

## СКРИНИНГ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ПО СПОСОБНОСТИ МЕТАБОЛИЗИРОВАТЬ ГЕРБИЦИД ГЛИФОСАТ КАК ИСТОЧНИК ФОСФОРА

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

*Институт почвоведения и агрохимии,  
Минск, Беларусь*

### ВВЕДЕНИЕ

Глифосат (N-фосфометилглицин) является активным ингредиентом целого ряда гербицидов под разными коммерческими названиями. Это единственный гербицид, который ингибирует клеточный биосинтез ароматических аминокислот (тирозин, триптофан, фенилаланин) по шикиматному пути [1].

Широкое применение глифосата обусловлено его высокой эффективностью, относительно невысокой стоимостью и созданием устойчивых к этому гербициду трансгенных сортов важнейших сельскохозяйственных культур [2–4]. Глифосат (ГФ) может накапливаться и длительно сохраняться в почве вследствие взаимодействия с ее компонентами [6]. За последние десятилетия опубликовано множество научных данных, свидетельствующих о практически повсеместном присутствии глифосата и его первичного метаболитического продукта, аминотил-фосфоновой кислоты (АМФК), в окружающей среде: в воздухе, в почвах, грунтовых, дренажных и поверхностных водах [4, 5, 7].

Современные научные исследования указывают на негативный экологический эффект глифосата и на его токсическое действие на живые организмы. На основании информации об экологической опасности [4, 5, 7, 8] и токсическом действии глифосата на живые организмы [5, 7] Всемирная организация здравоохранения в 2015 г. признала глифосат карциногенным для человека. Глифосат запрещен в некоторых странах Европы, Азии и Южной Америки: Австрия, Бельгия, Мальта, Нидерланды, Шри-Ланка и Бразилия.

Микроорганизмы, преимущественно бактерии, способны к расщеплению ковалентной фосфоновой С–Р связи в молекуле глифосата за счет функционирования специфических мультиферментных систем – С–Р лиаз. В настоящее время микробные методы детоксикации глифосата, способные обеспечить его разложение до безопасных соединений, считаются самыми перспективными [5, 8–12]. Применение эффективных бактерий-деструкторов полностью приемлемо в экологическом отношении и не требует высоких экономических затрат [5, 11].

Разработка способов микробной детоксикации глифосата является приоритетной задачей. Для снижения негативных последствий многократного применения глифосата, восстановления биологической активности почвы и получения экологической продукции необходима периодическая ремедиация.

Актуален поиск активных агентов детоксикации глифосата среди ризобактерий, традиционно используемых в качестве инокулянтов. Интерес для скрининга

представляют азотфиксирующие бактерии – ассоциативные азотфиксаторы *Azospirillum* spp. и симбиотические *Rhizobium* spp. Известно, что *Azospirillum brasilense* и *Rhizobium trifolii* эффективно воздействуют на метаболизм инокулированных растений [13, 14, 15]. Применение бактериальных инокулянтов на их основе индуцирует существенный гормональный эффект, активизирует фиксацию атмосферного азота, способствует растворению трехзамещенных кальциевых фосфатов, улучшает качество продукции [16, 17, 18]. Установлено, что азотфиксирующие бактерии из нашего коллекционного фонда проявляют значимую антагонистическую активность по отношению к корневым фитопатогенам [19]. К настоящему времени практически не исследованы вопросы взаимодействия азотфиксирующих ризобактерий родов *Rhizobium* и *Azospirillum* с глифосатом. Представляет интерес скрининг азотфиксирующих бактерий нашей исследовательской коллекции и оценка их потенциальных возможностей в качестве деструкторов глифосата.

**Цель исследований** – скрининг азотфиксирующих ризобактерий родов *Rhizobium* и *Azospirillum* исследовательской коллекции по способности метаболизировать гербицид глифосат – N-фосфонометилглицин в качестве источника фосфора.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами скрининга служили азотфиксирующие ризобактерии *Rhizobium* spp. и *Azospirillum* spp. из коллекционного фонда Института почвоведения и агрохимии. Изучение способности ризобактерий метаболизировать глифосат проведено в серии *in vitro* экспериментов по их культивированию на твердых и жидких питательных средах.

**Тестирование устойчивости азотфиксирующих ризобактерий к глифосату на твердых питательных средах.** Для первичного тестирования толерантности к глифосату использованы двухсуточные культуры коллекционных ризобактерий *Rhizobium* spp. и *Azospirillum* spp., выращенные на картофельном агаре (КА, 28 °С). При соблюдении правил асептики в конические колбы (объем 300 мл) вносили стерильный (110 °С, 20 мин.) раствор гербицида Торнадо-500 различных концентраций, затем приливали по 100 мл расплавленной питательной среды (КА), тщательно перемешивали и разливали в чашки Петри (20 мл в каждую). Концентрации глифосата в питательных средах составили (мг/мл): 0 (C<sub>0</sub>), 0,25 (C<sub>1</sub>), 0,50 (C<sub>2</sub>), 0,75 (C<sub>3</sub>), 1,0 (C<sub>4</sub>), 2,0 (C<sub>5</sub>) и 3,0 (C<sub>6</sub>) мг/мл. 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.

**Тестирование устойчивости азотфиксирующих ризобактерий к глифосату в жидких питательных средах.** По результатам *in vitro* экспериментов на плотных питательных средах отобраны наиболее устойчивые к действию глифосата коллекционные азотфиксирующие бактерии *Azospirillum* spp. и *Rhizobium* spp. и проведено их тестирование в жидкой питательной среде Дворкина-Фостера [20] с возрастающим содержанием глифосата.

Состав модифицированной среды Дворкина-Фостера (г/л): глюкоза – 5,0 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; дрожжевой экстракт – 0,0053; трис-буфер – 6,05; (рН до 7,0).

В качестве посевного материала использованы двухсуточные культуры коллекционных ризобактерий *Rhizobium trifolii* и *Azospirillum brasilense*, выращенные на плотном картофельном агаре. Объектами исследований служили коллекционные штаммы ассоциативных азотфиксирующих бактерий р. *Azospirillum* (*A. brasilense* 4485, 2(в)3, Дп1, 1) и *Azospirillum* sp. Б-7 и клубеньковых бактерий р. *Rhizobium* (*Rh. trifolii* R-45, R-107, R-63/3) и *Rhizobium* sp. R-65/2.

Бактериальные культуры смывали физиологическим раствором и разводили до концентрации  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. В конические колбы объемом 200 мл вносили по 60,0; 180,0; 300,0 и 900,0 мкл гербицида Торнадо. Затем объем инкубационной смеси доводили до 140 мл, используя модифицированную жидкую минеральную среду Дворкина-Фостера. В опытные колбы приливали по 10,0 мл исследуемых посевных бактериальных культур. Инкубация в термостате при температуре 28 °С с периодическим перемешиванием на шейкере орбитальном KS-501 digital IKA WERKE (GmbH & Co.KG) при 80 об/мин.). Контроль – инокулированная среда без внесения гербицида. Повторность в экспериментах – трехкратная.

Для мониторинга роста ризобактерий в *in vitro* экспериментах периодически проводили определение оптической плотности инкубационной смеси (OD при  $\lambda=500$  нм) на спектрофотометре UV/VIS SP-8001. Результаты считали достоверными при отклонении величин в пределах  $\pm 5$  %.

В лабораторных исследованиях использовали 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 химических реактивов и посуды используются стерилизатор паровой ГК-100-3, стерилизатор паровой ГК-10-1, облучатели ультрафиолетовые УГД-2 и УГД-3. Для культивирования бактерий в лаборатории используются: Экрос (№ 6410), шейкер орбитальный KS-501 digital IKA WERKE (GmbH & Co.KG), перемешивающее устройство ЛАБ-ПУ-01 (2007 г.) и термостат ТПС-1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время активно проводятся исследования по поиску эффективных микробных деструкторов глифосата. Это обусловлено актуальностью проблемы детоксикации остатков этого гербицида, а также низкой эффективностью физических и химических методов деструкции глифосата. Химический гидролиз, термическое разложение, фотолиз и другие способы детоксикации ГФ не получили практического применения [2, 3, 5, 11]. Ковалентная связь С–Р в молекуле глифосата отличается высокой устойчивостью по сравнению с Р–О, S–Р и N–Р связями, которые легче расщепляются микроорганизмами [11, 12].

Исследования по изучению биодеструкции глифосата в загрязненных почвах, водах, и в промышленном активном иле были начаты Rueppel et al. [21], Baltazor, Hallas [22] и Jacob [23]. Эти работы заложили основы исследования путей биодеградации глифосата в окружающей среде и идентификации микроорганизмов, способных метаболизировать этот гербицид. К настоящему времени известно,

что способность к биодegradации глифосата в почве и воде проявляют бактерии разных родов. По современным представлениям глифосат-утилизирующие бактерии распространены среди pp. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* [5, 24, 28], *Azospirillum* [25–28], *Arthrobacter* [5], *Flavobacterium* sp. [5] и некоторых других. Метаболизирующие глифосат бактерии выделяют как из загрязненных почв, так и на территориях, где глифосат никогда не применяли. Деструкторы глифосата выявлены как среди грамположительных, так и среди грамотрицательных бактерий [5, 9, 11].

Большинство исследователей отмечают высокий уровень штаммовой специфичности и значительные различия по эффективности деструкции глифосата в зависимости от родовой и видовой принадлежности бактерий. Известно также, что среди бактерий одного рода высокую эффективность по биодegradации глифосата проявляют лишь отдельные штаммы. Для эффективного использования потенциала бактериальных деструкторов глифосата необходимо изучение механизмов биодegradации гербицида. Успешная биологическая ремедиация подразумевает трансформацию загрязнителя до менее токсичных веществ, в идеальном случае – до безопасных химических соединений [8–10, 12].

Среди азотфиксирующих бактерий, которые представляют интерес для улучшения азотного питания растений, также были обнаружены деструкторы глифосата. Это представители *Rhizobium* sp. и *Azospirillum* sp. Ряд научных исследований свидетельствует, что азотфиксирующие бактерии нередко имеют в своем биохимическом арсенале активные ферменты катаболизма глифосата – C–P лиазные полиферментные комплексы.

В исследованиях Liu C.-M., McLean P. A., Sookdeo C. C. Cannon F. C. [24] показано, что способность к разложению глифосата широко распространена среди представителей семейства *Rhizobiaceae*. Протестированные клубеньковые бактерии хорошо развивались на минимальной среде с глифосатом в качестве единственного источника фосфора. Наиболее полно охарактеризован штамм *Rhizobium meliotti* 1021, который метаболизировал глифосат с образованием саркозина, что непосредственно указывает на наличие C–P лиазной активности.

В исследованиях Moneke A. N., Okpala G. N., Anyanwu C. U. [25], а также Travaglia C., Masciarelli O., Fortuna J. [28] была показана толерантность представителей *Azospirillum* sp. к глифосату и их способность утилизировать гербицид как источник элементов питания для собственного роста (*in vitro*).

В нашей исследовательской коллекции ризосферных бактерий выявлены представители *Azospirillum* sp., и *Rhizobium* sp., способные развиваться на питательных средах с глифосатом. В 2021–2022 гг. в результате проведения серии *in vitro* экспериментов в жидкой среде Дворкина-Фостера было установлено, что ассоциативные (*Azospirillum* sp.) и симбиотические (*Rhizobium* sp.) diaзотрофы метаболизируют глифосат как источник фосфора.

Вопрос о том, какой элемент из глифосата используют бактерии имеет первостепенное значение, так как безопасную детоксикацию глифосата могут обеспечить только отдельные штаммы-деструкторы, использующие этот гербицид как источник фосфора. Считается, что такие бактерии имеют активный C–P лиазный мультиферментный комплекс, расщепляющий ковалентную фосфоновую C–P связь [8–12]. Результаты поэтапного скрининга показали, что коллекционные штаммы *Azospirillum brasilense* и *Rhizobium trifolii* эффективно

метаболизируют глифосат только как источник фосфора для собственного метаболизма, что делает их перспективными целевыми объектами для детоксикации этого гербицида.

Большинство природных микробных сообществ почвы и воды трансформируют глифосат до его первичного метаболита аминометилфосфоновой кислоты (АМФК) под действием фермента глифосатоксидоредуктазы [5, 11]. АМФК по-прежнему содержит фосфоновую С–Р связь, активно адсорбируется почвенными компонентами, медленно разлагается, накапливается и не проявляет гербицидных свойств [4, 12]. Для биodeградации АМФК до безопасных химических соединений также требуется действие полиферментного комплекса С–Р лиазы.

**Показатели роста симбиотических азотфиксирующих бактерий *Rhizobium* spp. в зависимости от содержания глифосата в питательных средах (*in vitro*).** Начальные этапы скрининга включали оценку показателей роста клубеньковых бактерий на твердых питательных средах с возрастающими концентрациями глифосата. Приведены экспериментальные данные, полученные при первичном качественном скрининге *Rhizobium* spp. на картофельном агаре. По результатам тестирования на твердой картофельной среде с возрастающими концентрациями глифосата хорошие показатели роста отмечены для четырех штаммов клубеньковых бактерий: *Rhizobium trifolii* R-45, *Rhizobium trifolii* R-63/3, *Rhizobium trifolii* R-107 и *Rhizobium* R-65/2. Штаммы бактерий *Rh. trifolii* R-45, R-63/3 и R-107 активно развивались на картофельном агаре до достижения концентрации глифосата 1,00 мг/мл, при повышении концентрации гербицида до 3,00 мг/мл отмечали среднюю активность роста бактерий (табл. 1). Меньшая толерантность к глифосату отмечена для штамма *Rhizobium* sp. R-65/2. Остальные штаммы ризобий хорошо развивались только на более низких концентрациях глифосата в питательной среде.

Таблица 1

**Показатели роста *Rhizobium* spp. в зависимости от содержания глифосата в картофельном агаре (*in vitro*)**

<i>Rhizobium</i> spp.	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>Rhizobium</i> sp. R-15	+++	+++	+++	++	+	+	–
<i>Rh. trifolii</i> R-45	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
<i>Rhizobium</i> sp. R-62	+++	+++	+++	+	–	–	–
<i>Rhizobium</i> sp. R-63/2	+++	+++	+++	+	–	–	–
<i>Rh. trifolii</i> R-63/3	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
<i>Rhizobium</i> sp. R-65/2	+++	+++	+++	+++	++	++	+
<i>Rhizobium</i> sp. R-76/2	+++	+++	+++	+	+	–	–
<i>Rhizobium</i> sp. R-78	+++	+++	+++	+	+	–	–
<i>Rhizobium</i> sp. R-94	+++	+++	+++	+	+	–	–
<i>Rh. trifolii</i> R-107	+++	+++	+++	+++	+++	++	++

+++ хороший рост; ++ средний рост; + слабый рост; – отсутствие роста.

Следующий этап исследований включал серию *in vitro* экспериментов по количественному скринингу коллекционных штаммов азотфиксирующих бактерий р. *Rhizobium*. Предварительно были подобраны и апробированы условия культивирования для бактерий *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp.

По литературным данным для количественной оценки активности роста, мониторинга накопления биомассы и установления зависимости плотности популяций исследуемых бактерий от концентрации глифосата, наиболее адекватно их культивирование в жидких минеральных питательных средах. Подходящей питательной средой для решения поставленной задачи является жидкая минеральная среда Дворкина-Фостера [20]. Для оптимизации условий экспериментов состав среды был нами модифицирован: единственным источником фосфора служил глифосат, концентрация углерода была увеличена.

Важным условием является выбор диапазона исследуемых концентраций глифосата в экспериментах в жидких средах. На основании анализа результатов экспериментов, проведенных Moneke A. N. et al. [25] и Travaglia C., Masciarelli O. [28], в наших исследованиях использованы концентрации глифосата, наиболее приближенные к реальным полевым условиям.

Критерием активности роста азотфиксирующих бактерий служили показатели оптической плотности ( $OD_{500}$ ) инкубационных смесей, которые регистрировали в *in vitro* экспериментах каждые 24–48 часов.

Количественный скрининг в модифицированной жидкой минеральной среде Дворкина-Фостера подтвердил результаты первичного качественного скрининга на плотном картофельном агаре (КА). Наилучшие показатели роста были отмечены для четырех штаммов клубеньковых бактерий: *Rhizobium trifolii* R-45, *Rhizobium trifolii* R-63/3 и *Rhizobium trifolii* R-107 (табл. 2). По активности роста в питательной среде с глифосатом в качестве источника фосфора штаммы клубеньковых бактерий располагаются в следующем убывающем порядке: R-45, R-63/3, R-107 и R-65/2. Штамм *Rhizobium* R-65/2 значительно уступал по активности роста в жидкой среде с ГФ.

Таблица 2

**Мониторинг роста *Rhizobium trifolii* в жидкой минеральной среде Дворкина-Фостера с разным содержанием глифосата (*in vitro*, 2022 г.)**

<i>Rhizobium trifolii</i>	C <sub>ГФ</sub>	OD <sub>500</sub>								
		время культивирования, сутки								
		0,3	1	2	3	4	7	9	11	14
R-45	0	0,352	0,507	0,631	0,729	0,813	0,820	0,885	0,912	0,919
	1	0,296	0,413	0,446	0,524	0,540	0,665	0,675	0,698	0,691
	2	0,260	0,282	0,294	0,296	0,325	0,332	0,392	0,480	0,497
	3	0,258	0,275	0,281	0,267	0,266	0,283	0,322	0,392	0,390
	4	0,230	0,233	0,233	0,239	0,233	0,230	0,244	0,249	0,247
R-107	0	0,386	0,551	0,633	0,715	0,890	0,898	0,944	0,968	0,968
	1	0,335	0,355	0,371	0,430	0,487	0,551	0,570	0,575	0,562
	2	0,327	0,332	0,391	0,435	0,436	0,460	0,490	0,491	0,503
	3	0,300	0,322	0,343	0,358	0,362	0,372	0,380	0,376	0,376
	4	0,308	0,320	0,318	0,306	0,306	0,305	0,334	0,339	0,336
R-63/3	0	0,468	0,715	0,946	1,050	1,090	1,153	1,182	1,209	1,212
	1	0,438	0,454	0,556	0,660	0,687	0,702	0,713	0,719	0,729
	2	0,407	0,422	0,445	0,466	0,495	0,517	0,596	0,656	0,668
	3	0,335	0,347	0,355	0,356	0,371	0,379	0,385	0,387	0,397
	4	0,317	0,323	0,328	0,331	0,337	0,337	0,341	0,340	0,339

<i>Rhizobium trifolii</i>	C <sub>ГФ</sub>	OD <sub>500</sub>								
		время культивирования, сутки								
		0,3	1	2	3	4	7	9	11	14
R-65/2	0	0,342	0,468	0,599	0,720	0,790	0,903	0,947	0,948	0,942
	1	0,325	0,340	0,348	0,368	0,387	0,394	0,404	0,392	0,396
	2	0,316	0,320	0,321	0,332	0,346	0,362	0,380	0,389	0,380
	3	0,306	0,302	0,303	0,308	0,317	0,324	0,328	0,326	0,326
	4	0,308	0,300	0,289	0,309	0,303	0,305	0,314	0,317	0,309

0 – без ГФ; 1– 0,20; 2 – 0,60; 3 – 1,0; 4 – 3,0 мкг/мл.

Построены кривые роста для трех активных штаммов бактерий *Rhizobium trifolii* (R-45, R-63/3, R-107), которые показывают тесную взаимосвязь плотности популяции с концентрацией ГФ. Эти штаммы перспективны как целевые объекты для продолжения скрининга.

**Показатели роста ассоциативных азотфиксирующих бактерий р. *Azospirillum* в зависимости от содержания глифосата в питательных средах.** В серии *in vitro* экспериментов на твердом картофельном агаре (КА) проведено тестирование 12 штаммов ассоциативных бактерий р. *Azospirillum* из нашей исследовательской коллекции. При первичном качественном скрининге хорошие показатели роста были отмечены для пяти штаммов ассоциативных азотфиксаторов: *A. brasilense* 4485, *A. brasilense* 1', *A. brasilense* Дп1, *A. brasilense* 2(в)3 и *Azospirillum* sp. Б-7 (табл. 3).

Таблица 3

**Показатели роста *Azospirillum* sp. в зависимости от содержания глифосата в картофельном агаре (*in vitro*, 2021)**

<i>Azospirillum</i> spp.	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>A. brasilense</i> 1'	+++	+++	+++	+++	++	+	+
<i>Azospirillum</i> sp. 7	+++	+++	+++	+	+	+	–
<i>Azospirillum</i> sp.33a	+++	+++	+++	+	+	+	–
<i>A. brasilense</i> 2(в)3	+++	+++	+++	+++	++	–	–
<i>A. brasilense</i> 4485	+++	+++	+++	+++	++	+	+
<i>Azospirillum</i> sp. Л-2	+++	++	++	+	+	–	–
<i>Azospirillum</i> sp. М-1	+++	+++	+	+	+	–	–
<i>Azospirillum</i> sp К	+++	+++	+++	–	–	–	–
<i>Azospirillum</i> sp К-1	+++	+++	+++	+	+	–	–
<i>Azospirillum</i> sp Б	+++	+++	++	–	–	–	–
<i>Azospirillum</i> sp Б-7	+++	+++	+++	+++	++	–	–
<i>A. brasilense</i> Дп1	+++	+++	+++	+++	++	+	+

+++ хороший рост; ++ средний рост; + слабый рост; – отсутствие роста.

По результатам первичного тестирования проведена предварительная дифференциация коллекционных штаммов *Azospirillum* spp. по способности развиваться на плотной картофельной среде с глифосатом как единственным источником фосфора. Определен круг наиболее перспективных объектов для последующего количественного скрининга: *A. brasilense* 2(в)3, *A. brasilense* 4485, *A. brasilense* Дп1, *A. brasilense* 1' и *Azospirillum* sp. Б-7.

Для мониторинга роста и количественной оценки накопления биомассы наиболее активные представители ассоциативных diaзотрофов *Azospirillum* spp. культивировали в модифицированной жидкой минеральной среде Дворкина-Фостера. Модификация включала использование глифосата в качестве единственного источника фосфора, а также увеличение концентрации углерода.

Результаты экспериментов по мониторингу активности роста *Azospirillum* sp. в жидкой минеральной среде Дворкина-Фостера подтвердили данные первичного качественного скрининга на картофельном агаре (КА) для трех штаммов ассоциативных азотфиксирующих бактерий: *A. brasilense* 2(в)3, *A. brasilense* Дп1 и *A. brasilense* 1'. Рост штаммов *A. brasilense* 4485 и *Azospirillum* sp. Б-7 в жидкой питательной среде в присутствии глифосата оказался менее активным (табл. 4, рис. 2).

Таблица 4

**Мониторинг роста *Azospirillum* spp. в жидкой минеральной среде Дворкина-Фостера с разным содержанием глифосата (*in vitro*, 2022 г.)**

<i>Azospirillum</i> sp.	C <sub>ГФ</sub>	OD <sub>500</sub>								
		время культивирования, сутки								
		0,3	1	2	3	4	7	9	11	14
2(в)3	0	0,368	0,710	0,753	0,795	0,828	0,976	1,203	1,308	1,345
	1	0,326	0,401	0,476	0,586	0,602	0,695	0,837	0,820	0,824
	2	0,300	0,304	0,340	0,381	0,379	0,483	0,667	0,706	0,709
	3	0,304	0,308	0,314	0,342	0,344	0,397	0,397	0,434	0,428
	4	0,300	0,303	0,309	0,329	0,347	0,354	0,365	0,376	0,396
Дп1	0	0,329	0,460	0,582	0,625	0,806	1,236	1,258	1,252	1,299
	1	0,317	0,407	0,439	0,504	0,514	0,654	0,702	0,769	0,877
	2	0,316	0,418	0,425	0,457	0,477	0,630	0,625	0,664	0,723
	3	0,322	0,355	0,378	0,400	0,412	0,473	0,546	0,644	0,704
	4	0,312	0,315	0,314	0,318	0,361	0,383	0,385	0,411	0,414
1'	0	0,388	0,504	0,562	0,581	0,579	0,598	0,595	0,624	0,647
	1	0,326	0,372	0,399	0,420	0,426	0,468	0,472	0,480	0,494
	2	0,317	0,346	0,366	0,381	0,374	0,420	0,454	0,452	0,473
	3	0,313	0,334	0,338	0,346	0,355	0,362	0,357	0,361	0,386
	4	0,320	0,331	0,334	0,335	0,341	0,362	0,360	0,372	0,370
4485	0	0,280	0,434	0,562	0,587	0,669	0,882	0,895	0,874	0,886
	1	0,262	0,272	0,268	0,340	0,363	0,381	0,401	0,411	0,400
	2	0,247	0,266	0,270	0,322	0,336	0,342	0,334	0,350	0,339
	3	0,243	0,245	0,261	0,260	0,285	0,279	0,293	0,316	0,308
	4	0,216	0,228	0,243	0,255	0,248	0,252	0,254	0,243	0,244
Б-7	0	0,308	0,373	0,456	0,492	0,517	0,522	0,603	0,594	0,606
	1	0,233	0,262	0,274	0,298	0,332	0,341	0,352	0,374	0,363
	2	0,227	0,234	0,242	0,232	0,246	0,255	0,253	0,250	0,247
	3	0,223	0,235	0,240	0,239	0,232	0,240	0,248	0,238	0,244
	4	0,216	0,218	0,228	0,222	0,230	0,226	0,225	0,222	0,224

0 – без ГФ; 1– 0,20; 2 – 0,60; 3 – 1,0; 4 – 3,0 мкг/мл.



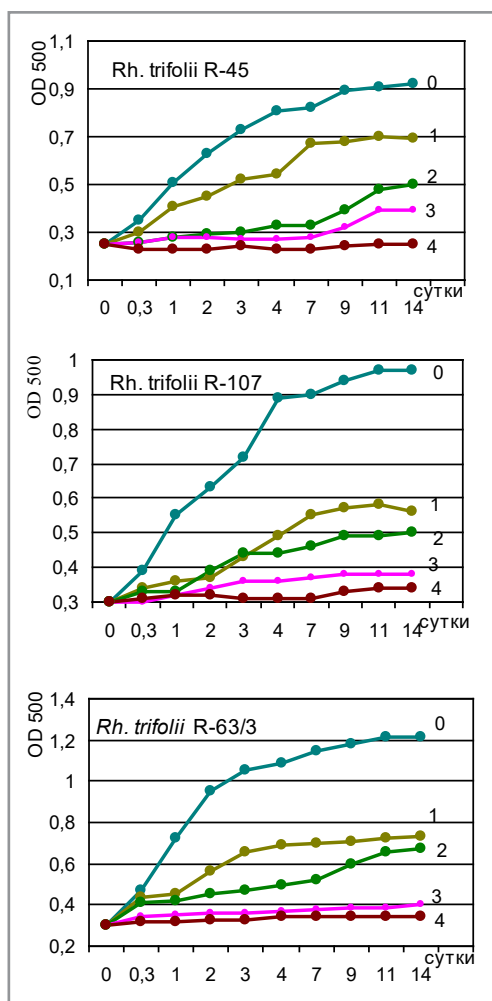


Рис. 1. Кривые роста *Rh. trifolii* в жидкой среде Дворкина-Фостера при разных концентрациях глифосата (0 – без ГФ; 1 – 0,20; 2 – 0,60; 3 – 1,0; 4 – 3,0 мкг ГФ/мл)

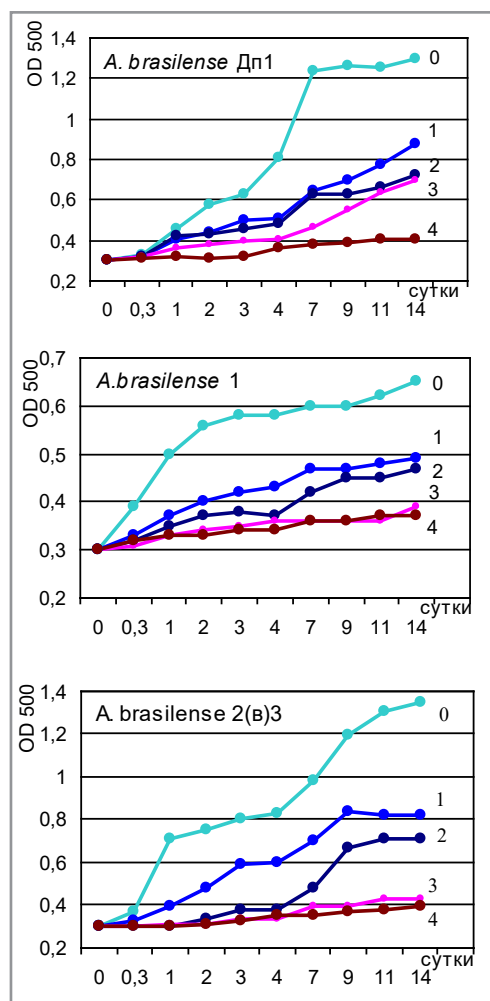


Рис. 2. Кривые роста *A. brasilense* в жидкой среде Дворкина-Фостера при разных концентрациях глифосата (0 – без ГФ; 1 – 0,20; 2 – 0,60; 3 – 1,0; 4 – 3,0 мкг ГФ/мл)

## ВЫВОДЫ

Выполнен качественный и количественный скрининг ассоциативных и симбиотических азотфиксирующих ризобактерий методом поэтапного культивирования на картофельном агаре и в жидкой минеральной среде Дворкина-Фостера с возрастающими концентрациями глифосата в качестве единственного источника фосфора. Установлены зависимости активности роста diaзотрофов от концентрации глифосата в питательных средах, а также от их родовой и видовой принадлежности. По результатам качественного и количественного скрининга проведен отбор

перспективных штаммов-деструкторов глифосата родов *Azospirillum* и *Rhizobium* в исследовательской коллекции. На текущем этапе скрининга наилучшие показатели роста и накопления биомассы показали три штамма клубеньковых бактерий: *Rhizobium trifolii* R-45, *Rhizobium trifolii* R-63/3 и *Rhizobium trifolii* R-107 и три штамма ассоциативных азотфиксирующих бактерий: *A. brasilense* Дп1, *A. brasilense* 2(в)3, и *A. brasilense* 1'.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haslam, E. The shikimate pathway: biosynthesis of natural products serie / E. Haslam. – Elsevier, New York. – 2014.
2. Franz, J. E. Glyphosat: a Unique Global Herbicid. / J. E. Franz, M. K. Mao, J. A. Sikorski // American Chemical Society ACS Monograph 189, Washington, DC, 1997. – P. 163–175.
3. 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.
4. Carlisle, S. M. Glyphosate in the Environment / S. M. Carlisle, J. T. Trevors // Water, Air and Soil Poll. – 1988. – Vol. 39 – P. 409–420.
5. Recent advances in glyphosate biodegradation / H. Zhan [et al.] // Applied Microbiol. Biotech. – 2018. – Vol. 102. – P. 5033–5043.
6. Glass, R. L. Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals / R. L. Glass // J. Agric. Food Chem. – 1987. – Vol. 35. – P. 497–500.
7. 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.
8. Sviridov, A. Glyphosate: safety risks, biodegradation, and bioremediation / A. Sviridov [et al.] // Current environmental issues and challenges. Springer, Dordrecht. – 2014. – P. 183–195.
9. Микробная деградация гербицида глифосата (обзор) / А. В. Свиридов [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – Вып. 2. – С. 183–190.
10. Shushkova, T. Glyphosate bioavailability in soil / T. Shushkova, I. Ermakova, A. Leontievsky // Biodegradation. – 2010. – Vol. 21(3). – P. 403–410.
11. Кононова, С. В. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами / С. В. Кононова, М. А. Несмеянова // Биохимия. – 2002. – Т. 67. – Вып. 2. – С. 220–233.
12. Microbial degradation of glyphosate herbicides (review) / A. V. Sviridov [et al.] // Appl Biochem Microbiol. – 2015. – Vol. 51(2). – P. 188–190.
13. Bashan, Y. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture / Y. Bashan, H. Levanony // Can. J. Microbiol.
14. Okon, Y. Agronomic application of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation / Y. Okon, C. A. Labandera-Gonzalez // Soil Biol. Biochem.
15. Михайловская, Н. А. Азоспириллы и их влияние на злаковые культуры (обзор) / Н. А. Михайловская // Почвоведение и агрохимия.
16. Активность фосфатмобилизации у ризобактерий / Н. А. Михайловская [и др.] // Почвоведение и агрохимия. – 2007. – № 1(38). – С. 225–231.
17. Mikhailouskaya N. The effect of seed inoculation by *Azospirillum brasilense* B-4485 on flax yield and its quality / N. Mikhailouskaya // Plant, Soil and Environment. – 2006. – Vol. 52(9). – P. 402–406.

18. Эффективность бактеризации разных видов трав *Azospirillum brasilense* / Н. А. Михайловская [и др.] // Почвоведение и агрохимия.
19. Михайловская, Н. А. Антагонистическая активность ризобактерий *A. brasilense* и *B. circulans* по отношению к фитопатогенным микромицетам рр. *Fusarium* и *Alternaria* / Н. А. Михайловская, Т. Б. Барашенко // Почвоведение и агрохимия. – 2019. – № 1 (62). – С. 234–244.
20. Dworkin, M. Experiments with some microorganisms which utilized methane and hydrogen / M. Dworkin, J. W. Foster // J. Bacteriol. – 1958. – Vol. 75. – P.592–603.
21. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water / M. L. Rueppl [et al.] // J. Agric. Food. Chem. – 1977. – Vol. 25. – P. 517–528.
22. Balthazor, T. M. Glyphosat-degrading microorganisms from industrial activated sludge / T. M. Balthazor, L. E. Hallas // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – Vol. 51. – P. 432–434.
23. Metabolism of Glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. / G. S. Jacob [et al.] // Appl. Environ. Chem. – 1988. – Vol. 260. – P. 5899–5905.
24. Liu, C.-M. Degradation of the Herbicide Glyphosate by Members of the Family Rhizobiaceae / C.-M. Liu, P. A. McLean, C. C. Sookdeo, F. C. Cannon // Appl. and Environ. Microbiol. – 1991. – Vol. 57(6). – P. 1799–1804.
25. Moneke, A. N. Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice field / A. N. Moneke, G. N. Okpala, C. U. Anyanwu // Afr. J. Biotechnol. – 2010. – Vol. 9(26). – P. 4067–4074.
26. Gadkari, D. Influence of herbicides on growth and nitrogenase activity of *Azospirillum*. In: Klingmüller, W. (Ed.), *Azospirillum*. IV. Genetics, Physiology, Ecology. – 1988. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. – P. 150–158.
27. Inoculation of rice with *Azospirillum brasilense* in EGYPT: results of five different trials between 1985 and 1990 / N. Omar [et al.] // Symbiosis. – 1992. – Vol. 13. – P. 281–289.
28. Towards sustainable maize production: Glyphosate detoxification by *Azospirillum* sp. and *Pseudomonas* sp. / C. Travaglia [et al.] // Crop Protection. – 2015. – Vol. 77. – P. 102–109.

## **SCREENING THE CAPABILITY OF NITROGEN FIXING BACTERIA TO METABOLISE HERBICIDE GLYPHOSATE AS A SOURCE OF PHOSPHORUS**

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

### **Summary**

Screening of rhizosphere bacteria *Azospirillum* sp. and *Rhizobium* sp. by cultivation in modified liquid mineral media Dvorkin and Foster with increasing concentrations of glyphosate as a sole P-source resulted in the determination of perspective target objects, which are capable of herbicide glyphosate metabolization.

*Поступила 07.12.22*