-
	<i>B. circulans</i> К-81	+++	++	+	-	-	-	-
	<i>Bacillus</i> sp. К-62	+++	++	+	-	-	-	-
	<i>Bacillus</i> sp. К-65	+++	++	+	-	-	-	-

+++ хороший рост, ++ средний рост, + слабый рост, - отсутствие роста.

Таким образом, по результатам скрининга калиймобилизирующих бактерий на твердых и в жидких питательных средах для дальнейших исследований отобраны перспективные целевые объекты.

По литературным данным общей физиологической особенностью процессов биодegradации фосфорорганических соединений является наличие латентного периода, то есть требуется определенный временной промежуток для адаптации микробных клеток к гербициду [20]. Замедление роста и более длинная lag-фаза были отмечены в работах многих исследователей – Moneke A. N., Okpala G. N., Anyanwu C. U. [36], Quinn J. P., Peden J. M, Dick R. E. [37].

Слизеобразующие бациллы широко распространены в почвах зоны умеренного климата, они проявляют высокую активность в отношении мобилизации калия из калийсодержащих минералов. Анализ литературных данных свидетельствует, что основным фактором их воздействия на минеральную часть почвы являются микробные слизи, которые очень богаты и разнообразны по своему составу. Они содержат сложный комплекс реакционноспособных химических соединений, способных взаимодействовать с элементами минералов, что приводит к их постепенному высвобождению из кристаллической решетки и переходу в растворимое состояние [35]. Слизеобразование является не только фактором воздействия на почвенные калийалюмосиликаты, но и служит существенным защитным фактором, обеспечивающим выживание *Bacillus* spp. в конкурентных условиях ризосферы и при неблагоприятных экологических условиях. Можно предположить, что микробные слизи представителей *Bacillus* spp. могут играть определенную роль в процессах разложения глифосата. Однако этот вопрос требует специальных исследований.

## ВЫВОДЫ

Проведен поэтапный скрининг способности калиймобилизующих бактерий *Bacillus* spp. метаболизировать гербицид глифосат. Для этого ризобактерии культивировали на минеральных твердых и жидких питательных средах в присутствии глифосата. Этапы скрининга включали качественную (на твердых средах DN и Nfb) и количественную (в жидкой среде Дворкина-Фостера) оценку способности калиймобилизующих ризобактерий метаболизировать глифосат как источник углерода. Анализ экспериментальных кривых роста, характеризующих зависимость плотности популяции от источника углерода в питательной среде показал, что *Bacillus* spp. не используют глифосат как единственный источник углерода. На следующем этапе скрининга (на твердых средах Муромцева и Nfb), установлено, что некоторые коллекционные штаммы ризобактерий *Bacillus* spp. способны метаболизировать глифосат в качестве единственного источника фосфора. На текущем этапе скрининга отобранные штаммы можно расположить в следующий убывающий ряд по активности роста в присутствии глифосата как единственного источника фосфора: *Bacillus* sp. Кт, *Bacillus circulans* К-81, *Bacillus* sp. К-62 и *Bacillus* sp. К-65.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Duke, S. O. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. / S. O. Duke, S. B. Powles // Pest Manage Sci. – 2008. – Vol. 64(4). – P. 319–325.
2. Carlisle, S. M. Glyphosate in the Environment. / S. M. Carlisle, J. T. Trevors // Water, Air and Soil Poll. – 1988. – Vol. 39. – P. 409–420.
3. Recent advances in glyphosate biodegradation / Hui Zhan [et al.] // Applied Mi-

crobiol. Biotech. – 2018.– Vol. 102.– P. 5033–5043.

4. *Gimsing, A. L.* Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. / A. L. Gimsing, O. K. Borggard // *Pest Manag. Sci.* – 2008. – Vol. 64(4). – P. 441–456.

5. *Bai, S. H.* Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination / S. H. Bai, S. M. Ogbourne // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2016. – Vol. 23(19). – P. 18988–19001.

6. Glyphosate persistence in seawater / P. Mercurio [et al.] // *Mar Pollut Bull.* – 2014. – Vol. 85(2). – P. 385–390.

7. *Annett, R.* Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment / R. Annett, H. R. Habibi, A. Hontela // *J. Appl. Toxicol.* – 2014. – Vol. 34(5). – P. 458–479.

8. *Grandcoin, A.* Aminomethylphosphonic acid (AMPA) in nature waters: its sources, behavior and environmental fate / A. Grandcoin, S. Piel, E. Baur // *Water Research.* – 2017. – P. 187–197.

9. Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina / L. Lupi [et al.] // *Sci Total Environ.* – 2015. – Vol. 536. – P. 687–694.

10. *Veiga, F.* Dynamics of Glyphosat and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain / F. Veiga [et al.] // *Sci. Total Environ.* – 2001. – Vol. 271. № 1–3. – P. 135–144.

11. Newton, M. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in north American forests / M. Newton [et al.] // *J Agric Food Chem.* – 1994. – Vol. 42(8). – P. 12.

12. *Cessna, A. J.* Residues of glyphosate and its metabolite AMPA in strawberry fruit following spot and wiper applications. / A. J. Cessna, N. P. Cain // *Can. J. Plant Sci.* – 1992. – Vol. 72. – P. 1359–1365.

13. *Шувалова, Н. Е.* Биотехнологические аспекты определения токсичности пестицидов на клеточных и организменных тест-системах: автореф. дис. / Н. Е. Шувалова. – Тверь, 2021.

14. Жариков М. Г. Эколого-токсикологическая оценка многолетнего применения глифосата на дерново-подзолистой почве и биоремедиация загрязненных территорий: дис. ...канд биол. наук / М. Г. Жариков; ВАК РФ 03.01.06. – М., 2012.

15. *Al-Ragab, A. J.* Degradation of <sup>14</sup>C-glyphosate and aminomethylphosphonic (AMPA) in three agricultural soils / A. J. Al-Ragab, M. Shiavon // *J. Environ. Sci.* – 2010. – Vol. 23. – P. 1374–1380.

16. Effects of repeated glyphosate applications on soil microbial community composition and the mineralization of glyphosate / S. H. Lancaster [et al.] // *Pest Management Science.* – 2010. – Vol. 66. – P. 59–64.

17. *Benachour, N.* Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells / N. Benachour, G. Seralini, // *Chemical Research in Toxicology.* – 2009. – Vol. 22. – P. 97–105.

18. *Chaufan, G.* Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: Differences with its active ingredient. / G. Chaufan, I. Coalova, M. Molina // *International Journal of Toxicology.* – 2014. – Vol. 33(1). – P. 29–38.

19. *DeRoos, A.* Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the agricultural health study / A. DeRoos [et al.] // *Environmental Health Perspec-*

tives. – 2005. – Vol. 113. – P. 49–54.

20. Кононова, С. В. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами / С. В. Кононова, М. А. Несмеянова // Биохимия. – 2002. – Т. 67. Вып. 2. – С. 220–233.

21. Шушкова, Т. В. Биодеструкция глифосата почвенными бактериями: дис. ... канд. биол. наук / Т. В. Шушкова; специальность ВАК РФ 03.01.06. – 2010.

22. Shushkova, T. Glyphosate bioavailability in soil / T. Shushkova, I. Ermakova, A. Leontievsky // Biodegradation. – 2010. – Vol. 21(3) – P. 403–410.

23. Микробная деградация гербицида глифосата (обзор) / А. В. Свиридов [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – Вып. 2. – С. 183–190.

24. Bioremediation of glyphosate contaminated soils / I. T. Ermakova [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 88(2). – P. 585–594.

25. Jacob, G. S. Metabolism of Glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. / G. S. Jacob [et al.] // Appl. Environ. Chem. – 1988. – Vol. 260. – P. 5899–5905.

26. Solid state NMR determination of glyphosate metabolism in a *Pseudomonas* sp. / G. S. Jacob [et al.] // J. Biol. Chem. – 1985. – Vol. 260. – P. 5899–5905.

27. Degradation of the Herbicide Glyphosate by Members of the Family *Rhizobiaceae* / C. M. Liu [et al.] // Appl. Environ. – Microbiol. – 1991. – Vol. 57. – P. 1799–1800.

28. Pipke, R. Uptake of Glyphosate by an *Arthrobacter* sp. / R. Pipke, A. Schulz, N. Amrhein // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – Vol. 53. – P. 974–978.

29. Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil / J. Fan [et al.] // Appl. Microbiol. – 2012. – Vol. 58(4). – P. 263–271.

30. Михайловская, Н. А. Количественная оценка активности калиймобилизующих бактерий и их эффективность на посевах озимой ржи / Н. А. Михайловская // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. аграрных наук. – 2006. – № 3. – С. 41–46.

31. Лапа, В. В. Эффективность бактериального удобрения калиплант на дерново-подзолистой супесчаной почве с разной обеспеченностью подвижным калием / В. В. Лапа, Н. А. Михайловская, Т. Б. Барашенко // Агрохимия. – 2016. – № 6. – С. 29–38.

32. Михайловская, Н. А. Влияние силикатных бактерий на развитие проростков ячменя и пшеницы / Н. А. Михайловская [и др.] // Почвенные исследования и применение удобрений. – 2003. – Вып. 27. – С. 316–324.

33. Михайловская, Н. А. Влияние бактериального удобрения Калиплант на урожайность и качество яровой пшеницы на эродированных почвах / Н. А. Михайловская, А. Ф. Черныш, С. А. Касьянчик // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. аграрных наук. – 2010. – № 2. – С. 51–58.

34. Михайловская, Н. А. Антагонистическая активность ризобактерий *A. brasiliense* и *B. circulans* по отношению к фитопатогенным микромицетам pp. *Fusarium* и *Alternaria* / Н. А. Михайловская, Т. Б. Барашенко // Почвоведение и агрохимия. – 2019. – № 1(62). – С. 234–244.

35. Аристовская, Т. В. Микробиология процессов почвообразования / Т. В. Аристовская. – Ленинград: Наука, 1980. – 187 с.

36. Moneke, A. N. Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields / A. N. Moneke, G. N. Okpala, C. U. Anyanwu // Afr. J. Biotechnol. – 2010. – Vol. 9(26). – P. 4067–4074.

37. Quinn, J. P. Carbon-phosphorus bond cleavage by Gram-positive and Gram-neg-

ative soil bacteria / J. P. Quinn, J. M. Peden, R. E. Dick // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1989. – Vol. 31(3). – P. 283–287.

## **SCREENING THE CAPABILITY OF POTASSIUM MOBILIZING RHIZOBACTERIA TO METABOLISE HERBICIDE GLYPHOSATE**

**N. A. Mikhailouskaya, T. B. Barashenko, T. V. Pogirnikskaya, S. V. Dyusova**

### **Summary**

Screening of zonal isolates *Bacillus* sp. By cultivation on solid and liquid nutrient media with different sources of carbon and phosphorus at background of increasing concentrations of glyphosate resulted in the determination of perspective target objects, which are capable of metabolization herbicide glyphosate as a sole P-source. Screening showed that potassium mobilizing rhizobacteria *Bacillus* sp. Virtually not capable of glyphosate utilization as sole carbon source for metabolism.

*Поступила 10.05.2022*

УДК 631.333

[https://doi.org/10.47612/0130-8475-2022-1\(68\)-212-218](https://doi.org/10.47612/0130-8475-2022-1(68)-212-218)

## **ПРОЦЕССЫ ХИМИЧЕСКОГО ВЫВЕТРИВАНИЯ НОВЫХ ВИДОВ АГРОМЕЛИОРАНТОВ**

**В. Н. Босак, Т. В. Сачивко**

*Белорусская государственная сельскохозяйственная академия,  
г. Горки, Беларусь*

### **ВВЕДЕНИЕ**

В Республике Беларусь в настоящее время планируется добыча и переработка нового силикатного сырья – базальтов вендской трапповой формации, промышленные залежи которых разведаны в юго-западной части Республики Беларусь. В геологическом разрезе им сопутствуют сапонитсодержащие вендские базальтовые туфы и туффиты, а также глауконитсодержащие породы палеогенового возраста, которые также будут извлекаться и накапливаться при добыче базальтового сырья. Глауконитсодержащие породы также широко распространены среди вскрышных пород в карьерах, где добывается мергельно-меловое сырье [1–3].

Учитывая минеральный и химический состав, существует несколько направлений использования сапонитсодержащих и глауконитсодержащих пород: производство портландцемента, керамических изделий, стекла и стеклокристаллических материалов, приготовление буровых промывочных жидкостей, в качестве природных сорбентов тяжелых металлов и радионуклидов и т. д. [4–8].

В сельском хозяйстве сапонитсодержащие базальтовые туфы и глауконитсодержащие породы могут использоваться в качестве магнийсодержащих (сапонит-