

## ВЛИЯНИЕ ГЛИФОСАТ-УТИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM* SP. И *RHIZOBIUM* SP. НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС РАСТЕНИЙ ПРИ РАЗНОМ СОДЕРЖАНИИ ГЕРБИЦИДА В ПОЧВЕ

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

Институт почвоведения и агрохимии,  
г. Минск, Беларусь

### ВВЕДЕНИЕ

Ассоциативные азотфиксирующие бактерии *Azospirillum* sp. и симбиотические *Rhizobium* sp. из фонда исследовательской коллекции Института почвоведения и агрохимии проявляют активность в отношении утилизации глифосата [1]. Хорошо известно также, что *Azospirillum* spp. [2–4] и *Rhizobium* spp. [5, 6, 7], способны оказывать на инокулированные растения значительное стимулирующее действие, которое проявляется в формировании более развитой корневой системы [8, 9] за счет экскреции фитогормонов [10–13]. К стимулирующим факторам относится способность представителей *Azospirillum* sp. [14] и *Rhizobium* sp. [15, 16] растворять трехзамещенные фосфаты кальция и обеспечивать соответствующее улучшение фосфатного питания в ризосфере инокулированных растений.

Перспективность применения *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp. в качестве инокулянтов обусловлена комплексом их полезных свойств. *Azospirillum* spp. отличаются разносторонним приспособительным метаболизмом углерода и азота, они способны осуществлять все реакции цикла азота, кроме нитрификации. Источниками азота для *Azospirillum* spp. могут служить атмосферный азот, аммоний, нитраты и нитриты [12, 17], что в значительной мере способствует их адаптации и приживаемости в конкурентных условиях ризосферы.

Значимым фактором в условиях ризосферы является подвижность микроорганизмов. Более подвижные бактерии получают преимущества по сравнению с менее подвижными для достижения оптимальной экологической ниши. Представители *Azospirillum* spp., отличаются высокой подвижностью. При этом *Azospirillum brasilense* характеризуются повышенной подвижностью за счет наличия одной полярной флагеллы, используемой для движения в жидких средах и дополнительных латеральных флагелл для движения в более плотных средах [18–20]. В классических работах Bashan Y. экспериментально доказана миграция *A. brasilense* к корням проростков пшеницы и установлена ее зависимость от почвенной влаги [20].

Симбиотические diaзотрофы *Rhizobium* sp., сохраняемые в исследовательской коллекции Института почвоведения и агрохимии, также способны метаболизировать гербицид глифосат [1] и характеризуются комплексом полезных свойств. Наряду с высокой активностью азотфиксации [5], *Rhizobium* sp. оказывают значительное гормональное воздействие на растения [21, 22], эффективно растворяют трехзамещенные фосфаты кальция [15, 16], обеспечивая физиологические количества

подвижного фосфора в ризосфере инокулированных растений, что положительно воздействует на их продуктивный статус.

Полифункциональность ризобактерий *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp. свидетельствует об их перспективности в качестве инокулянтов, в особенности в условиях интенсивного применения глифосата. В связи с этим актуально изучение их влияния на физиологический статус растений в широком диапазоне содержания гербицида в почве.

Цель исследований – изучение влияния глифосат-утилизирующих бактерий *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp. на физиологический статус растений в зависимости от содержания гербицида в почве.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследований – ризосферные азотфиксирующие бактерии из фонда исследовательской коллекции Института почвоведения и агрохимии: ассоциативные *Azospirillum brasilense* (штаммы *Azospirillum brasilense* 2(в)3, *Azospirillum brasilense* Д-П1, *Azospirillum brasilense* 1') и клубеньковые *Rhizobium trifolii* (*Rhizobium trifolii* R-45, *Rhizobium trifolii* R-107, *Rhizobium trifolii* R-63/3). Исследования проведены путем постановки серии инокуляционных *in vitro* экспериментов.

**Методика инокуляционных *in vitro* экспериментов по оценке влияния глифосата на PGP-потенциал ризобактерий *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp.** Эксперименты проведены в чашках Петри, тест-культура – яровая пшеница (семена). Поверхностно стерилизованные семена (10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 мин.) выдерживали в растворах глифосата (0,20 мг/мл (C<sub>1</sub>) и 1,00 мг/мл (C<sub>2</sub>)), просушивали стерильной фильтровальной бумагой. Семена тест-культуры инокулировали суспензиями тестируемых ризобактерий. Длительность экспозиции семян в растворах гербицида – 2 часа, экспозиции семян в бактериальных суспензиях (инокуляция) – также 2 часа. Обработанные семена раскладывали в чашки Петри (по 10 семян в каждую) на фильтровальную бумагу, увлажненную стерильной водопроводной водой (4 мл). Чашки Петри помещали в термостат на 4–5 суток при температуре 28 °С.

Бактериальные суспензии готовили путем смыва двухсуточных культур бактерий, выращенных на плотных питательных средах. Титры: 5,0–5,5·10<sup>7</sup> КОЕ/мл (OD<sub>650</sub> 0,700–0,750; UV/VISS-8001). Контроль – семена тест-культуры, выдержанные 2 часа в дистиллированной воде (C<sub>0</sub>) и обработанные растворами гербицида (C<sub>1</sub> и C<sub>2</sub>) без инокуляции бактериальными суспензиями. Повторность в опытах пятикратная.

В ходе экспериментов на 2-е сутки определяли всхожесть семян пшеницы, на 4–5 сутки – длину надземной части (колеоптиле) и суммарную длину корней проростков.

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.

**Методика модельных инокуляционных экспериментов с тест-культурами в искусственно контролируемых условиях** (почвенный микрокосм). Модельные эксперименты включали культивирование тест-культуры (семена инокулировали ГФ-утилизирующими бактериями *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp.) в почве с широким диапазоном содержания гербицида глифосат. В экспериментах использована дерново-подзолистая супесчаная почва, в которой искусственно созданы

следующие уровни содержания глифосата:  $C_0$  (без глифосата),  $C_1$ ,  $C_2$  и  $C_3$ . Для создания концентраций  $C_1$ ,  $C_2$  и  $C_3$  в почву вносили водные растворы гербицида Торнадо: 2,30 мг ГФ/кг, 7,70 мг ГФ/кг и 38,50 мг ГФ/кг почвы. Концентрации  $C_1$  и  $C_2$  соответствуют следующим нормам внесения гербицида: 3,0 л/га и 10 л/га. Концентрация  $C_3$  соответствует пятикратному превышению максимальной дозы 50 л/га при условии пересчета на слой пахотного горизонта 0–5 см. Внесение гербицида в почву проведено за 7 дней до посева семян тест-культуры. Длительность эксперимента – 2,5 месяца, повторность – четырехкратная.

В модельном эксперименте в качестве тест-культуры использовали горох посевной *Pisum sativum* L. сорта Миллениум. Опыт проведен по схеме: 1. Контроль; 2. *Azospirillum brasilense* (2(в)3); 3. *Azospirillum brasilense* Дп1; 4. *Rhizobium trifolii* R-45. В сосуды ( $\varnothing$  9 см,  $h$  = 11 см, объем почвы 500 г) высевали по 5 семян гороха, поверхностно стерилизованных (10 % раствор  $H_2O_2$ , 30 мин.) и инокулированных суспензиями соответствующих бактерий. Контроль – семена без инокуляции. Инокулянты приготовлены путем смыва двухсуточных культур, выращенных на плотной питательной среде. Титры бактериальных суспензий для обработки семян составили  $8,5\text{--}9,0 \cdot 10^7$  КОЕ/мл.

#### **Оценка влияния глифосата на фотосинтетический потенциал растений.**

Фотосинтетические показатели тест-культуры изучали в течение 2-х месяцев (от посева семян до уборки). Фотосинтетическую активность гороха посевного оценивали по следующим показателям: динамика роста, биомасса надземной части растений по общепринятым методикам [23], площадь листовой поверхности методом измерений [24] с определением поправочного коэффициента ( $K = 0,85$ ) и методом сканирования с использованием компьютерной программы LeafSizeMeter. Содержание хлорофиллов в листьях определяли по методу Г. С. Посыпанова [25]. По окончании эксперимента определены сырая и сухая масса корней растений гороха.

**Методика определения содержания хлорофилла в листьях.** В соответствии с методом Г. С. Посыпанова [25] навеску листьев (0,2 г) растирали в фарфоровой ступке с добавлением отмытого речного песка, к полученной массе приливали 4–5 мл этилового спирта и продолжали растирание в течение нескольких минут. После отстаивания раствор фильтровали в мерную колбу объемом 25 мл. Полученный фильтрат доводили до метки этиловым спиртом и определяли оптическую плотность экстрактов на спектрофотометре Metertech UV/VIS SP 8001.

Для стерилизации химических реактивов и посуды используются стерилизатор паровой ГК-100-3, стерилизатор паровой ГК-10-1, облучатели ультрафиолетовые УГД-2, УГД-3. Для культивирования бактерий и приготовления бактериальных суспензий используются: термостат ТПС-1, шейкер орбитальный KS-501 digital IKA WERKE (GmbH & Co.KG), перемешивающее устройство ЛАБ-ПУ-01.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Общеизвестно, что основной механизм воздействия глифосата (ГФ) на нежелательные растения – ингибирование фермента (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS) шикиматного пути биосинтеза ароматических аминокислот [26]. Глифосат нарушает биосинтез жизненно важных аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан), что в свою очередь приводит к нарушению биосинтеза белка.

Глифосат – единственный гербицид, действующий по механизму ингибирования биосинтеза циклических ароматических аминокислот и белка. Для абсолютного большинства гербицидов основной мишенью являются процессы фотосинтеза в растениях.

Однако к настоящему времени накоплено достаточно научной информации, подтверждающей действие глифосата на фотосинтетическую активность растений. Опубликован ряд исследований, свидетельствующих, что гибель растений может быть обусловлена разными механизмами действия глифосата на их физиологические процессы. В соответствии с современными данными под влиянием глифосата часто отмечается ингибирование биосинтеза хлорофиллов, каротиноидов, жирных кислот и снижения их содержания в растениях [6, 7, 27–29].

Много внимания в научной литературе уделяется вопросам глифосат-индуцированного окислительного стресса, который считается вторичным эффектом блокирования шикиматного пути биосинтеза белка. Применение глифосата может вызывать негативные изменения в функционировании фотосинтетического аппарата, приводящие к снижению фотохимической активности и накоплению перекиси водорода  $H_2O_2$  [28, 29].

Сейчас известно, что некоторые растения способны метаболизировать глифосат до аминометилфосфоновой кислоты (АМФК), которая также рассматривается как фитотоксин. Совместное присутствие ГФ и АМФК может существенно модифицировать действие гербицида на физиологию растений [29, 30]. Влияние АМФК и совместного действия ГФ и АМФК значительно менее исследовано.

По данным Yappissagi применение глифосата может приводить к снижению устьичной проводимости [31]. Исследования Сактак свидетельствуют о способности глифосата вызывать нарушения питания растений [32].

Анализ современных литературных данных показывает, что глифосат оказывает влияние на разные физиологические процессы в растениях. В связи с этим актуально изучение влияния ГФ-утилизирующих ризобактерий на рост, развитие и показатели фотосинтетической активности растений, а также оценка их антистрессового действия в зависимости от содержания гербицида в почве.

**Влияние *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp. на всхожесть семян и развитие проростков пшеницы в зависимости от содержания глифосата в почве.** В ходе *in vitro* экспериментов RGP-потенциал (стимулирующий потенциал) глифосат-утилизирующих бактерий оценивали по показателям всхожести семян тест-культуры, а также по развитию проростков: длине корней и coleoptиле. На контрольном варианте четко прослеживается негативное действие концентрации глифосата в почве на всхожесть, длину корней и coleoptиле тест-культуры. Стрессовое действие глифосата усиливается при увеличении концентрации гербицида в почве (табл. 1).

Результаты тестирования 3-х штаммов ассоциативных diaзотрофов *Azospirillum* sp. и 2-х штаммов симбиотических *Rhizobium* sp. показали, что ассоциативные азотфиксаторы *Azospirillum* sp. 1', *Azospirillum* sp. Дп1 и *Azospirillum* sp. 2(в)3 оказывают более значимое стимулирующее и антистрессовое действие по сравнению с клубеньковыми бактериями *Rhizobium* sp. Под действием штаммов *Azospirillum* sp. всхожесть семян пшеницы повышалась на 3,3–16,7 %, длина coleoptиле – на 0,08–0,67 см и суммарная длина корней проростка – на 1,26–2,31 см в зависимости от содержания глифосата в почве (табл. 1).

Таблица 1

**Влияние *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp. на всхожесть семян и развитие проростков пшеницы в зависимости от содержания глифосата в почве (*in vitro*, 2023 г.)**

Вариант	Всхожесть, %			Длина coleoptиле, см			Суммарная длина корней проростка, см		
	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>
Контроль	86,7	83,3	70,0	2,98	2,68	1,66	10,76	9,21	6,13
<i>Rhizobium</i> sp. R-45	83,3	83,3	75,0	3,07	2,87	1,95	12,35	10,80	6,59
<i>Rhizobium</i> sp. R-63/3	85,0	76,7	66,7	3,36	2,79	1,76	11,06	9,54	5,97
<i>Azospirillum</i> sp. 1'	90,0	86,7	77,0	3,40	2,76	1,83	11,37	9,46	6,25
<i>Azospirillum</i> sp. Дп1	90,0	86,7	76,7	3,76	2,93	2,06	12,86	10,16	7,45
<i>Azospirillum</i> sp. 2(в)3	93,3	90,0	86,7	3,65	3,06	2,21	13,07	10,83	7,39
C <sub>ГФ</sub> : C <sub>0</sub> – 0 мкг/мл C <sub>1</sub> – 0,2 мкг/мл C <sub>2</sub> – 1,0 мкг/мл									
НСП <sub>0,95</sub> Фактор А (C <sub>ГФ</sub> )	7,42			0,28			0,47		
Фактор В (инокуляция)	8,64			0,36			0,61		

**Влияние ГФ-утилизирующих бактерий *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp. на показатели активности фотосинтеза в зависимости от содержания глифосата в почве.** В модельных инокуляционных экспериментах в искусственно контролируемых условиях получены экспериментальные данные по влиянию азотфиксирующих бактерий на динамику линейного роста тест-культуры гороха Миллениум в зависимости от концентрации глифосата в почве. На фоне без глифосата, а также на фонах C<sub>1</sub> (3,0 л/га), C<sub>2</sub> (10 л/га) и C<sub>3</sub> (50 л/га) наиболее заметное антистрессовое и стимулирующее воздействие на высоту растений тест-культуры гороха оказали штаммы *A. brasilense* 2(в)3 и *Rh. trifolii* R-45 (табл. 2, рис. 1, 2). Отмечено усиление антистрессового действия приема инокуляции диазотрофами *A. brasilense* 2(в)3 и *Rh. trifolii* R-45 при повышении содержания глифосата в почве.



Рис. 1. Фон C<sub>0</sub> (4 сосуда слева: 1 – контроль; 2 – *A. brasilense* 2(в)3; 3 – *A. brasilense* Дп1; 4 – *Rh. trifolii* R-45). Фон C<sub>2</sub> (4 сосуда справа: 1 – контроль; 2 – *A. brasilense* 2(в)3; 3 – *A. brasilense* Дп1; 4 – *Rh. trifolii* R-45)



Рис. 2. Фон  $C_0$  (4 сосуда слева: 1 – контроль; 2 – *A. brasilense* 2(в)3; 3– *A. brasilense* Дп1; 4 – *Rh. trifolii* R-45). Фон  $C_3$  (4 сосуда справа: 1 – контроль; 2 – *A. brasilense* 2(в)3; 3 – *A. brasilense* Дп1; 4 – *Rh. trifolii* R-45)

Таблица 2

**Влияние *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp. на динамику линейного роста гороха Миллениум в зависимости от содержания глифосата в почве**

$C_{ГФ}$	Инокуляция	Высота растений, см							
		14.03.23		27.03.23		06.04.23		21.04.23	
		см	% *	см	%*	см	% *	см	%*
$C_0$	Без инокуляции	9,69	100	18,17	100	26,07	100	34,16	100
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	10,64	110	19,78	109	30,18	116	36,09	106
	<i>A. brasilense</i> Дп1	9,52	98	19,12	105	28,15	108	35,25	103
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	9,63	99	19,39	107	27,43	105	35,80	105
$C_1$	Без инокуляции	9,23	100	17,56	100	25,28	100	33,62	100
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	9,79	106	17,75	101	25,80	102	35,44	105
	<i>A. brasilense</i> Дп1	9,48	103	17,83	102	25,54	101	33,98	101
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	9,50	103	16,34	93	26,60	105	36,98	110
$C_2$	Без инокуляции	9,00	100	17,23	100	24,19	100	32,85	100
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	9,75	108	18,15	105	25,38	105	34,12	104
	<i>A. brasilense</i> Дп1	8,50	94	19,46	113	25,11	104	34,66	106
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	9,59	107	19,87	115	28,16	116	35,98	110
$C_3$	Без инокуляции	7,66	100	15,15	100	22,14	100	30,46	100
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	8,11	106	17,29	114	24,43	110	34,39	113
	<i>A. brasilense</i> Дп1	8,38	109	17,87	118	22,37	101	33,72	111
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	10,20	133	17,13	113	24,55	111	32,93	108
НСР <sub>05</sub> Фактор А (инокуляция)		0,5		0,45		0,73		0,61	
Фактор В (доза ГФ)		0,5		0,45		0,73		0,61	

Примечание.  $C_0$  – без ГФ,  $C_1$  – 2,30 мг ГФ/кг (3,0 л/га),  $C_2$  – 7,70 мг ГФ/кг (10 л/га),  $C_3$  – 38,50 мг ГФ/кг (50 л/га). \*Действие по отношению к контролю.

Получены экспериментальные данные по влиянию ассоциативных и клубеньковых бактерий на массу надземной части и корней растений гороха Миллениум в зависимости от содержания гербицида в почве. Отмечено что штаммы diaзотрофов *A. brasilense* 2(в)3 и *Rh. trifolii* R-45 как на фонах без внесения глифосата, так и на фонах  $C_1$ ,  $C_2$  и  $C_3$  при возрастающих концентрациях гербицида в почве оказывали стимулирующий эффект на развитие корней и надземной части гороха, что подтверждает антистрессовое действие ризосферных бактерий в условиях загрязнения почвы гербицидом (табл. 3, рис. 3, 4).

Можно отметить, что на фоне  $C_0$  наибольшее влияние на сухую массу корней оказал штамм *A. brasilense* 2(в)3 (22 %), затем *Rh. trifolii* R-45 (17 %) и *A. brasilense* Дп1 (9 %). На фоне  $C_1$  наблюдается аналогичная закономерность, сухая масса корней повышалась на 22, 13 и 4 % соответственно. На фоне  $C_2$  лучшие показатели получены при инокуляции гороха *A. brasilense* Дп1 (15 %) и *Rh. trifolii* R-45 (15 %). На фоне  $C_3$  по эффективности выделяются ризобактерии *A. brasilense* 2(в)3 (22 %) и *Rh. trifolii* R-45 (17 %), а также усиливается стимулирующее действие *A. brasilense* Дп1 (17 %). В некоторых случаях прослеживается тенденция усиления антистрессового действия азотфиксирующих ризобактерий при повышении содержания глифосата в почве.

Таблица 3

**Влияние *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp. на массу надземной части и корней гороха Миллениум в зависимости от содержания глифосата в почве**

$C_{ГФ}$	Инокуляция	Масса надземной части				Масса корней растений			
		сырая масса		сухая масса		сырая масса		сухая масса	
		г	% *	г	% *	г	% *	г	% *
$C_0$	Без инокуляции	2,52	100	0,37	100	1,38	100	0,23	100
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	2,71	108	0,42	114	1,50	109	0,28	122
	<i>A. brasilense</i> Дп1	2,44	97	0,38	103	1,47	107	0,25	109
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	2,59	103	0,39	105	1,44	104	0,27	117
$C_1$	Без инокуляции	2,49	100	0,36	100	1,30	100	0,23	100
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	2,72	109	0,40	111	1,55	119	0,28	122
	<i>A. brasilense</i> Дп1	2,72	109	0,38	106	1,38	106	0,24	104
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	2,61	105	0,40	111	1,35	104	0,26	113
$C_2$	Без инокуляции	2,35	100	0,31	100	1,13	100	0,20	100
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	2,81	120	0,36	116	1,31	116	0,22	110
	<i>A. brasilense</i> Дп1	2,41	103	0,35	113	1,21	107	0,23	115
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	2,54	108	0,35	113	1,22	108	0,23	115
$C_3$	Без инокуляции	2,10	100	0,29	100	0,95	100	0,18	100
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	2,36	112	0,35	121	1,20	126	0,22	122
	<i>A. brasilense</i> Дп1	2,41	115	0,34	117	1,10	116	0,21	117
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	2,53	120	0,33	114	1,08	114	0,21	117
НСР <sub>05</sub> Фактор А (инокул.)		0,13		0,03		0,13		0,02	
Фактор В (доза ГФ)		0,13		0,03		0,13		0,02	

Примечание.  $C_0$  – без ГФ,  $C_1$  – 2,30 мг ГФ/кг (3,0 л/га),  $C_2$  – 7,70 мг ГФ/кг (10 л/га),  $C_3$  – 38,50 мг ГФ/кг (50 л/га). \*Действие по отношению к контролю.



Рис. 3. Модельный эксперимент, тест-культура горох Миллениум (2023 г.)



Рис. 4. Корневая система тест-культуры, горох Миллениум (2023 г.)

**Влияние азотфиксирующих бактерий на площадь листовой поверхности тест-культуры в зависимости от содержания глифосата в почве.** Площадь листовой поверхности – один из важнейших показателей активности фотосинтеза. Величина ассимиляционной поверхности растения – важнейший фактор и необходимое условие высокой продуктивности растений [25, 28]. Увеличение площади листовой поверхности свидетельствует об улучшении физиологического состояния растения.

Представлены экспериментальные данные по оценке площади листовой поверхности разными методами: путем измерений (произведение общей длины на максимальную ширину листа) и методом сканирования (табл. 4). Отмечена общая закономерность: прием инокуляции семян ассоциативными и симбиотическими diaзотрофами *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp. способствовал увеличению площади листовой поверхности растений гороха в широком диапазоне содержания глифосата в почве.

Установлена следующая зависимость: при повышении содержания глифосата в почве антистрессовое действие азотфиксирующих *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp. на площадь листовой поверхности постепенно ослабевало. На фоне  $C_0$  без внесения глифосата эффективность азотфиксирующих бактерий варьировала в пределах 7–30 % (4–24 %), на фоне  $C_1$  – в пределах 13–22 % (13–23 %), на фоне  $C_2$  – от 1 до 17 % (2–12 %) и на фоне  $C_3$  – от 7 до 11 % (11–15 %) (табл. 4).

Таблица 4

**Влияние *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp. на площадь листовой поверхности гороха Миллениум в зависимости от содержания ГФ в почве**

$C_{ГФ}$	Инокуляция	Площадь листовой поверхности			
		метод измерений ( $K = 0,85$ )		метод сканирования	
		см <sup>2</sup>	% *	см <sup>2</sup>	% *
$C_0$	Без инокуляции	65,27	100	64,17	100
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	71,85	110	70,28	109
	<i>A. brasilense</i> Дп1	67,88	104	68,46	107
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	80,97	124	83,73	130



Продолжение таблицы 4

С <sub>ГФ</sub>	Инокуляция	Площадь листовой поверхности			
		метод измерений (K = 0,85)		метод сканирования	
		см <sup>2</sup>	% *	см <sup>2</sup>	% *
С <sub>1</sub>	Без инокуляции	59,24	100	59,74	100
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	69,03	116	72,91	122
	<i>A. brasilense</i> Дп1	72,78	123	70,22	118
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	66,68	113	67,54	113
С <sub>2</sub>	Без инокуляции	58,92	100	61,80	100
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	65,09	110	72,39	117
	<i>A. brasilense</i> Дп1	65,77	112	63,64	103
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	59,95	102	62,48	101
С <sub>3</sub>	Без инокуляции	58,30	100	62,20	100
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	64,75	111	66,49	107
	<i>A. brasilense</i> Дп1	66,76	115	68,78	111
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	65,78	113	67,46	109
НСР <sub>05</sub> Фактор А (инокуляция)		3,10		2,04	
Фактор В (доза ГФ)		3,10		2,04	

Примечание. С<sub>0</sub> – без ГФ, С<sub>1</sub> – 2,30 мг ГФ/кг (3,0 л/га), С<sub>2</sub> – 7,70 мг ГФ/кг (10 л/га), С<sub>3</sub> – 38,50 мг ГФ/кг (50 л/га).

\*Действие по отношению к контролю.

### Влияние азотфиксирующих бактерий на содержание хлорофиллов в листьях гороха Миллениум в зависимости от концентрации глифосата в почве.

Хлорофиллы играют важнейшую роль в процессах фотосинтеза, их содержание считается объективным показателем физиологического статуса растения и его фотосинтетического потенциала [25, 27, 28]. Все высшие растения содержат хлорофиллы а и b. Содержание хлорофилла а обычно превышает содержание хлорофилл b.

Результаты экспериментов свидетельствуют о положительном действии азотфиксирующих ризобактерий *A. brasilense* 2(в)3, *A. brasilense* Дп1 и *Rh. trifolii* R-45 на активность процессов фотосинтеза в растениях гороха Миллениум (табл. 5). Прием инокуляции семян глифосат-утилизирующими diaзотрофами оказывает антистрессовое действие в широком диапазоне содержания глифосата в почве.

При анализе экспериментальных данных отмечена закономерность, проявляющаяся в снижении содержания разных форм хлорофилла (а, b и а + b) в листьях тест-культуры при повышении концентрации глифосата в почве от 0 до 10 л/га или до 50 л/га. Отмечена также закономерность антистрессового действия инокуляции семян ассоциативными и симбиотическими diaзотрофами *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp., который способствует повышению содержания разных форм хлорофилла в листьях гороха Миллениум в широком диапазоне содержания глифосата в почве.

Установлена зависимость содержания хлорофиллов (а, b и а + b) в листьях от концентрации глифосата в почве. Показатели содержания хлорофиллов (а, b и а + b) в листьях тест-культуры зависели также от свойств штамма-инокулянта.

**Влияние *Azospirillum* sp. и *Rhizobium* sp. на содержание хлорофиллов в листьях гороха Миллениум в зависимости от концентрации глифосата в почве**

C <sub>ГФ</sub>	Инокуляция	Содержание хлорофиллов, %		
		a	b	a + b
C <sub>0</sub>	Без инокуляции	7,45	3,66	11,11
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	8,24	4,97	13,21
	<i>A. brasilense</i> Дп1	8,29	4,75	13,04
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	8,74	3,98	12,72
C <sub>1</sub>	Без инокуляции	6,74	3,15	9,89
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	7,74	4,78	12,52
	<i>A. brasilense</i> Дп1	8,36	4,96	13,32
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	7,14	4,10	11,24
C <sub>2</sub>	Без инокуляции	6,05	2,85	8,90
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	8,05	4,01	12,06
	<i>A. brasilense</i> Дп1	7,80	4,74	12,54
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	7,64	4,04	11,68
C <sub>3</sub>	Без инокуляции	5,60	2,26	7,86
	<i>A. brasilense</i> 2(в)3	6,15	2,95	9,10
	<i>A. brasilense</i> Дп1	6,00	2,62	8,62
	<i>Rh. trifolii</i> R-45	7,26	2,38	9,64
НСР <sub>05</sub> Фактор А (инокуляция)		0,41	0,32	0,50
Фактор В (доза ГФ)		0,41	0,32	0,50

*Примечание.* C<sub>0</sub> – без ГФ, C<sub>1</sub> – 2,30 мг ГФ/кг (3,0 л/га), C<sub>2</sub> – 7,70 мг ГФ/кг (10 л/га), C<sub>3</sub> – 38,50 мг ГФ/кг (50 л/га).

Данные, полученные в модельных экспериментах в условиях почвенного микроскома показали, что ризосферные азотфиксирующие бактерии *A. brasilense* и *Rh. trifolii* из коллекционного фонда Института почвоведения и агрохимии оказывают полифункциональное полезное воздействие на инокулированные растения: стимулируют их рост и развитие, повышают их фотосинтетический потенциал (ассимиляционная поверхность, содержание хлорофиллов), способны утилизировать глифосат и одновременно оказывать антистрессовое действие на растения в широком диапазоне концентраций этого гербицида в почве. К преимуществам ризосферных бактерий *A. brasilense* и *Rh. trifolii* относится способность фиксировать атмосферный азот и контролировать развитие фитопатогенов [4, 33].

## ВЫВОДЫ

Проведена серия модельных инокуляционных экспериментов по культивированию гороха Миллениум в условиях почвенного микроскома с искусственно созданными уровнями содержания глифосата в почве: C<sub>0</sub> (без глифосата), C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> и C<sub>3</sub> соответствующие внесению 0; 3; 10 и 50 л/га гербицида в полевых условиях. Установлено, что прием инокуляции семян глифосат-утилизирующими ризобактериями *A. brasilense* 2(в)3, *A. brasilense* Дп1 и *Rh. trifolii* R-45 оказывает

полифункциональное антистрессовое действие на растение в широком диапазоне содержания глифосата в почве, которое проявляется в стимуляции роста, развития корневой системы, повышении фотосинтетического потенциала за счет увеличения ассимиляционной поверхности листьев и содержания хлорофиллов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Михайловская, Н. А. Скрининг азотфиксирующих бактерий по способности метаболизировать гербицид глифосат как источник фосфора / Н. А. Михайловская // Почвоведение и агрохимия. – 2022. – 2(69). – С. 110–120.
2. Okon, Y. Developments in Basic and Applied Biological Nitrogen Fixation / Y. Okon, R. W. F. Hardy // Plant Physiology. Academic Press Inc. – 1983. – Vol. 8. – P. 5–54.
3. Michiels, K. *Azospirillum* – plant root associations: a review / K. Michiels, J. Vanderleyden, A. Gool // Biol. Fertil. Soils. – 1989. – Vol. 8. – P. 356–368.
4. Нестеренко, В. Н. Использование ассоциативных микроорганизмов для повышения урожайности ячменя и многолетних злаковых трав: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.04 / В. Н. Нестеренко. – Минск, 1993. – 23 с.
5. Mikanová, O. Schopnost kmenů *Rhizobium leguminosarum* zpřístupňovat fosfor / O. Mikanová [et al.] // Rostlinná výroba. – 1995. – Vol. 41. – № 9. – P. 423–425
6. Zobiolo, L. H. S. Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of «second generation» glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.) / L. H. S. Zobiolo [et al.] // Pestic. Biochem. Physiol. – 2011. – Vol. 99. – P. 53–60.
7. Zobiolo, L. H. S. Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean / L. H. S. Zobiolo [et al.] // J. Plant Nutr. Soil Sci. – 2012. – Vol. 175. – P. 319–330.
8. Okon, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots / Y. Okon, Y. Kapulnik // Plant Soil. – 1986. – Vol. 90. – P. 3–16.
9. Kapulnik, Y. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation / Y. Kapulnik, Y. Okon, Y. Henis // Can. J. Microbiol. – 1985. – Vol. 31. – P. 881–887.
10. Tien, T.M. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) / T. M. Tien, M. H. Gaskins, D. H. Hubbell // Appl. Environ. Microbiol. – 1979. – Vol. 37, № 5. – P. 1016–1024.
11. Jain, D. K. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs / D. K. Jain, D. G. Patriquin // Can. J. Microbiol. – 1985. – Vol. 31. – P. 206–210.
12. Zimmer, W. An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum* / W. Zimmer, K. Roeben, H. Bothe // Planta. – 1988. – Vol. 176. – P. 333–342.
13. Zimmer, W. The phytohormonal interactions between *Azospirillum* and wheat / W. Zimmer, H. Bothe // Nitrogen fixation with non-legumes / Eds. F. A. Skinner [et al.]. – Kluwer Academic Publishers, 1989. – P. 137–145.
14. Михайловская, Н. А. Активность фосфатмобилизации у ризобактерий / Н. А. Михайловская [и др.] // Почвоведение и агрохимия. – 2007. – № 1(38). – С. 225–231.
15. Štorkánová, G. P-solubilizační aktivita kmenů rodu *Rhizobium*. (P-solubilization activity of *Rhizobium* species strains) / G. Štorkánová [et al.] // Rostlinná výroba. – 1999. – Vol. 45. – № 9. – P. 403–40.

16. *Mikanová, O.* The practical use of the P-solubilization activity of *Rhizobium* species strains / O. Mikanová, J. Kubát // *Rostlinná Výroba*. – 1999. – Vol. 45. – № 9. – P. 407–409.
17. *Kennedy, I.R.* Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: recent advances / I. R. Kennedy, Y. Tchan // *Plant Soil*. – 1992. – Vol. 141. – P. 93–118.
18. *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.
19. *Moens, S.* Cloning sequencing and phenotypic analysis of *laf1*, encoding the flagellum of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense* Sp. 7 / S. Moens [et al.] // *J. Bacteriol*. – 1995. – Vol. 177. – P. 5419–5426.
20. *Bashan, Y.* Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil / Y. Bashan // *J. Gen. Microbiol*. – 1986. – Vol. 132. – P. 3407–3414.
21. *Mikanová, O.* Phosphorus Solubilizing Microorganisms and their Role in Plant Growth Promotion / Mikanová, O., Kubát, J. // *Microbial Biotechnology in Agriculture and Aquaculture* – 2006. – Vol. II. – P. 111–145.
22. *Mikanová, O.* Practical use of the P-solubilization activity of *Rhizobium* species strains / O. Mikanová, J. Kubát // *Rostlinná Výroba*. – 1999. – Vol. 45. – № 9. – P. 407–409.
23. *Лапа, В. В.* Применение удобрений и качество урожая / В. В. Лапа, В. Н. Босак. – Минск, 2006. – 120 с.
24. Способ определения площади листьев гороха: пат. SU 1544279 A1 / А. Г. Бегунова, В. В. Ефремова, Г. Д. Цвиринько, А. М. Бурдун; заявитель Кубанский с/х институт, 1981.
25. *Посыпанов, Г. С.* Методы изучения биологической фиксации азота воздуха / Г. С. Посыпанов. – М.: Агропромиздат, 1991. – 299 с.
26. *Haslam, E.* The shikimate pathway: biosynthesis of natural products series / E. Haslam. – Elsevier, New York. – 2014.
27. *Fedtke, K.* Herbicides / K. Fedtke, S. Duke // *Plant toxicology* / Hock B, Elstner E, eds. – New York: Marcel Dekker. – 2005. – P. 247–330.
28. *Gomes, M.P.* Glyphosate-Dependent Inhibition of Photosynthesis in Willow / M. P. Gomes [et al.] // *Front. Plant Sci*. – 2016. – Vol. 8. – P. 150–164.
29. *Gomes, M. P.* Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview / M. P. Gomes [et al.] // *J. Exp. Bot*. – 2014. – Vol. 65, № 17. – P. 4691–4703.
30. *Reddy, K. N.* Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean / K.N. Reddy, A.M. Rimando, S.O. Duke // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2004. – Vol. 52. – P. 5139–5143.
31. *Yannicari, M.* Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. / M. Yannicari [et al.] // *Plant Physiol. Biochem*. – 2012. – Vol. 57. – P. 210–217.
32. *Сакмак, I.* Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in nonglyphosate resistant soybean. / I. Сакмак [et al.] // *Eur. J. Agron*. – 2009. – Vol. 31. – P. 114–119.
33. *Михайловская, Н. А.* Антагонистическая активность ризобактерий *A. brasilense* 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.

**EFFECT OF GLYPHOSATE-UTILIZING BACTERIA *AZOSPIRILLUM* SP.  
AND *RHIZOBIUM* SP. ON PHISIOLOGICAL STATUS OF PLANTS  
UNDER DIFFERENT GLYPHOSATE CONTENT IN SOIL**

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

**Summary**

Cultivation of *Pisum sativum* L, Millenium under soil microcosm conditions in model experiments with different glyphosate content in soil: C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub>, which corresponding the application of 0; 3,0; 10,0 and 50,0 liters of herbicide per hectare. Experimental data showed that seed inoculation by rhizobacteria *Azospirillum* sp. and *Rhizobium* sp. provided anti-stress effect on cultivated plants at high diapason of glyphosate content in soil. Anti-stress action of inoculation procedure realized in plant growth promotion, root stimulation, as well as in the increase of leaf's assimilation area and chlorophylls content in leafs.

*Поступила 06.12.23*