

**Г.А. Козлова**

Пермский национальный исследовательский  
политехнический университет

**Е.В. Пименова**

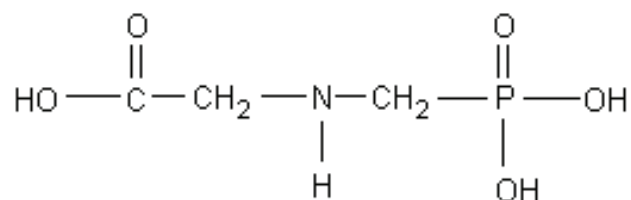
Пермская государственная сельскохозяйственная академия

## **ПОИСК ШТАММОВ – ДЕСТРУКТОРОВ ГЕРБИЦИДОВ НА ОСНОВЕ ГЛИФОСАТА**

*Описан штамм, способный к росту на синтетической минеральной среде с раундапом в качестве единственного источника углерода. Изучены его культурально-морфологические, биохимические и деструктивные свойства. Ингибирующее действие препарата на рост микроорганизмов начинает проявляться при концентрации 0,2 об. % по действующему веществу.*

Фосфорорганические соединения (ФОС) относятся к числу опасных загрязнителей окружающей среды, являются основой многих ксенобиотиков и широко используются в разных отраслях хозяйственной деятельности человека. Они входят в состав гербицидов, инсектицидов (хлорофос, афос), антибиотиков, пламегасителей, ингибиторов коррозии, отравляющих веществ (VX, зарин и зоман), используются как хелатирующие добавки к детергентам.

Важным представителем ФОС является глифосат – N-(фосфометил)-глицин,  $C_3H_8NO_5P$ :



который составляет основу многих гербицидов.

Одной из наиболее распространенных препаративных форм глифосата является раундап, который содержит 480 г/л водного раствора изопропиламиновой соли N-(фосфометил) глицина, что эквивалентно

360 г/л глифосата. Таким образом, содержание действующего вещества (д.в.) по кислоте составляет 36 %. Данный препарат является наиболее популярным в мире гербицидом. Он широко используется в сельском хозяйстве с целью уничтожения многолетних глубоко укореняющихся и корневищных сорняков, а также древесно-кустарниковой растительности в лесном хозяйстве и на землях несельскохозяйственного пользования [1].

Глифосат отличается высокой токсичностью и устойчивостью к разложению [2].

Анализ тенденций развития исследований в области защиты окружающей среды показывает, что наряду с совершенствованием существующих физических и химических методов большое внимание уделяется биотехнологическим методам. Такие методы экологически безопасны и выгодно отличаются от других отсутствием вторичных отходов, т.е. возможностью полной минерализации химических соединений, выбрасываемых в окружающую среду в качестве промышленных отходов. Кроме того, немаловажно, что биодеструкция является естественным процессом, что делает этот способ приемлемым для общественного сознания [3].

Относительно глифосата большое количество публикаций направлено на выделение глифосатдеградирующих микроорганизмов и проведение экспериментов, направленных на выявление путей их метаболизма.

Из почвы выделены микроорганизмы различных таксономических групп – *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium* и др. [4–6], способных разлагать глифосат при культивировании их на искусственных питательных средах.

Многие изоляты бактерий утилизируют глифосат как источник фосфора [6, 7]. В работе [8] приведено сравнение роста бактерий *Pseudomonas fluorescens* и *Acetobacter sp.* на различных средах с глифосатом (препарат Roundup®) в качестве источника углерода или фосфора (источник углерода – глюкоза), а также углерода и фосфора одновременно. Показано, что в последнем случае наблюдается наибольшая эффективность роста. Для микроорганизмов семейства *Rhizobiaceae* глифосат лучше используется как источник фосфора, чем источник углерода [7].

Целью данной работы является исследование микроорганизмов, способных за счет глифосата поддерживать рост и (или) использовать его в качестве единственного источника углерода.

**Материалы и методы исследования.** В качестве объекта исследований выбран штамм R16, выделенный из образца почвы, взятого с территории опытного поля учхоза Липовая Гора Пермской сельхозакадемии, обрабатываемого пестицидами на основе глифосата.

Исследуемый штамм представлен граммотрицательными, бесспорными, подвижными палочками. Способен к росту на синтетической минеральной среде с раундапом в качестве единственного источника углерода. Для сравнения использовали штамм *Acinetobacter calcoaceticus* АК 540 из коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН.

Исследование культуральных, макроморфологических и биохимических свойств микроорганизмов проводили по традиционным методикам [9, 10].

При определении источника углерода культуру высевали на среду Цукамуры [11], которая содержала минеральные вещества и вещество – источник углерода; раствор последнего стерилизовали фильтрованием и добавляли к стерилизованному в автоклаве солевому раствору с таким расчетом, чтобы конечная концентрация углеродсодержащего вещества была 0,5 %.

Для характеристики способности штамма утилизировать пестициды использовали торговые препараты (раундап, граунд, торнадо, трезор, хармони) в концентрации 0,1 % в пересчете на д. в.

Изучение влияния различных доз раундапа на рост двух разных культур микроорганизмов проводили в лабораторных условиях. Бактерии выращивали на синтетической минеральной среде следующего состава (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 1,0; NaCl – 1,0;  $\text{MgSO}_4$  – 0,2;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 0,2. В минеральную основу добавляли фосфатный буфер из расчета 10 мл на 90 мл среды и микроэлементы по Хогланду (0,1 мл на 100 мл среды). Фосфатный буфер и микроэлементы стерилизовали отдельно. Опыты проводили в пробирках. Посевной материал выращивали на мясопептонном агаре (МПА), затем суспендировали его в NaCl (0,85 %). После этого 0,1 мл суспензии, содержащей  $2,7 \times 10^6$  кл/мл, вносили в пробирки с 5 мл ацетатно-минеральной питательной среды с различными дозами раундапа (от 2 до  $2 \times 10^{-4}$  об. % по д.в.).

Контролем служила аналогичная среда без пестицида. Культивирование проводили без дополнительной аэрации при температуре 30 °С в термостате в течение трех суток.

О росте культуры судили по определению общей численности клеток (М), с просмотром 80 квадратов и вычислением их среднего

титра в 1 мм суспензии в камере Горяева методом прямого счета. Результаты считали достоверными при вычислении стандартных отклонений  $\pm 5\%$ .

Биомассу определяли измерением оптической плотности суспензии клеток на приборе ФЭК-56 М.

**Результаты исследования и их обсуждение.** В процессе изучения культуральных признаков нового штамма R16 было установлено, что через трое суток роста на МПА он образует округлые, гладкие, непигментированные колонии, слизистой консистенции, не растающие в агар. На агаризованной минеральной среде с раундапом (0,1 об. % по д.в.) образуются точечные, блестящие, бесцветные колонии. Следует отметить, что диаметр колоний, выросших на плотной синтетической среде с раундапом, намного меньше, чем на богатой питательной среде.

Изучение морфологических особенностей клеток в световом микроскопе МБИ-3 с использованием фазово-контрастной приставки КФ-4 показало, что рост R16 на среде с пестицидом не приводит к уменьшению или увеличению размеров клеток или появлению инволютивных форм, как это возможно при неблагоприятных условиях роста культуры бактерий.

При использовании фазово-контрастной микроскопии обнаружена способность штамма колонизировать капли раундапа, что характерно для штаммов, скорость роста которых не зависит от растворимости препарата в воде. Возможно, данный микроорганизм образует соединения, которые повышают растворимость препарата в воде.

В связи с тем, что бактерии могут изменять свою форму в процессе роста и развития, для выявления цикла развития и предварительной идентификации проводили последовательное микроскопическое наблюдение за культурой разного возраста (6–24–48–72 ч, 5–7 сут). Бактерии выращивали на двух синтетических минеральных средах, в одной из которых источником углерода был ацетат, а в другой – раундап. На протяжении всего времени наблюдения клетки оставались палочковидными, подвижными. Нитевидных форм или скоплений при росте штамма R16 на жидких средах не отмечается. Установлено, что в старых культурах в клетках имеются включения. Деление простое – путем перетяжки. Совокупность изученных свойств штамма R16 представлена в табл. 1.

По совокупности всех изученных характерных признаков бактерии R16 близки к роду *Pseudomonas* [9, 12].

## Характерные признаки штамма R16

Признак	Результат	Признак	Результат
Окраска по Граму	–	Цитрат Na	–
Форма клеток	Палочки	2,4-Д	+
Подвижность	+	Ацетат Na	+
Диаметр клеток, мкм	0,5–1	Метанол	–
Оксидаза	+	Этанол	+
Каталаза	+	Источник азота:	
Уреаза	–	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	+
Аргинингидролаза	+	NO <sub>3</sub> <sup>–</sup>	+
Орнитиндекарбоксилаза	–	NO <sub>2</sub> <sup>–</sup>	+
Лизин декарбоксилаза	–	Денатрификация	–
Образование индола	–	О/Ф – тест	0
Образование H <sub>2</sub> S	–	Рост при t 37 °С	–
Источник углерода:		Рост при t 30 °С	+
		Рост при t 5 °С	+
		Способность к росту на пестицидах:	
сахароза		раундап	+
лактоза	–	граунд	+
глюкоза	+	торнадо	+
манноза	+	хармони	+
маннит	+	трезор	+
инозит	+		
малонат Na	+		

Бактерии представляют собой прямые подвижные палочки размером (0,5–1,0)×(1,5–5,0) мкм. Грамотрицательные, спор не образуют, облигатные аэробы; метаболизм чисто дыхательного типа с использованием кислорода в качестве конечного акцептора электронов.

Бактерии R16 растут на простой минеральной среде с ацетатом, фенолом, пестицидами, оксидазо- и каталазоположительные, устойчивы к стрептомицину и канамицину, умеренно чувствительны к тетрациклину и левомицетину и высоко чувствительны к мономицину, пенициллину и эритромицину.

Судя по литературным данным, бактерии рода *Pseudomonas* привлекают пристальное внимание исследователей своей способностью к деструкции многих токсичных веществ, в том числе многих пестицидов [3], относящихся к различным классам органических соединений. Так, в работе [13] изучена утилизация 20 фосфонатов (среди которых много пестицидов) глифосатутилизирующим штаммом *Pseudomonas*

*sp* GS, в патенте [13] предложен способ микробного разложения фосфоновых или фосфиновых соединений штаммом *Pseudomonas*.

Для прогнозирования скорости микробиологической трансформации или деструкции пестицидов в почве и управления этими процессами необходимо знать факторы и условия, прямо или косвенно определяющие взаимодействие почвенных микроорганизмов и экотоксикантов. В этой связи представляется важным, в частности, выявить пределы концентраций пестицидов, не оказывающих ингибирующего действия на микроорганизмы, а следовательно, не нарушающих их функции. В связи с этим были проведены эксперименты, направленные на изучение влияния различных доз раундапа на рост штамма R16 и сопоставление его ростовых характеристик с ростом музейного штамма *Ac. calcoaceticus* АК 540.

Опыты повторяли 3 раза. Оптическую плотность и общую численность клеток определяли методом прямого счета через 48 и 72 ч роста.

Культуру выращивали на ацетатно-минеральной среде, как указано выше. Дозы раундапа варьировали от 2 до  $2 \cdot 10^{-4}$  % по д.в. Контролем служила среда аналогичного состава без внесения пестицида. Общее число клеток в 1 мл посевного материала R16 и *Ac. calcoaceticus*, соответственно, составляло  $3,4 \cdot 10^6$  и  $3,6 \cdot 10^6$ . Изменение роста штамма R16 при различных дозах раундапа представлена в табл. 2.

Установлено, что раундап, внесенный в питательную среду в количестве 0,08–0,002 об. % по д.в., не оказывает отрицательного воздействия на ростовые характеристики R16 по сравнению с контролем.

Таблица 2

Изменение роста бактерий R16 при различных дозах пестицида

№ п/п	Доза раундапа, об. % по д.в.	Показатели процесса			
		М, кл/мл через		Биомасса, ед. ОП через	
		48 ч	72 ч	48 ч	72 ч
1	2	–	$3,5 \cdot 10^5$	–	–
2	$2 \cdot 10^{-1}$	$1,5 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^8$	0	0,01
3	$8 \cdot 10^{-2}$	$2,2 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$	0,20	0,20
4	$4 \cdot 10^{-2}$	$2,3 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	0,20	0,21
5	$2 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	0,21	0,24
6	$2 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^8$	$3,7 \cdot 10^8$	0,20	0,32
7	$2 \cdot 10^{-4}$	–	$2,8 \cdot 10^8$	–	0,30
8	Контроль (без пестицида)	$2,1 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^8$	0,18	0,28



Доза 0,2 об. % по д.в. в данном случае оказывает бактериостатическое действие, о чем свидетельствует образование колоний на плотной среде – возобновление роста и деления клеток.

Полная гибель клеток штамма R16 обнаруживается лишь при максимально высокой концентрации пестицида, т.е. при дозе 2 % в данных условиях проведения эксперимента проявляется бактерицидный эффект. Сопоставление активности роста R16 и *Ac. calcoaceticus* представлено на рисунке.

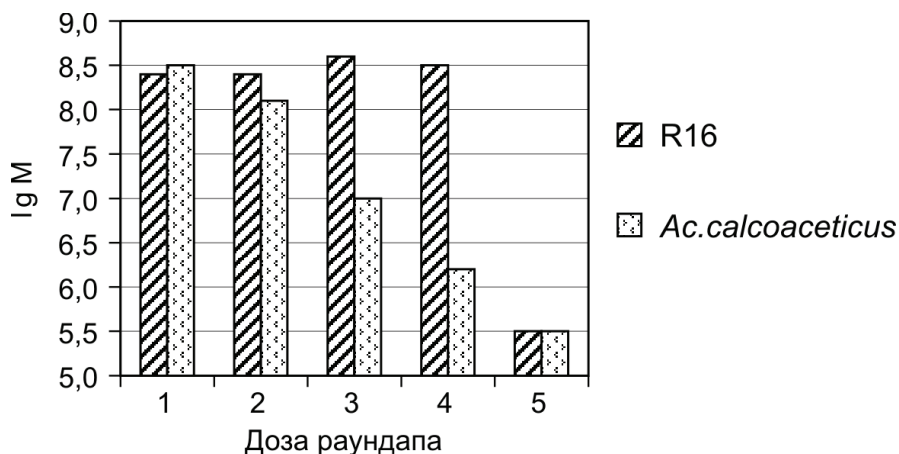


Рис. Активность роста штаммов бактерий при разных дозах гербицида, об. % по д.в.: 1 – контроль (без пестицида); 2 – 0,0002; 3 – 0,002; 4 – 0,02; 5 – 0,2

Как видно, музейная культура более чувствительна к воздействию раундапа. Ингибирование роста *Ac. calcoaceticus* по сравнению с контролем обнаруживается при дозе гербицида 0,0002 об. % по д.в., а бактерицидный эффект наблюдается при 0,02 об. % по д.в.

Следует отметить, что способность к росту у R16 на среде с пестицидом сохраняется и в неселективных условиях, что является необходимым условием при рассмотрении возможности его использования в биотехнологии по очистке почвы от загрязнения данными пестицидами.

### Список литературы

1. Мельников Н.Н., Волков А.И., Короткова О.А. Пестициды и окружающая среда. – М.: Химия, 1977. – 240 с.
2. Глифосат («раундап») // Журнал пестицидной реформы Каролинкок. –1998. – Т. 18, № 3. – URL: <http://www.forest.ru/rus/bulletin/16/5full.html>.
3. Круглов Ю.В. Микрофлора почвы и пестициды. – М.: Агропромиздат, 1991. – 362 с.

4. Metabolism of Glyphosate in *Pseudomonas* sp. Strain LBr. / G.S. Jacob [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – № 54. – P. 2953–2958.
5. Pipke R., Amrhein N. Degradation of the Phosphonate Herbicide Glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – № 54. – P. 1293–1296.
6. Balthazor T.M., Hallas L.E. Glyphosate Degrading Microorganisms from Industrial Activated Sludge // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1986. – № 51. – P. 432–434.
7. Liu C.M., McLean P.A., Sookdeo C.C., Cannon F.C. Degradation of the Herbicide Glyphosate by Members of the Family *Rhizobiaceae* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1991. – № 57. – P. 1799–1800.
8. Moneke A.N., Okpala G.N., Anyanwu C.U. Biodegradation of glyphosate herbicide *in vitro* using bacterial isolates from four rice fields African // *Journal of Biotechnology.* – 2010. – Vol. 9 (26). – P. 4067–4074.
9. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 303 с.
10. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 248 с.
11. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. – М.: Колос, 1983. – 248 с.
12. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. Т. 1: пер с англ. / под ред. Дж. Хоулта [и др.]. – М.: Мир, 1007. – 432 с.
13. *In vivo* utilization on N – (phosphonomethye) – anilines and related substances by *Pseudomonas* spec. GS / B. Albrecht, R. Weidhase, M. Stock, R. Weidhase // *Journal Basic. Microbiol.* – 1991. – Vol. 31, № 6. – С. 403–411.

Получено 2.06.2011