

## **СКРИНИНГ ФОСФАТРАСТВОРЯЮЩИХ РИЗОБАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS* SPP. ПО АКТИВНОСТИ КУЛЬТУРАЛЬНОГО РОСТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИФОСАТА В ЖИДКОЙ СРЕДЕ ДВОРКИНА-ФОСТЕРА**

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

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

### **ВВЕДЕНИЕ**

Поиск и разработка эффективных способов микробной детоксикации глифосата в настоящее время является приоритетной задачей. Необходимость ее решения обусловлена негативным влиянием глифосата (ГФ) и его первичного метаболита, аминометилфосфоновой кислоты (АМФК), на окружающую среду и токсическим действием на живые организмы.

Интенсивное применение в растениеводстве, в лесном хозяйстве, на территориях городов, в садоводстве, для очистки водоемов привело к практически повсеместному присутствию остаточных количеств глифосата и его метаболитического продукта АМФК, в окружающей среде: в воздухе [1–3], в почвах [1–9], природных водах [1, 3, 10–16], в продукции растениеводства [3, 4, 17–19]. Приводятся данные о наличии остатков глифосата в тканях животных и человека [20].

Глифосат и АМФК способны блокировать активность гена CYP 450, ответственного за функционирование обширной группы ферментов, регулирующих метаболизм большинства лекарственных средств, а также канцерогенов и мутагенов [21, 22]. Выявлен широкий спектр влияния глифосата на репродуктивное здоровье человека [23–25]. Глифосат-содержащие гербициды оказывают цитотоксическое действие на клетки человека [26], вызывают эндокринные нарушения [27], негативно влияют на эритроциты крови [3, 28]. Установлена повышенная распространенность онкологических заболеваний среди работников, непосредственно выполняющих обработки глифосатом [28].

Глифосат и аминометилфосфоновая кислота вызывают повреждения ДНК у рыб [29], установлена их токсичность для моллюсков [30], негативное действие на амфибий [31], на выживаемость и репродукцию дождевых червей [32]. Аминометилфосфоновая кислота нарушает жизненно важные процессы репарации ДНК и синтеза мРНК в растительных и животных организмах.

На основании накопленной к настоящему времени информации об экологической опасности и токсическом действии ГФ на живые организмы Всемирная организация здравоохранения в 2015 г. признала глифосат карциногенным для человека [3]. Применение глифосата запрещено в Австрии, Аргентине, Бельгии, Мальте, Нидерландах, Шри-Ланке. Многие страны значительно снизили потребление глифосата.

Микроорганизмы, преимущественно бактерии, способны разлагать глифосат за счет действия своих ферментных систем [3, 4, 6, 33–38]. В связи с этим во многих

странах активно проводятся исследования по поиску микробных деструкторов ГФ. К настоящему времени наибольшее их число обнаружено среди представителей фосфатрастворяющих ризосферных бактерий *Pseudomonas* spp. [3, 39].

Для снижения негативных последствий многократного применения глифосата, восстановления биологической активности почвы и получения экологической продукции необходима периодическая ремедиация. Наиболее перспективно применение микробных деструкторов гербицида [3, 4, 6, 33–38], которые могут обеспечить разложение глифосата до безопасных соединений.

В задачи наших исследований входят поиски деструкторов глифосата среди ризосферных бактерий, применяемых в качестве инокулянтов. Фосфатрастворяющие бактерии нашей исследовательской коллекции *Pseudomonas* spp. представляют интерес как объекты исследований, так как характеризуются широким спектром полезных свойств. Применение их в качестве инокулянтов активизирует процессы растворения трехзамещенных фосфатов, индуцирует значительный гормональный эффект [40], проявляют высокую антагонистическую активность по отношению к корневым фитопатогенам.

**Цель исследований** – скрининг фосфатрастворяющих ризосферных бактерий *Pseudomonas* spp. по активности роста в зависимости от содержания глифосата в жидкой среде Дворкина-Фостера и установление способности *Pseudomonas* spp. метаболизировать глифосат как источник азота и фосфора.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований служили коллекционные штаммы фосфатрастворяющих ризосферных бактерий *Pseudomonas* spp. (P1, P6, P7, P9, P10, P11, P12, P15, P16, P19, P21, P25, P28, P42, P54).

**Изучение способности ризобактерий *Pseudomonas* spp. утилизировать гербицид глифосат в качестве единственного источника азота.** Исследования проведены путем их культивирования в модифицированной жидкой среде Дворкина-Фостера [41] с разными источниками азота:

Вариант N<sub>0</sub> (без источника азота, г/л): глюкоза – 1,0 г/л, MgSO<sub>4</sub> – 0,075, CaCO<sub>3</sub> – 0,03, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,001; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,000001, MnSO<sub>4</sub> – 0,000001; трис-буфер – 6,05.

Вариант N<sub>ГФ</sub> (глифосат в качестве источника азота, г/л): глюкоза – 1,0 г/л, MgSO<sub>4</sub> – 0,075, CaCO<sub>3</sub> – 0,03, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,001; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,000001, MnSO<sub>4</sub> – 0,000001; трис-буфер – 6,05.

Вариант N<sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub> (сульфат аммония в качестве источника азота, г/л): глюкоза – 1,0 г/л, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,375, MgSO<sub>4</sub> – 0,075, CaCO<sub>3</sub> – 0,03, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,001; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,000001, MnSO<sub>4</sub> – 0,000001; трис-буфер – 6,05.

Жидкую питательную среду Дворкина-Фостера (рН 7,0) автоклавировали при 121 °С, 1,5 атм., 15 мин. Стерильный 10 % раствор глюкозы (0,5 атм., 15 мин.) и 50 % раствор Торнадо (110 °С, 20 мин.) готовили отдельно и вносили в питательную среду непосредственно перед использованием. Концентрация глифосата в питательной среде 0,50 мкг/мл.

Для мониторинга роста ризобактерий в этой серии *in vitro* экспериментов периодически проводили определение оптической плотности инкубационной смеси (OD при λ = 590 нм) на фотоэлектроколориметре КФК-2-УХЛ-4,2. Результаты считали достоверными при отклонении величин в пределах ± 5 %.

**Изучение активности роста *Pseudomonas* spp. в жидкой среде Дворкина-Фостера с разным содержанием глифосата в качестве единственного источника фосфора.** Выполнены *in vitro* эксперименты по культивированию коллекционных фосфатрастворяющих ризобактерий в жидкой питательной среде с возрастающим содержанием глифосата.

Для исследований использовали модифицированную жидкую среду 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). Модификация состава среды состояла в увеличении концентрации источника углерода и включении в состав питательной среды дрожжевого экстракта.

В качестве посевного материала использованы двухсуточные культуры ризобактерий, выращенные на плотном агаре. 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 (30,0; 90,0; 150,0 и 450,0 мкг по действующему веществу). Затем объем инкубационной смеси доводили до 140 мл, используя модифицированную жидкую среду Дворкина-Фостера. В колбы приливали по 10,0 мл исследуемых посевных бактериальных культур *Pseudomonas* spp. 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 опыте – 3-кратная.

Для мониторинга активности роста ризобактерий в *in vitro* экспериментах периодически проводили определение оптической плотности инкубационной смеси (OD при  $\lambda = 500$  нм) на спектрофотометре UV/VISSP-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 (Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов, № 669, 2004 г.), стерилизатор паровой ГК-10-1 (Тюмень-медико, № 1089); облучатели ультрафиолетовые УГД-2, УГД-3.

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении скрининга, направленного на поиск деструкторов глифосата, необходима информация о том, какой элемент из состава гербицида они способны потреблять. Молекула глифосата содержит биогенные элементы – азот, углерод и фосфор. По литературным данным [3, 4, 33] эффективность процесса детоксикации будет существенно зависеть от способности бактерий использовать глифосат в качестве источника фосфора для метаболизма.

Коллекционные штаммы *Pseudomonas* spp. протестированы в отношении утилизации глифосата как единственного источника углерода. Установлено, что *Pseudomonas* spp. не способны использовать глифосат как единственный источник

углерода [34]. Анализ литературы подтверждает, что утилизировать глифосат как источник углерод способны очень немногочисленные штаммы [3].

**Изучение способности фосфатрастворяющих ризобактерий утилизировать гербицид глифосат в качестве единственного источника азота.** При проведении скрининга штаммов *Pseudomonas* spp. основным оценочным критерием служила активность роста бактериальных культур в жидкой минеральной среде Дворкина-Фостера с разными источниками азота: контроль без азота ( $N_0$ ), сульфат аммония ( $N_{(NH_4)_2SO_4}$ ) и глифосат (Нгф). Активность роста ризобактерий определяли по показателям оптической плотности бактериальных суспензий (OD при  $\lambda = 590$  нм). Оптическая плотность бактериальной суспензии на начальном этапе роста (экспоненциальная фаза) пропорциональна плотности популяции тестируемых бактерий.

Представлены результаты скрининга ризобактерий *Pseudomonas* spp. из нашей исследовательской коллекции. Анализ экспериментально установленных зависимостей активности роста ризобактерий от источника азота в минеральной среде Дворкина-Фостера однозначно свидетельствует, что коллекционные *Pseudomonas* spp. практически не используют глифосат как единственный источник азота для собственного метаболизма (табл.).

На предыдущих этапах скрининга выполнено тестирование *Pseudomonas* spp. в отношении потребления фосфора из молекулы гербицида. Установлено, что все коллекционные штаммы фосфатрастворяющих бактерий способны использовать глифосат как единственный источник фосфора с разной интенсивностью [34]. Установленный факт использования фосфора из молекулы глифосата служит хорошим прогнозным признаком, позволяющим предполагать наличие в биохимическом арсенале исследуемых бактерий С–Р лиазной активности. В последние годы появляется все больше информации по функционированию С–Р лиазных мультиферментных систем у разных ГФ-утилизирующих бактерий, которая подтверждает высокую вероятность наличия С–Р лиазной активности у штаммов *Pseudomonas* spp., метаболизирующих глифосат как источник фосфора [35–38].

Процесс поиска эффективных деструкторов глифосата осложняется из-за штаммовой специфичности. Способность к расщеплению фосфоновой связи С–Р в молекуле глифосата выявляется лишь у отдельных представителей среди бактерий одного рода [4, 6, 33]. По результатам генетических исследований даже при наличии полного набора генов, кодирующих С–Р лиазу, штамм не проявляет способности расщеплять фосфоновую связь в глифосате. Сейчас известно, что около 40 % расшифрованных бактериальных геномов содержат гены, кодирующие ферменты катаболизма органических фосфонатов, однако способность утилизировать ГФ как источник фосфора описана лишь для отдельных штаммов [3, 6, 33, 37].

Штаммовая специфичность связана с различием путей метаболизма глифосата у разных микробных деструкторов. Вопросы путей метаболизма должны рассматриваться и решаться конкретно для каждого отдельного штамма-деструктора [4]. Например, штамм *Pseudomonas* sp. PG2982 расщепляет глифосат на саркозин и неорганический фосфат [3, 38], штамм *Pseudomonas* sp. LBr – на аминометилфосфоновую кислоту (АМФК) и глицин [3, 35]. Некоторые С–Р лиазы отличаются высокой специфичностью: одни специфичны только в отношении глифосата, другие – только в отношении аминометилфосфоновой кислоты. Целевыми объектами могут быть только штаммы-деструкторы, способные обеспечить безопасную детоксикацию глифосата с образованием экологически приемлемых конечных продуктов метаболизма.

Показатели активности роста *Pseudomonas* spp. в жидкой среде Дворкина-Фостера с разными источниками азота

Штамм	Вариант	OD 590							
		исх.	0,3 сут.	1 сут.	2 сут.	3 сут.	4 сут.	7 сут.	9 сут.
P-1	N <sub>0</sub>	0,010	0,016	0,058	0,073	0,078	0,078	0,083	0,088
	N <sub>гф</sub>		0,013	0,028	0,028	0,053	0,053	0,067	0,078
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,015	0,063	0,082	0,088	0,092	0,092	0,092
P-6	N <sub>0</sub>	0,010	0,014	0,023	0,028	0,038	0,052	0,051	0,055
	N <sub>гф</sub>		0,013	0,020	0,030	0,040	0,040	0,047	0,049
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,015	0,015	0,033	0,043	0,065	0,065	0,073
P-7	N <sub>0</sub>	0,012	0,014	0,039	0,048	0,053	0,052	0,062	0,065
	N <sub>гф</sub>		0,013	0,030	0,048	0,050	0,052	0,052	0,050
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,014	0,042	0,056	0,068	0,066	0,070	0,073
P-9	N <sub>0</sub>	0,005	0,010	0,027	0,027	0,029	0,033	0,043	0,046
	N <sub>гф</sub>		0,005	0,032	0,035	0,037	0,037	0,049	0,054
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,012	0,030	0,044	0,052	0,056	0,058	0,065
P-10	N <sub>0</sub>	0,040	0,054	0,063	0,085	0,088	0,089	0,095	0,095
	N <sub>гф</sub>		0,053	0,062	0,088	0,100	0,103	0,113	0,113
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,055	0,073	0,095	0,098	0,096	0,092	0,106
P-11	N <sub>0</sub>	0,025	0,034	0,068	0,068	0,073	0,067	0,077	0,080
	N <sub>гф</sub>		0,022	0,054	0,068	0,078	0,080	0,081	0,088
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,030	0,075	0,078	0,083	0,082	0,083	0,090
P-12	N <sub>0</sub>	0,010	0,010	0,020	0,022	0,023	0,026	0,047	0,055
	N <sub>гф</sub>		0,010	0,037	0,043	0,053	0,054	0,054	0,060
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,010	0,029	0,033	0,036	0,042	0,053	0,063
P-15	N <sub>0</sub>	0,005	0,005	0,029	0,050	0,056	0,056	0,067	0,065
	N <sub>гф</sub>		0,005	0,020	0,043	0,048	0,048	0,060	0,062
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,008	0,035	0,044	0,056	0,072	0,077	0,075
P-16	N <sub>0</sub>	0,010	0,012	0,024	0,026	0,030	0,036	0,053	0,051
	N <sub>гф</sub>		0,009	0,038	0,040	0,050	0,050	0,053	0,058
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,015	0,035	0,039	0,042	0,054	0,057	0,065
P-19	N <sub>0</sub>	0,080	0,083	0,083	0,083	0,095	0,091	0,090	0,095
	N <sub>гф</sub>		0,098	0,113	0,123	0,143	0,150	0,151	0,148
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,088	0,096	0,128	0,144	0,146	0,148	0,148
P-21	N <sub>0</sub>	0,110	0,114	0,125	0,143	0,140	0,142	0,143	0,141
	N <sub>гф</sub>		0,121	0,131	0,145	0,148	0,147	0,148	0,148
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,120	0,140	0,162	0,168	0,170	0,172	0,180
P-25	N <sub>0</sub>	0,030	0,068	0,071	0,073	0,080	0,083	0,094	0,094
	N <sub>гф</sub>		0,029	0,052	0,068	0,072	0,074	0,073	0,087
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,060	0,080	0,088	0,086	0,098	0,112	0,120
P-28	N <sub>0</sub>	0,060	0,095	0,100	0,105	0,108	0,129	0,130	0,135
	N <sub>гф</sub>		0,058	0,062	0,103	0,113	0,133	0,141	0,137
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,090	0,115	0,123	0,128	0,133	0,136	0,144
P-42	N <sub>0</sub>	0,015	0,018	0,047	0,049	0,058	0,063	0,074	0,073
	N <sub>гф</sub>		0,019	0,049	0,053	0,060	0,069	0,069	0,071
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,022	0,054	0,088	0,090	0,087	0,092	0,090
P-54	N <sub>0</sub>	0,060	0,068	0,089	0,087	0,095	0,093	0,103	0,107
	N <sub>гф</sub>		0,068	0,113	0,118	0,119	0,125	0,128	0,125
	N <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub>		0,095	0,137	0,149	0,154	0,159	0,159	0,162

К настоящему времени деструкторы глифосата обнаружены как среди грамотрицательных, так и среди грамположительных бактерий, хотя гены, кодирующие С–Р лиазы, чаще обнаруживаются у грамотрицательных бактерий [4, 33]. По данным Кононовой С. В., Несмеяновой М. А. [4], а также Свиридова А. В., Шушковой Т. В. с соавторами [33] глифосат-утилизирующие бактерии были выделены как из загрязненных, так и из незагрязненных гербицидом почв. Это позволяет предполагать, что способность разрывать ковалентную С–Р связь и разлагать органические фосфонаты является эволюционной. Существует множество природных органических фосфонатов (структурные компоненты клеток, формы запасаения фосфора, биоактивные вторичные метаболиты), механизм утилизации которых эволюционно отработан.

Исследования по этим вопросам находятся в начальной фазе во всех развитых странах, имеется множество нерешенных вопросов. Поэтому пока не разработаны коммерческие препараты для безопасной детоксикации глифосата. Хотя некоторые штаммы-деструкторы испытаны в полевых условиях. А некоторые штаммы, показавшие в *in vitro* условиях высокую активность, в полевых условиях оказались неэффективными. Это указывает на необходимость тщательного изучения свойств каждого отдельного штамма ГФ-утилизирующих бактерий [4, 33].

**Изучение активности роста *Pseudomonas* spp. в жидкой среде Дворкина-Фостера с глифосатом в качестве единственного источника фосфора.** В задачи исследований входило выполнение серии *in vitro* экспериментов по культивированию фосфатрастворяющих *Pseudomonas* spp. и количественная оценка активности их роста при условии повышения содержания глифосата в питательной среде. Для изучения активности роста наиболее адекватно культивирование ризосферных бактерий в жидкой питательной среде Дворкина-Фостера [41]. Это позволяет количественно оценивать их рост в присутствии глифосата и отбирать наиболее эффективные штаммы-деструкторы. Для оптимизации процесса культивирования ризобактерий *Pseudomonas* spp. стандартный состав среды Дворкина-Фостера был нами модифицирован за счет увеличения концентрации источника углерода.

На основании экспериментальных данных по мониторингу роста установлены зависимости плотности популяций фосфатрастворяющих *Pseudomonas* spp. от концентрации глифосата в среде Дворкина-Фостера. Критерием активности роста ризобактерий служили показатели оптической плотности ( $OD_{500}$ ) инкубационных смесей, которые регистрировали каждые 24–48 часов.

Для удобства выполнения исследований 15 штаммов фосфатрастворяющих бактерий *Pseudomonas* spp. из коллекционного фонда были сгруппированы по принципу близости свойств и активности роста в присутствии глифосата как единственного источника фосфора.

В первую группу ризобактерий вошли перспективные представители *Pseudomonas* spp., показавшие наиболее активный рост в *in vitro* эксперименте при первых двух концентрациях глифосата (0,20 и 0,60 мкг/мл): *Pseudomonas* sp. P-42, *Pseudomonas* sp. P-7, *Pseudomonas* sp. P-6, *Pseudomonas* sp. P-15 и *Pseudomonas* sp. P-11 (рис. 1). При концентрации 1,00 мкг/мл глифосата в жидкой среде отмечается замедление роста и снижение плотности популяций для большинства штаммов этой группы. Наибольшую плотность популяции при концентрации ГФ на уровне 1,00 мкг/мл формировал штамм *Pseudomonas* sp. P-42, который на текущем этапе

скрининга рассматривается как наиболее перспективный. При концентрации 3,0 мкг/мл глифосата в жидкой среде отмечается существенное ингибирование роста протестированных ризобактерий (рис. 1).

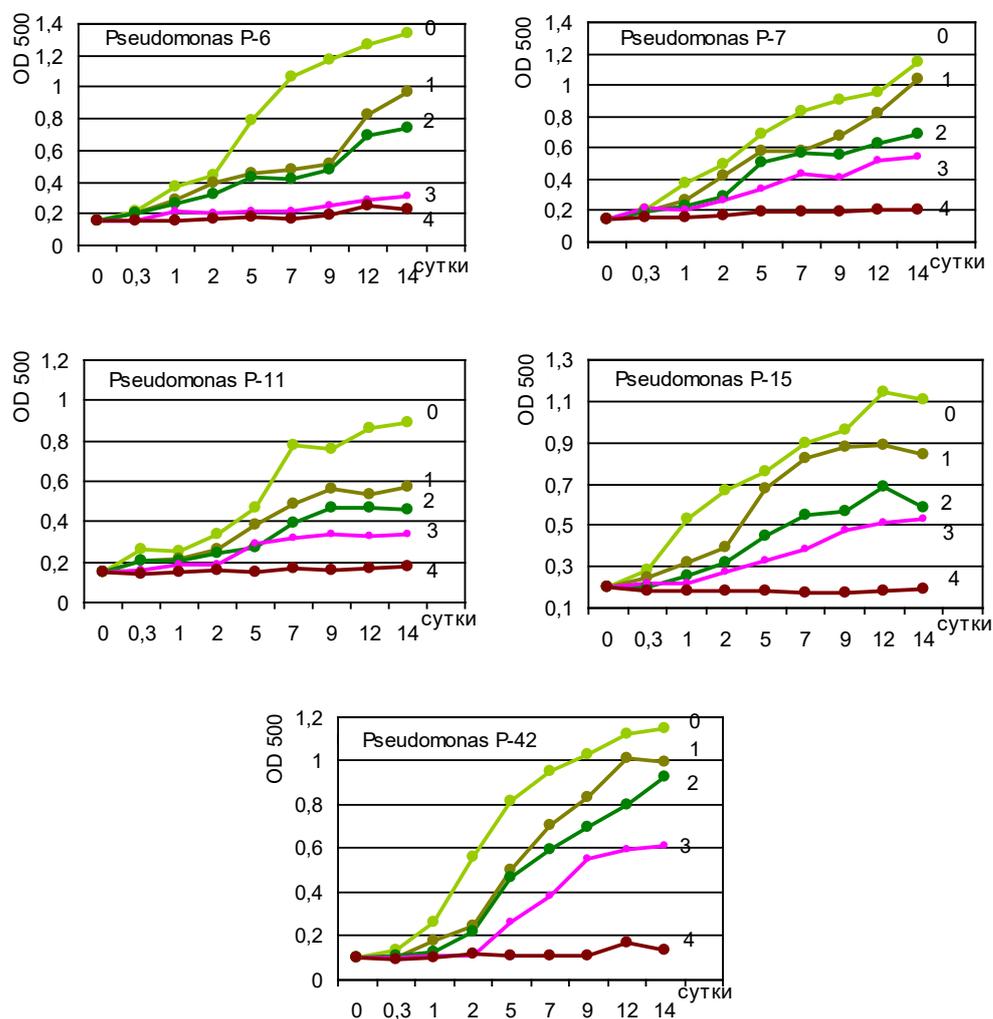


Рис. 1. Зависимости активности роста *Pseudomonas* spp. (P-6, P-7, P-11, P-15, P-42) от концентрации глифосата в жидкой среде Дворкина-Фостера: 0 – контроль без ГФ; 1 – 0,20; 2 – 0,60; 3 – 1,0; 4 – 3,0 мкг ГФ/мл

Для второй группы фосфатрастворяющих бактерий более активный рост также наблюдался в диапазоне концентраций глифосата от 0,2 до 0,6 мкг/мл в жидкой минеральной среде Дворкина-Фостера: *Pseudomonas* sp. P-1, *Pseudomonas* sp. P-9, *Pseudomonas* sp. P-16, *Pseudomonas* sp. P-12 и *Pseudomonas* sp. P-54. Однако плотность популяций перечисленных штаммов была ниже, чем для первой группы фосфатрастворяющих ризобактерий. Увеличение концентрации глифосата до

1,00 и тем более до 3 мкг/мл значительно снижало активность роста этой группы бактерий. По предварительным данным во второй группе в качестве перспективных целевых объектов можно рассматривать штаммы *Pseudomonas* sp. P-12 и *Pseudomonas* sp. P-16 (рис. 2).

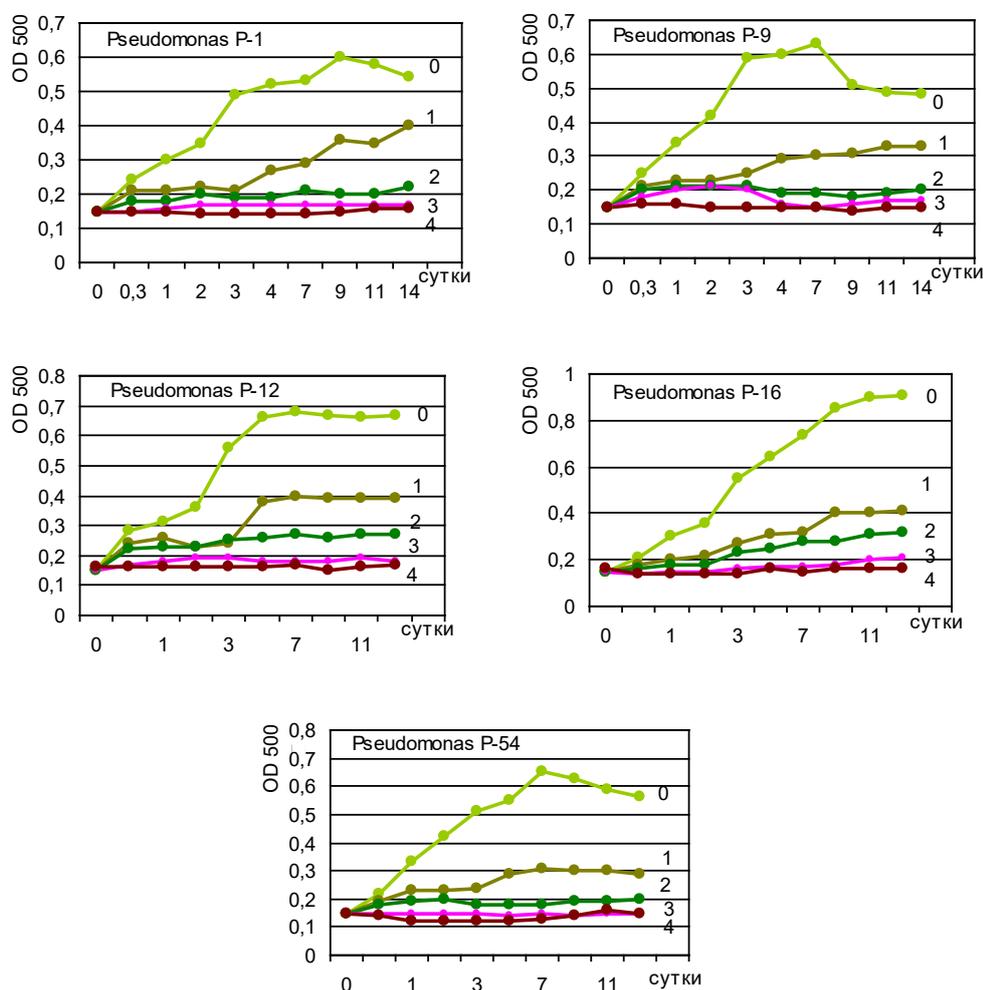


Рис. 2. Зависимости плотности популяций *Pseudomonas* spp. (P-1, P-9, P-12, P-16, P-54) от концентрации глифосата в жидкой среде Дворкина-Фостера: 0 – контроль без ГФ; 1 – 0,20; 2 – 0,60; 3 – 1,0; 4 – 3,0 мкг ГФ/мл

Следующая группа фосфатрастворяющих бактерий включала штаммы *Pseudomonas* sp. P-10, *Pseudomonas* sp. P-19, *Pseudomonas* sp. P-21, *Pseudomonas* sp. P-25 и *Pseudomonas* sp. P-28. Наиболее активный рост ризобактерий также отмечали в диапазоне концентраций от 0,2 до 0,6 мкг/мл глифосата в среде Дворкина-Фостера. По результатам количественного скрининга большая плотность популяции отмечена для штаммов: *Pseudomonas* sp. P-19, *Pseudomonas* sp. P-21

и *Pseudomonas* sp. P-25. Повышение концентрации глифосата в жидкой среде до 1,00 и 3,0 мкг/мл приводило к существенному торможению роста *Pseudomonas* sp. Результаты экспериментов показывают, что в этой группе бактерий наиболее перспективны для дальнейшего тестирования штаммы *Pseudomonas* sp. P-19, *Pseudomonas* sp. P-21 и *Pseudomonas* sp. P-25 (рис. 3).

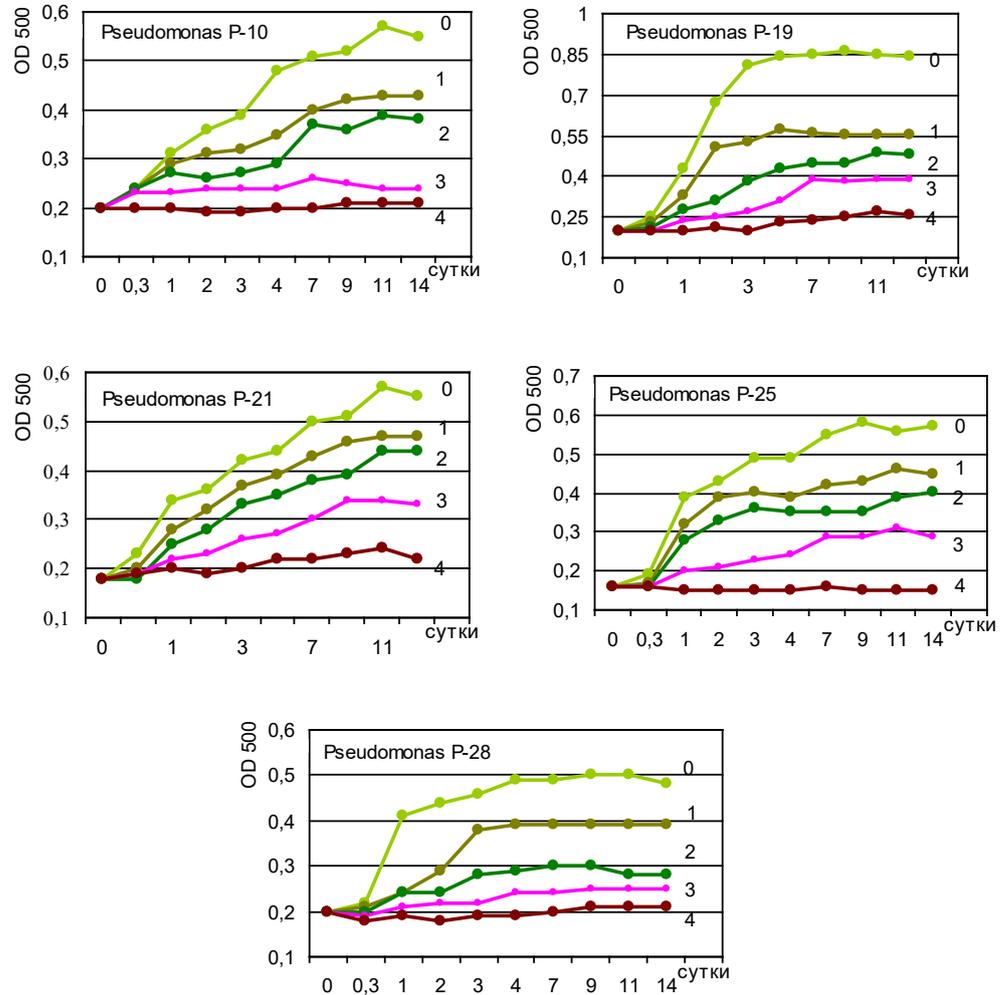


Рис. 3. Зависимости активности роста *Pseudomonas* spp. P-10, P-19, P-21, P-25 и P-28 в жидкой среде Дворкина-Фостера с глифосатом как источником фосфора: 0 – контроль без ГФ; 1– 0,20; 2 – 0,60; 3 – 1,0; 4 – 3,0 мкг ГФ/мл

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен количественный скрининг 15 штаммов фосфатрастворяющих *Pseudomonas* spp. из исследовательской коллекции ризосферных бактерий. По результатам серии экспериментов в жидкой минеральной среде Дворкина-Фостера проведена оценка активности их роста при возрастающей концентрации глифосата как единственного источника фосфора. Установлены общие для изученных ризобактерий закономерности – формирование наибольшей плотности популяций при концентрациях глифосата в диапазоне – 0,20–0,60 мкг/мл; снижение активности роста при повышении концентрации глифосата до 1,00 мкг/мл и значимый спад активности роста при увеличении концентрации ГФ до 3 мкг/мл. Среди протестированных штаммов наибольшая активность роста на глифосате отмечена для пяти штаммов (убывающий ряд): *Pseudomonas* sp. P-42, *Pseudomonas* sp. P-7, *Pseudomonas* sp. P-15, *Pseudomonas* sp. P-6 и *Pseudomonas* sp. P-11; средняя активность – *Pseudomonas* sp. P-19, *Pseudomonas* sp. P-21, *Pseudomonas* sp. P-25 и относительно невысокая активность роста *Pseudomonas* sp. P-10, *Pseudomonas* sp. P-28, *Pseudomonas* sp. P-16, *Pseudomonas* sp. P-12, *Pseudomonas* sp. P-1, *Pseudomonas* sp. P-9 и *Pseudomonas* sp. P-54. Проведен скрининг способности ризобактерий р. *Pseudomonas* утилизировать глифосат в качестве единственного источника азота. Сравнительная оценка активности роста в жидкой минеральной среде Дворкина-Фостера с разными источниками азота ( $N_0$ ,  $N_{(NH_4)_2SO_4}$  и глифосат) показала, что протестированные штаммы *Pseudomonas* spp. практически не используют глифосат в качестве единственного источника азота для метаболизма. Результаты поэтапного скрининга свидетельствуют, что все коллекционные штаммы *Pseudomonas* spp., метаболизируют глифосат только как источник фосфора, что делает их перспективными целевыми объектами для детоксикации этого гербицида.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carlisle, S. M. Glyphosate in the Environment / S. M. Carlisle, J. T. Trevors // Water, Air and Soil Poll. – 1988. – Vol. 39. – P.409–420.
2. 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.
3. Zhan, H. Recent advances in glyphosate biodegradation / H. Zhan [et al.] // Applied Microbiol. Biotech. – 2018. – Vol. 102. – P. 5033–5043.
4. Кононова, С. В. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами / С. В. Кононова, М. А. Несмеянова // Биохимия. – 2002. – Т. 67. – Вып. 2. – С. 220–233.
5. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate / A. H. C. Van Bruggen [et al.] // Science of The Total Environment. – 2018. – Vol. 6. – P. 255–268.
6. Glyphosate: safety risks, biodegradation, and bioremediation / A. Sviridov [et al.] // Current environmental issues and challenges. – 2014. – Springer, Dordrecht. – P. 183–195.
7. Lupi, L. 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.
8. Battaglin, W. A. Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation / W. A. Battaglin,

- M. T. Meyer, K. M. Kuivila // J. Amer. Water Res. Assoc. – 2014. – Vol. 50(2).
9. Glyphosate dispersion, degradation, and aquifer (водоносный) contamination in vineyards and wheat fields in the Po Valley, Italy / D. Cecilia [et al.] // Water Research. – 2018. – Vol. 146(1). – P. 37–54.
  10. Glyphosate and AMPA in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO. – 2005. – 10 p.
  11. *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.
  12. *Vereecken, H.* Mobility and leaching of glyphosate: A review / H. Vereecken // Pest Management Science. – 2005. – Vol. 61(12). – P. 1139–1151.
  13. Leaching of glyphosate and aminomethylphosphonic acid from an agricultural field over a twelve-year period / T. Norgaard [et. al] // Vadose Zone J. – 2014. – Vol. 13(10). – P. 1–18.
  14. *Mercurio, P.* Glyphosate persistence in seawater / P. Mercurio [et al.] // Mar Pollut Bull. – 2014. – Vol. 85(2). – P. 385–390.
  15. *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.
  16. Relevance of urban glyphosate use for surface water quality / I. Hanke [et al.] // Chemosphere. – 2010. – Vol. 81(3). – P. 422–429.
  17. *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.
  18. *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.
  19. *Шувалова, Н. Е.* Биотехнологические аспекты определения токсичности пестицидов на клеточных и организменных тест-системах: автореф. дис. / Н. Е. Шувалова. – Тверь, 2021.
  20. Detection of glyphosate residues in animals and humans / M. Krüger [et al.] // Journal of Environmental & Analytical Toxicology. – 2014. – Vol. 4. – P. 1–8.
  21. *Samsel, A.* Glyphosate Suppression of Cytochrom P 450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases / A. Samsel, S. Seneff. // Entropy. – 2013 – Vol. 15. – № 4. – P. 1416–1463.
  22. Glyphosate is an inhibitor of plant Cytochrome P 450: Functional expression of *thlaspi arvensae* cytochrome P45071b1/reductase fusion protein in *Escherichia coli* / D. C. Lamb [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1998. – Vol. 244. – P. 110–114.
  23. *Guilherme, S.* DNA and chromosomal damage induced in fish (*Anguilla anguilla* L.) by aminomethylphosphonic acid (AMPA) – the major environmental breakdown product of glyphosate. / S. Guilherme [et al.] // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2014. – Vol. 21(14). – P. 8730–8739.
  24. *Benachour, N.* Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells / N. Benachour, G. Seralin, // Chemical Research in Toxicology. – 2009. – Vol. 22. – P. 97–105.
  25. *Séralini, G.* Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase / G. Séralini, S. Moslemi // Molecular and Cellular Endocrinology. –

2018 – Vol. 178(1–2). – P. 117–131.

26. *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.

27. Glyphosate-Based Herbicides Are Toxic and Endocrine Disruptors in Human Cell Lines / C. Gasnier [et al.] // *Toxicology*. – 2009. – Vol. 262(3). – P. 184–191.

28. Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the agricultural health study / A. DeRoos [et al.] // *Environmental Health Perspectives*. – 2005. – Vol. 113. – P. 49–54.

29. Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations / M. Sihtmäe [et al.] // *Appl. Soil Ecol.* – 2013. – Vol. 72 – P. 215–224.

30. Acute and chronic toxicity of glyphosate compounds to glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoidea* (Unionidae) / R. B. Bringolf [et al.] // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2007. – Vol. 26. – P. 2094–2100.

31. Relyea, R. A. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians / R. A. Relyea // *Ecological applications*. – 2005. – Vol. 15. – P. 1118–1124.

32. *Gaupp-Berghausen, M.* Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations / M. Gaupp-Berghausen, M. Hofer, B. Rewald, J. G. Zaller // *Scientific reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 12886–12890.

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

34. Скрининг зональных изолятов *Pseudomonas* spp. по устойчивости к глифосату и способности утилизировать его как источник углерода и фосфора / Н. А. Михайловская [и др.] // *Почвоведение и агрохимия*. – 2021. – № 1(38). – С. 225–231.

35. Metabolism of Glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain Lbr. / G. S. Jacob [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – Vol. 54(12). – P. 2953–2958.

36. *White, A. K.* Two C–P lyase operons in *Pseudomonas stutzeri* and their roles in the oxidation of phosphonates, phosphate and hypophosphite / A. K. White, W. W. Metcalf // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186. – P. 4730–4739.

37. *Kishore, G. M.* Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine intermediate / G. M. Kishore, G. S. Jacob // *J. Biol. Chem.* – 1987. – Vol. 262(25). – P. 12164–12168.

38. *Dick, R. E.* Control of glyphosate uptake and metabolism in *Pseudomonas* sp. 4ASW / R. E. Dick, J. P. // *Quinn FEMS Microbiology Letters*. – 1995. – Vol. 134. – P. 177–182.

39. Glyphosate toxicity and the effects of long term vegetation control on soil microbial communities / M. Busse [et al.] // *Soil Biol. Biochem.* – 2001. – Vol. 33. – P. 1777–1789.

40. Активность фосфатмобилизации у ризобактерий / Н. А. Михайловская [и др.] // *Почвоведение и агрохимия*. – 2007. – № 1(38). – С. 225–231.

41. Dworkin, M. Experiments with some microorganisms which utilized methane and hydrogen / M. Dworkin, J. W. Foster // *J. Bacteriol.* – 1958. – Vol. 75. – P. 592–603.

**SCREENING OF PHOSPHORUS SOLUBILIZING BACTERIA  
*PSEUDOMONAS* SPP. CULTURAL GROWTH ACTIVITY  
IN DEPENDENCE ON GLYPHOSATE CONTENT IN LIQUID  
DWORKIN-FOSTER MEDIUM**

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

**Summary**

Screening of 15 strains of phosphorus solubilizing rhizobacteria *Pseudomonas* spp. by cultivation in liquid Dworkin-Foster medium with glyphosate as phosphorus source showed common dependence of bacteria growth on concentration of glyphosate. High population density was observed in diapason of 0,20–0,60 µkr of glyphosate per ml of medium, the increase of glyphosate concentration resulted in the significant reduction of population densities. Screening showed that phosphorus solubilizing rhizobacteria *Pseudomonas* spp. virtually not capable of glyphosate utilization as a sole nitrogen source for metabolism.

*Поступила 28.04.23*