

УДК 57.083.12+579.264+579.222.4

НОВЫЕ РИЗОСФЕРНЫЕ ШТАММЫ-ДЕСТРУКТОРЫ ГЕРБИЦИДОВ, СПОСОБНЫЕ К БИОКОНТРОЛЮ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2025 г. Т. З. Есикова^а, *, В. Н. Поливцева^а, Т. О. Анохина^а

^аФедеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, 142290, Россия
*e-mail: das3534@rambler.ru

Поступила в редакцию 12.07.2024 г.

После исправления 28.08.2024 г.

Принята к опубликованию 29.08.2024 г.

Из ризосферы дикорастущих и культурных злаков выделены биотехнологически значимые штаммы бактерий рода *Pseudomonas*, совмещающие в себе способность к биоконтролю фитопатогенных грибов и бактерий и деградации гербицида глифосат в качестве единственного источника фосфора (*P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* G16, *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* G27, *P. protegens* G23-4) и гербицида Аксил в качестве единственного источника углерода (*P. chlororaphis* G27). Данные штаммы проявляли липолитическую и протеолитическую активности, а *P. chlororaphis* G27 также продуцировал цианид водорода, обладающий антифунгальным действием. Изученные в настоящей работе штаммы могут быть рекомендованы в качестве основы биопрепаратов для защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов, в том числе на почвах, подвергшихся обработке гербицидами.

Ключевые слова: биodeградация гербицидов, биоконтроль фитопатогенов, глифосат, Аксил, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas protegens*

DOI: 10.31857/S0026365625010099

Повсеместное применение в сельском хозяйстве химических средств защиты растений приводит к накоплению токсичных соединений в почве и растениях, а также к распространению резистентных к пестицидам фитопатогенных микроорганизмов. Для защиты растений от возбудителей болезней все шире применяются биологические препараты, основой которых являются разнообразные микроорганизмы и их метаболиты (Ravensberg, 2015). Особое внимание уделяется полифункциональным штаммам микроорганизмов, сочетающих в себе как способность к фитостимуляции и биоконтролю патогенных микроорганизмов, так и к биodeградации токсичных органических соединений, в частности, гербицидов (Shahid et al., 2018; Zhumakayev et al., 2021). Одним из широко применяемых во всем мире средством для борьбы с сорняками является неселективный системный гербицид глифосат (N-(фосфометил)-глицин, ГФ), механизм действия которого связан с ингибированием 5-еноилпирувил-шикимат-3-фосфат-синтазы растений (КФ 2.5.1.19). Накопление ГФ в почвенных и водных экосистемах приводит к изменению

состава микробных сообществ, а также оказывает негативное воздействие на здоровье животных и человека (Sviridov et al., 2021). Еще одним востребованным препаратом является Аксил – селективный гербицид для подавления роста злаковых сорняков (действующее вещество – пиноксаден, ингибитор ацетил-СоА-карбоксилазы растений (КФ 6.4.1.2)). Основным путем удаления химически синтезированных токсичных соединений из окружающей среды является их микробная деградация, зависящая от наличия специализированных ферментных систем (Sviridov et al., 2021).

Наиболее перспективными микроорганизмами для создания биологических препаратов являются ризосферные флуоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas*. Они обладают уникальными свойствами, среди которых – способность к синтезу различных антибиотиков, сидерофоров, липопептидов и бактериоцинов (Mishra, Arora, 2018). Кроме того, псевдомонады способны утилизировать широкий спектр ксенобиотиков, что обусловлено большим разнообразием ферментных систем и генетической пластичностью, в том числе

благодаря распространению среди них катаболических плазмид.

Целью данной работы было выделение и характеристика новых бактерий – представителей рода *Pseudomonas*, обладающих комплексным технологически значимым потенциалом, включающим в себя наличие антагонистической активности по отношению к фитопатогенным микроорганизмам и способности к разложению гербицидов глифосата и Аксиала.

В работе исследовали бактерии *Pseudomonas*, выделенные из ризосферы дикорастущих и культурных злаков – пырея ползучего (*Elytrigia repens* L.) и пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) (регион Гурия, Грузия). Бактерии выделяли методом прямого высева на селективную среду *Pseudomonas* Iso-lation Agar (PIA; “Sigma”, США).

Исследование антибактериальной активности осуществляли на среде LB (Sambrook et al., 1989) методом двуслойного агара. В качестве тест-культур использовали фитопатогенные бактерии и грибы, указанные в таблице. О наличии антифунгальной активности изолятов судили по наличию зоны подавления роста мицелия при совместном культивировании (Esikova et al., 2021).

Активность литических ферментов (липазы, протеиназы, желатиназы и хитиназы) у исследуемых бактерий определяли с помощью экспресс-тестов, как описано ранее (Герхард, 1984). Для определения

продукции цианида водорода использовали качественный цветной тест (Feigl, Anger, 1966).

Рост изолятов на ГФ (гербицид Граунд Био, 36% раствор изопропиламинной соли, “Техноэкспорт”, Россия) в качестве единственного источника фосфора (500 мг/л) изучали в жидкой минеральной среде MS1, как описано ранее (Esikova et al., 2021). Для исследования способности бактерий использовать гербицид Аксиал КЭ (“Сингента”, Россия; действующее вещество – пиноксаден, 50 г/л) в качестве единственного источника углерода клетки культивировали в парах субстрата в жидкой минеральной среде M9.

Выделение ДНК, амплификацию, секвенирование генов 16S рРНК и филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли общепринятыми методами (Esikova et al., 2021).

Методом прямых высевов на среду PIA было выделено 55 штаммов бактерий; 30 из них, различающихся по культурально-морфологическим признакам, были отобраны для дальнейшего изучения. Изоляты были исследованы на способность подавлять рост фитопатогенных бактерий – возбудителей экономически значимых болезней растений (Mansfield et al., 2012). Антибактериальной активностью обладали семь штаммов, ингибирующих в той или иной степени рост тест-бактерий (таблица). Так, например, штамм G23-4 подавлял рост всех

Таблица. Антагонистическая активность ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* в отношении фитопатогенных микроорганизмов

Фитопатогенные микроорганизмы	Ризосферные бактерии						
	G3	G5	G16	G22	G23-4	G25	G27
Фитопатогенные бактерии							
<i>Pseudomonas savastanoi</i> BKM B-1546	2 ± 1	2 ± 1	≤1	≤1	4 ± 1	≤2	–
<i>Ralstonia</i> sp. 7-1	2 ± 1	2 ± 1	5 ± 1	2 ± 1	8 ± 2	3 ± 1	3 ± 1
<i>Pectobacterium carotovorum</i> BKM B-1247 ^T	≤2	3 ± 1	–	≤2	4 ± 1	≤2	≤2
<i>Pectobacterium wasabiae</i> B15	–*	–	–	–	5 ± 1	≤2	3 ± 1
<i>Xanthomonas campestris</i> BKM B-610	≤2	2 ± 1	–	–	≤2	2 ± 1	–
<i>Xanthomonas campestris</i> BKM B-570	2 ± 1	2 ± 1	–	–	2 ± 1	2 ± 1	–
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101(pMP90RK)	3 ± 1	6 ± 1	–	5 ± 2	10 ± 2	4 ± 1	6 ± 1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> CBE21	3 ± 1	5 ± 1	–	5 ± 2	12 ± 2	5 ± 1	5 ± 1
<i>Clavibacter michiganensis</i> BKM Ac-1403	≤2	≤2	–	≤1	3 ± 1	2 ± 1	≤1
Фитопатогенные грибы							
<i>Fusarium graminearum</i> BKM F-1668	–	≤2	≤2	–	3 ± 1	≤2	2 ± 1
<i>Rhizoctonia solani</i> BKM F-895	–	2 ± 1	≤2	2 ± 1	2 ± 1	–	≤1
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> 1818	–	–	≤1	≤1	3 ± 1	–	2 ± 1
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> T34	–	Н.о.	4 ± 1	Н.о.	11 ± 2	–	5 ± 1

Примечание. Зоны ингибирования роста фитопатогенных бактерий оценивали на 3–5 сут, фитопатогенных грибов – на 10 сут. Зоны измеряли от края колонии тест-бактерии и выражали в мм. Данные в таблице представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение. *Зона подавления роста тест-микроорганизма отсутствует; н.о. – не определяли.

тест-бактерий, наиболее эффективно — *Ralstonia* sp. 7-1, *A. tumefaciens* GV3101(pMP90RK) и CBE21. Далее эти семь штаммов были исследованы на наличие антагонистической активности по отношению к фитопатогенным микромицетам *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* 1818, *F. graminearum* F-1668, *R. solani* F-895 и *C. sphaerospermum* T34 (таблица). Как и в случае с фитопатогенными бактериями, наиболее эффективным антагонистом оказался штамм G23-4, который подавлял рост всех грибов, имеющихся в нашем распоряжении (рис. 1).

Из продуктов метаболизма, выделяемых штаммами-антагонистами, большое значение имеют литические ферменты, так как они ответственны за гидролиз различных по строению веществ, входящих в состав клеточных стенок бактерий и/или грибов. Поэтому у отобранных семи штаммов-антагонистов изучали активность литических ферментов — протеаз, липаз, хитиназ. Экспресс-тесты показали, что все эти бактерии обладали протеолитической и липазной активностью, наиболее выраженной у G23-4. Несмотря на ингибирование роста фитопатогенных микромицетов, хитиназная активность у исследуемых штаммов не была выявлена. Известно, что благодаря хитиназе микроорганизмы родов *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Trichoderma* способны деградировать хитин, входящий в состав клеточной стенки грибов (Veliz et al., 2017). По всей видимости, подавление роста грибного мицелия в нашем случае вызвано

действием секретируемых антибиотически активных метаболитов.

Особой группой антимикробных соединений являются летучие бактериальные экзопродукты, к которым относятся цианиды. Механизм действия HCN связан с ингибированием медьсодержащей цитохром-с-оксидазы, терминального компонента дыхательной цепи грибов. Описаны штаммы *P. fluorescens* CHA0 и *P. putida* BK8661, выделяющие цианиды и подавляющие рост фитопатогенных грибов *Thielaviopsis basicola*, *Septoria tritici* и *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, тем самым уменьшая симптомы заболеваний растений (Zdor, 2015). Нами было выявлено, что штаммы G22, G25 и G27 выделяли цианид водорода, что подтверждалось цветной качественной реакцией. Таким образом, не исключено, что ингибирование роста фитопатогенов этими культурами может быть обусловлено действием сразу нескольких механизмов.

Далее изучали способность отобранных штаммов-антагонистов использовать ГФ в качестве единственного источника фосфора и Аксиал в качестве единственного источника углерода. Было установлено, что бактерии G16, G23-4 и G27 росли в минеральной среде, содержащей ГФ, максимальные значения ОП₅₆₀ достигали 1.2–1.4 опт. ед. в зависимости от штамма (рис. 2а), и только штамм G27 рос в присутствии Аксиала (рис. 2б).

На основании филогенетического анализа фрагментов генов 16S рРНК штамм G27 был

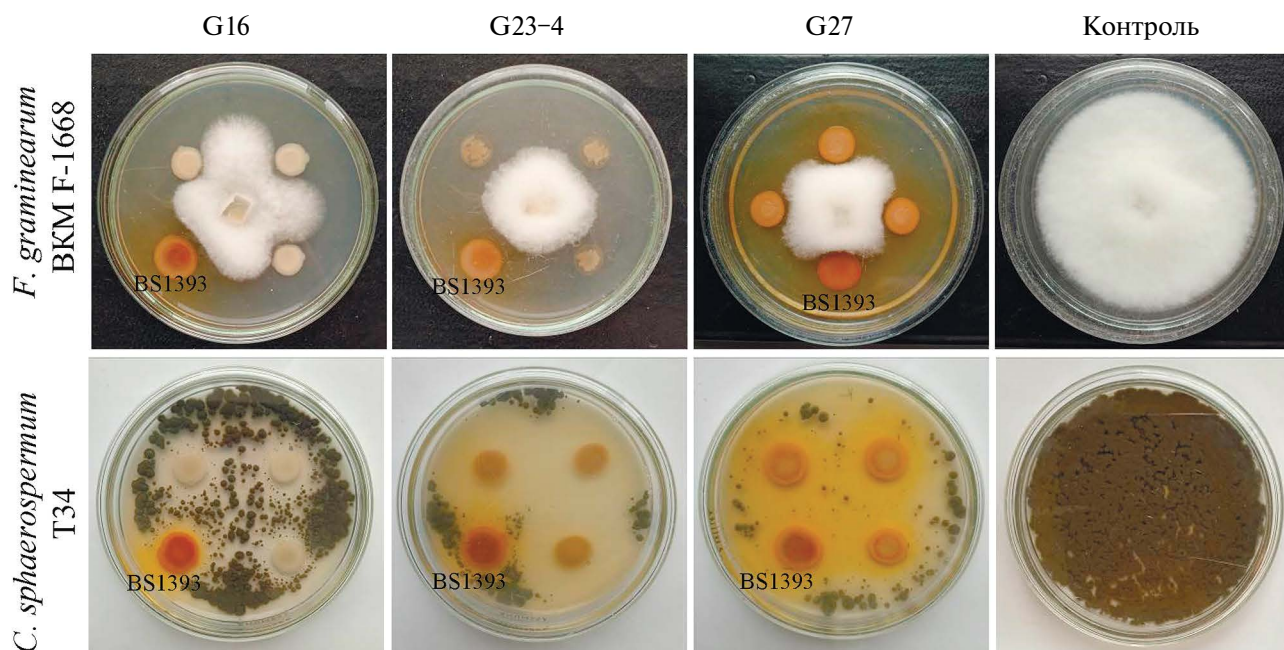


Рис. 1. Антагонистическая активность отобранных ризосферных штаммов по отношению к фитопатогенным грибам *Fusarium graminearum* BKM F-1668 и *Cladosporium sphaerospermum* T34. На чашке нанесены контрольный штамм *P. chlororaphis* BS1393, продуцент феназиновых антибиотиков, и исследуемые штаммы G16, G23-4, G27 в трех повторностях.

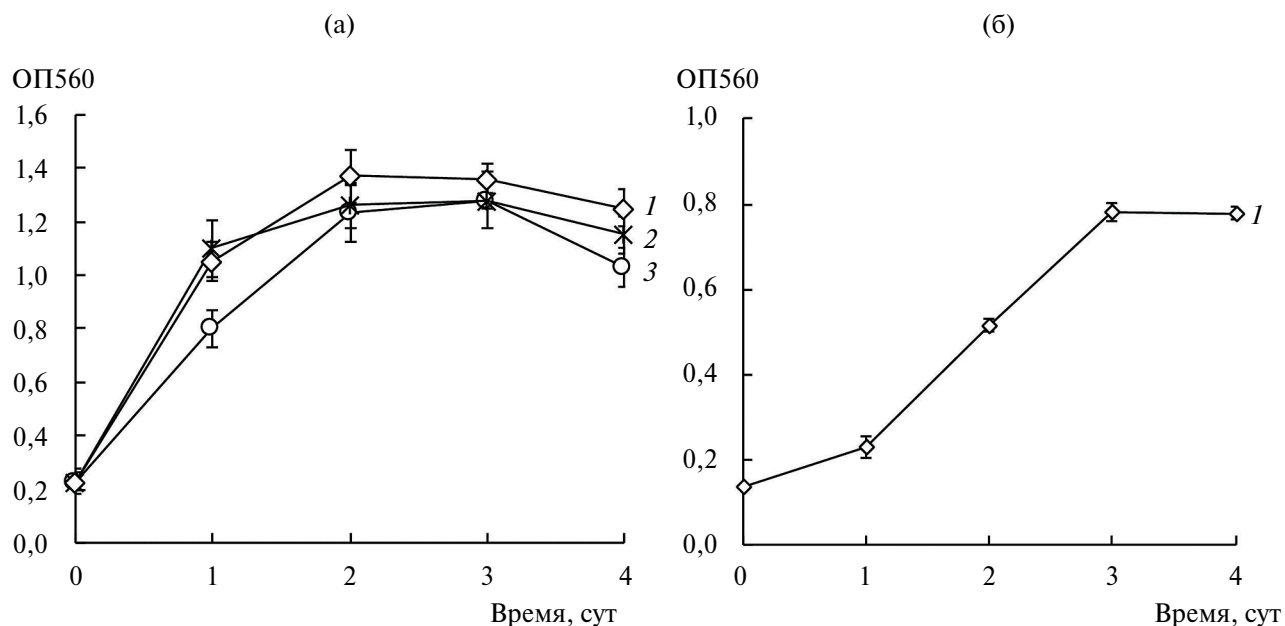


Рис. 2. Динамика роста ризосферных штаммов-антагонистов в жидкой минеральной среде: а – с глифосатом в качестве единственного источника фосфора; б – с Аксиалом в качестве единственного источника углерода и энергии. 1 – штамм G27, 2 – G23-4, 3 – G16.

идентифицирован как *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (уровень сходства с типовым штаммом *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* NBRC 3521^T составляет 100%), G16 – как *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* (сходство с типовым штаммом *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* NBRC3904^T составляет 99.57%) и G23-4 – как *P. protegens* (уровень сходства с типовым штаммом *P. protegens* CHA0^T составляет 99.79%). Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК исследуемых штаммов помещены в GenBank под номерами PP946898 (G16), PP951919 (G27) и PP932484 (G23-4). Известно, что псевдомонады, относящиеся к видам *P. chlororaphis* и *P. protegens*, как правило, являются активными агентами биологического контроля фитопатогенов за счет продукции антибиотически активных метаболитов, спектр которых различается в зависимости от вида и конкретного штамма (Ramette et al., 2011; Raio, Puopolo, 2021; Sidorova et al., 2023).

Следует отметить, что в литературе описаны штаммы-деструкторы ГФ и других гербицидов, однако большинство работ посвящено изучению физиолого-биохимических и генетических аспектов их деградации (Shahid et al., 2018; Sviridov et al., 2021). С другой стороны, в многочисленных исследованиях бактерий-антагонистов фитопатогенов не приводятся данные о возможности деградации ими такого класса токсичных органических соединений, как гербициды. В данной работе были выделены и охарактеризованы уникальные штаммы бактерий рода *Pseudomonas*, совмещающие в себе способность

подавлять рост фитопатогенных микроорганизмов и разлагать гербициды глифосат и Аксиал.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была поддержана Министерством науки и высшего образования РФ, Госзадание № FMRM-2022-0014.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Методы общей бактериологии. Том 3. Под ред. Герхардта Ф. и др. М.: Мир, 1984. 243 с.
 Esikova T.Z., Anokhina T.O., Abashina T.N., Suzina N.E., Solyanikova I.P. Characterization of soil bacteria with

- potential to degrade benzoate and antagonistic to fungal and bacterial phytopathogens // *Microorganisms*. 2021. V. 9. Art. 755.
- Feigl F., Anger V. Replacement of benzidine by copper ethylacetoacetate and tetra base as spot-test reagent for hydrogen cyanide and cyanogen // *Analyst (London)*. 1966. V. 1081. P. 282–284.
- Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S.V., Machado M.A., Toth I., Salmond G., Foster G.D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology // *Mol. Plant Pathol.* 2012. V. 13. P. 614–629.
- Mishra J., Arora N.K. Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture // *Appl. Soil Ecol.* 2018. V. 125. P. 35–45.
- Raio A., Puopolo G. *Pseudomonas chlororaphis* metabolites as biocontrol promoters of plant health and improved crop yield // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2021. V. 37. Art. 99.
- Ramette A., Frapolli M., Fischer-Le Saux M., Gruffaz C., Meyer J.M., Défago G., Sutra L., Moënné-Loccoz Y. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin // *Syst. Appl. Microbiol.* 2011. V. 34. P. 180–188.
- Ravensberg W.J. Commercialization of microbes: Present situation and future prospects // *Principles of plant-microbe interactions: microbes for sustainable agriculture* / Ed. Ben Lugtenberg. Cham: Springer, 2015. Part VI. Ch. 32. P. 309–318.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 479 p.
- Shahid M., Ahmed B., Khan M.S. Evaluation of microbiological management strategy of herbicide toxicity to green gram plants // *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2018. V. 14. P. 96–108.
- Sidorova T.M., Tomashevich N.S., Allahverdyan V.V., Tupertsev B.S., Kostyukevich Y.I., Asaturova A.M. New *Pseudomonas* bacterial strains: biological activity and characteristic properties of metabolites // *Microorganisms*. 2023. V. 11. Art. 1943.
- Sviridov A.V., Shushkova T.V., Epiktetov D.O., Tarlachkov S.V., Ermakova I.T., Leontievsky A.A. Biodegradation of organophosphorus pollutants by soil bacteria: biochemical aspects and unsolved problems // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. V. 57. P. 836–844.
- Veliz E.A., Martínez-Hidalgo P., Hirsch A.M. Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol // *AIMS Microbiol.* 2017. V. 3. P. 689–705.
- Zdor R.E. Bacterial cyanogenesis: impact on biotic interactions // *J. Appl. Microbiol.* 2015. V. 118. P. 267–274.
- Zhumakayev A.R., Vörös M., Szekeres A., Rakk D., Vágvölgyi C., Szűcs A., Kredics L., Škrbić B.D., Hatvani L. Comprehensive characterization of stress tolerant bacteria with plant growth-promoting potential isolated from glyphosate-treated environment // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2021. V. 37. Art. 94.

SHORT COMMUNICATIONS

New Rhizosphere Herbicide-Degrading Strains Capable of Biocontrol of Phytopathogenic Microorganisms

T. Z. Esikova¹*, V. N. Polivtseva¹, T. O. Anokhina¹

¹G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia
*e-mail: das3534@rambler.ru

Abstract. Biotechnologically significant strains of bacteria of the *Pseudomonas* genus have been isolated from the rhizosphere of wild and cultivated cereals. The isolated strains are able to biocontrol the phytopathogenic fungi and bacteria and degrade the herbicide glyphosate as the only source of phosphorus (*P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* G16, *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* G27, *P. protegens* G23-4) and the herbicide Axial as the only carbon source (*P. chlororaphis* G27). These strains exhibit lipolytic and proteolytic activities and *P. chlororaphis* G27 can also produce hydrogen cyanide, which has an antifungal effect. The studied strains can be useful as the basis of biopreparations for protecting plants from phytopathogenic microorganisms and treating soils polluted with herbicides.

Keywords: herbicide biodegradation, biocontrol of phytopathogens, glyphosate, Axial, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas protegens*