

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи



АЛИБАКОВ САЛАВАТ ХАЛИЛОВИЧ

**ИЗУЧЕНИЕ ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ
ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ**

Научный руководитель:
к.б.н., доцент кафедры ФПМ



Л.Р.Хакимова

Содержание:

Введение	3
Цель работы:	5
Задачи:	5
Глава 1. Литературный обзор	6
1.1 Фосфор	6
1.2 Глифосат	10
1.2.1 Механизм действия на растения	11
1.2.2 Применение	12
1.2.3 Токсичность	13
1.3 Псевдомонады	15
1.4 Стенотрофомоносы	17
1.5 Токсическое действие глифосата	18
1.5.1 Глифосат и пути его катаболизма.	18
1.5.2 Микробная деградация глифосата	22
1.6 Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) и возможности их применения	24
Глава 2. Материалы и методы	26
2.1 Методы исследований	28
2.1.1 Выделение штаммов <i>Pseudomonas</i> spp.	28
2.1.2 Приготовление накопительной культуры.	28
2.1.3 Выделение и очистка ДНК бактерий	31
2.1.4 Молекулярно-генетическая идентификация бактериальных штаммов	32
2.1.4 Фосфатмобилизация и сидерофорная активности	33
Глава 3. Результаты и обсуждение	34
Выводы	39
Список литературы:	40

Введение

Одним из основных макроэлементов, обеспечивающий благоприятное влияние не только на рост и развитие растений, но и на формирование высоких урожаев сельскохозяйственных культур является фосфор. В настоящее время важное значение для растений имеют соединения фосфора, которые легко усваиваются из почвы и минеральных удобрений. В связи с этим, одним из перспективных направлений в улучшении фосфорного питания сельскохозяйственных культур является биологическая фосфатмобилизация, которую осуществляют почвенные микроорганизмы. Этот процесс способствует превращению труднорастворимых соединений фосфора в формы, которые легко доступны для высших растений. Основная цель использования фосфатрастворяющих штаммов заключается в повышении подвижности труднорастворимых почвенных фосфатов. В связи с этим, в нашем исследовании мы определили фосфатмобилизующую активность 14 штаммов ризосферных бактерий. Эти бактерии были выделены из ризосферы бобовых растений, произрастающих на Южном Урале. Для этого штаммы *Pseudomonas* spp. OBA 2.4.1, OBA 2.9, GOR 4.17 и STA 3 были высажены на среду Муромцева (г/л): глюкоза – 10,0; аспарагин – 1,0; K₂SO₄ – 0,2; MgSO₄*7H₂O – 0,4; дрожжевой экстракт – 0,5; агар – 17,0; вода дистиллированная – до 1 л, в стерилизованную среду добавлены CaCl₂*6H₂O – 3,4 и Na₂PO₄*12 H₂O – 3,8 (непосредственно перед использованием), pH 6,8. Через сутки был измерен индекс солюбилизации (IS) с помощью формулы $IS = \frac{\text{Ø гало (мм)}}{\text{Ø колоний (мм)}}$. В результате три штамма из четырех исследуемых показали положительный результат. Штамм *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 не образовывал светлое гало вокруг колоний, что говорит об отсутствии мобилизующей активности данного штамма. Хотя именно данный штамм показывал хороший ростостимулирующий эффект на растениях гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и люцерны посевной (*Medicago sativa* L.). Остальные штаммы

показали разный индекс солибилизации: у штамма OBA 2.9 IS = 1,39, у штамма GOR 4.17 IS = 1,58, у штамма STA 3 IS = 2,05. Самый высокий индекс солибилизации выявлен у штамма *Pseudomonas* spp. STA 3. По данным результатам можно сделать вывод, что исследуемые штаммы могут солибилизировать фосфаты натрия в разной степени начиная уже с первых суток роста на среде. В дальнейшем планируется исследование данных штаммов на среде с добавлением других фосфатов.

Объектами изучения для дипломной работы мы выбрали представителей родов *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas* – основные группы фосфатмобилизирующих бактерий. Они наиболее эффективны за счет их основного фактора действия на растворимость почвенных фосфатов – образования кислых метаболитов для увеличения подвижности труднорастворимых почвенных фосфатов. Также ценными свойствами можно считать их высокую антагонистическую активность по отношению к корневым фитопатогенам и положительное влияние на гормональный эффект растений, благодаря чему увеличивается масса и объем корней. За счет сочетания перечисленных полезных свойств и разностороннего действия на состояние растений эти группы фосфатмобилизирующих бактерий востребованы как микробные инокулянты.

Принимая во внимание богатый метаболический потенциал бактерий, актуально изучение их взаимодействия с гербицидами. Глифосат представляет особый интерес из-за глобального применения в сельском хозяйстве, что привело к повсеместному присутствию его остатков в окружающей среде. Его вред для растений и человека невозможно переоценить, т.к. он, адсорбируясь на растениях, в воде и почве, повреждает ДНК, вызывает онкологию, накапливается в организме и нарушает работу гормональной системы. Именно по этим причинам изучение способности штаммов *Pseudomonas* spp. и *Stenotrophomonas* spp. метаболизировать глифосат как источник углерода и фосфора является нашей основной целью вместе с анализом способности этих бактерий

мобилизовать фосфор и переводить его в усваиваемое для растений состояние.

Цель работы:

Скрининг штаммов *Pseudomonas* spp. и *Stenotrophomonas* spp. к способности мобилизовать фосфор и анализ устойчивости к гербициду глифосату.

Задачи:

1. Скрининг штаммов *Pseudomonas* spp. и *Stenotrophomonas* spp. на способность к фосфатмобилизации с разными фосфатами в качестве единственного источника фосфора.
2. Характеристика исследуемых штаммов почвенных бактерий к устойчивости к глифосату и способности метаболизировать данный гербицид как источник углерода или фосфора.
3. Анализ полученных данных и отбор перспективных штаммов, способных метаболизировать разные фосфаты и гербицид глифосат как источник фосфора для своего роста.

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Фосфор

Фосфор наряду с азотом и калием является одним из важных макроэлементов, необходимых для эффективного функционирования растений на всех этапах их роста и развития. И несмотря на высокое содержание общего фосфора в почве, его биодоступность, как правило, является лимитирующим фактором, т.к. большинство из его соединений не усваиваются и являются недоступными для растений. Потому одной из наиболее острых проблем в земледелии является фосфорное питание растений, поскольку увеличение норм внесения минеральных удобрений не только нарушает баланс питания растений, но и приводит к снижению качества продукции и нарушению экосистемы почв, грунтовых вод и открытых водоемов. В связи с этим во многих странах проводят интенсивные исследования, направленные на поиск экологических приемов обеспечения растений фосфором и одним из перспективных направлений улучшения фосфорного питания сельскохозяйственных культур является биологическая фосфатмобилизация, осуществляемая почвенными микроорганизмами и способствующая переводу труднорастворимых соединений фосфора в доступные для высших растений формы.

Во многих сельскохозяйственных экосистемах содержание фосфора в почве постоянно растет, но большинство фосфатов, вводимых в почву в виде удобрений, поглощаются почвенными частицами, делая этот элемент питания недоступным для растений на 80-90 %. Таким образом, фосфор не может эффективно использоваться растениями. С целью улучшения доступности растениям питательных веществ разрабатываются биоудобрения, которые основаны на использовании микроорганизмов, способных мобилизовать нерастворимые почвенные фосфаты. Хотя почвенные или ризосферные бактерии используются для создания

удобрений, недостаёт данных о фосфатмобилизующей активности внутриклеточных бактерий, которые способны проникать во внутренние растительные ткани и длительное время существовать в них, не нанося вреда самому растению-хозяину. Данная информация отсутствует в доступной литературе.

Проведенные нами исследования показали, что некоторые штаммы родов *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas* не способны растворять фосфат железа, кальция и мобилизовать алюминиевый фосфат на твердых питательных средах. Важно отметить, что неспособность штаммов к мобилизации фосфата кальция может быть артефактом в виду того, что наличие осадков цитрата и оксалата кальция усложняет обнаружение гало зоны, даже при наличии растворения фосфата. Имеются данные, указывающие на то, что фосфат кальция более эффективно мобилизуется микроорганизмами, чем другие не растворимые формы фосфата. Это объясняется тем, что в этом процессе существенную роль играет снижение уровня pH среды. С другой стороны, при растворении фосфатов железа и алюминия важную роль играют процессы хелатообразования с участием анионов, преимущественно дикарбоновой и трикарбоновой кислот. Из указанного следует, что метод формирования зон гало недостаточен для обнаружения микроорганизмов, способных мобилизовать фосфаты. Это связано с тем, что некоторые изоляты, не образующие видимых зон гало на твердых средах, могут эффективно растворять фосфаты в жидких средах. Таким образом, необходимо использование более точных способов выявления фосфатмобилизующих микроорганизмов.

Известно, что органические кислоты, секретирующиеся почвенными микроорганизмами, могут способствовать переходу в почвенный раствор как минеральных, так и органических фосфатов, после чего становится возможным ферментативное освобождение фосфатной группы фосфатазами. Некоторые штаммы не обладают фосфатазной активностью из-за подавления транскрипции генов фосфатазных ферментов группы

неконститутивных ферментов. Этот процесс возникает из-за наличия свободного неорганического фосфата, который, вероятно, содержится в среде Муромцева. Итальянские исследователи провели интересное исследование, связанное с мутантным штаммом *Sinorhizobium meliloti* RD64, который является суперпродуцентом индолилуксусной кислоты. На среде с ограниченным содержанием фосфора этот штамм обнаружил способность растворять минеральные малоподвижные формы фосфора и проявлял высокую активность кислой фосфатазы, выделяя яблочную и янтарную кислоты. Существует вероятность того, что эндофитные бактерии, проживающие внутри растительных тканей, содержащих индолилуксусную кислоту и невысокие концентрации фосфатов, могут вырабатывать фосфатазы и увеличивать подвижность минеральных фосфатов. Это может быть достигнуто через производство органических кислот, таких как яблочная и янтарная, а также других механизмов.

Отсутствие фосфатазной активности у некоторых штаммов можно объяснить тем, что свободный неорганический фосфат, который, вероятно, содержится в среде Муромцева, подавляет транскрипцию генов фосфатазных ферментов. Мы считаем, что дополнительное исследование возможности индукции фосфатазной активности *in vitro* у штаммов нецелесообразно. В ризосфере, даже в условиях нехватки фосфора для растений, полное отсутствие доступных фосфат-анионов маловероятно даже в условиях фосфорного голодания растения-хозяина.

Эндофитные штаммы родов *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas* могут мобилизовать фосфаты и обладают фосфатазной активностью, что может быть важным в обеспечении растений фосфором. Однако, в естественных условиях, растения также синтезируют и выделяют фосфатазы, а в корневых экссудатах содержатся органические кислоты, что затрудняет оценку вклада эндофитных бактерий в обеспечение фосфором. Кроме того, эндофиты занимают уникальную экологическую нишу внутри растительных тканей, что ограничивает их участие в обеспечении растений

фосфором из почвы. Важным фактором является то, что большинство растений формируют симбиозы с микоризными грибами, что значительно улучшает фосфорное питание растений-хозяев.

Известно, что при достаточном уровне фосфорного питания растения слабо формируют микоризу. Это может быть обусловлено различием в составе корневых экссудатов растений при разном уровне фосфорного питания. Фенольные соединения, которые являются ключевыми сигнальными молекулами для активации микоризных грибов, имеют различный состав в зависимости от уровня фосфорного питания. Повышенное содержание подвижных форм фосфатов в почве может быть обеспечено микробами-мобилизаторами фосфатов, которые могут способствовать обеспечению растений необходимым количеством фосфора.

Исходя из этого, можно предположить, что у бактерий, которые на начальных этапах формирования ассоциации с растениями хотя бы некоторое время обитают в ризосфере, способность к мобилизации фосфатов является одним из факторов конкуренции с микоризными грибами, подобно тому, как продукция сидерофоров бактериями выступает преимуществом при конкуренции с грибами за ионы железа и других металлов. Такой механизм может быть одним из существенных «ограничителей» излишней колонизации растений микоризой и контроля эндофитными бактериями интенсивности микоризации тканей корня. Подобной гипотезы мы не встречали в литературе, также как и экспериментальных данных, подтверждающих или опровергающих её.

Правомерность такой гипотезы демонстрируют результаты полевого эксперимента по изучению влияния инокуляции семян эндофитными штаммами *Pseudomonas* spp. и *Stenotrophomonas* spp. на распространение и развитие микоризы в корнях растений. Обработка семян пшеницы почвенными бактериями заметно снижала все показатели микоризации корней, за исключением частоты встречаемости микоризы в корневой

системе, которая снижалась незначительно. Это позволяет предполагать, что исследованные эндофиты практически не влияют на способность растений к формированию микоризы на начальных этапах становления взаимоотношений между растением и грибом. Однако крайне низкие (по сравнению с контролем) показатели интенсивности колонизации микоризой, изобилия арбускул и везикул в корневой системе в целом могут быть следствием включения стойких защитных реакций растительным организмом в ответ на внедрение эндофитных. Наблюдаемый эффект негативного влияния эндофитных бактерий на микотрофность корней пшеницы, по-видимому, выступает комплексным показателем проявления различной биологической активности почвенных бактерий, например, антагонистической, поскольку известно о способности исследуемых штаммов подавлять рост фитопатогенных грибов *in vitro*. Вместе с тем полученные данные о способности эндофитов к мобилизации нерастворимых фосфатов могут служить первым подтверждением предложенной выше гипотезы. В связи с этим нами планируются более детальные исследования возможных типов взаимоотношений эндофитных бактерий с микоризными грибами.

1.2 Глифосат

Глифосат (N- (фосфонометил)глицин) – гербицид и арборицид из группы фосфорорганических соединений, производное фосфоновой кислоты, синтетический аналог природной аминокислоты глицина. Первоначальный синтез завершался реакцией глицина с фосфонатом, от сокращения этих двух слов образовано название вещества. Имеет широкий спектр активности, обладает сплошным действием, применяется для подавления однолетних и многолетних сорняков. Рекомендован для применения в виноградниках, плодовых садах, чайных плантациях, посадках цитрусовых. Широко используется на полях, предназначенных под посев различных культур [1].

Впервые открыт в Швейцарии в 1950 году и применялся как хелатор, связывающий и удаляющий из растворов кальций, магний, марганец, медь и цинк. В 1970 году обнаружены гербицидные и арборицидные свойства глифосата – способность уничтожать сорняки; в 1974 году в США начался промышленный синтез и выпуск под маркой Раундап.

Глифосат производится и используется под множеством торговых названий, в 2010 году их было более 750. Активным компонентом гербицидов служит соль глифосата: изопропиламинная, калийная, диаммонийная, моноаммонийная. Концентрация может быть указана по содержанию соли или по кислотному эквиваленту. Второй вариант точнее отражает и сравнивает концентрации.

1.2.1 Механизм действия на растения

Глифосат относится к гербицидам сплошного действия, в отличие от селективных гербицидов уничтожает все виды растений, на которые распылен. Поглощается листьями, не всасывается корнем. Действует контактно и системно, внутри растения перемещается от листьев к корню. Быстрый результат достигается в зонах активного роста и деления клеток. На однолетних растениях действие гербицида проявляется через 2–4 дня, на многолетних – через 7–10 дней и позже в зависимости от стадии их развития. Облачная или прохладная погода замедляет проявление действия вещества. Однолетние сорняки подавляются в течение 20–60 дней до повторного отрастания [9].

Глифосат действует как ингибитор синтеза аминокислот. Связывая ключевой фермент биосинтеза ароматических аминокислот ЕПШФ-синтазу, он нарушает производство триптофана, фенилаланина и тирозина. Так как растения, в отличие от животных, все аминокислоты производят самостоятельно, невозможность получать целых три из них приводит к

дефициту белков. В результате практически сразу же останавливается рост и развитие растений [7].

Видимые повреждения растений заметны через несколько дней. Это отмирание точек роста, бледно-зеленый с желтизной цвет листьев, их измененная форма и потеря тургора, остановка развития боковых корней. Засыхают все надземные части и корень, растение погибает. Но созревшие семена сохраняют всхожесть, поэтому нужно проводить обработки до цветения и формирования семян. Попадая в почву, глифосат необратимо адсорбируется ее частицами, поэтому в дальнейшем не представляет опасности для растений.

1.2.2 Применение

Глифосат-содержащие гербициды сплошного действия применяют для уничтожения вегетирующих сорных трав, кустарников, самосева и поросли деревьев с целью:

- искоренения инвазивных видов растений, распространение которых грозит деградацией существующим экосистемам;
- очистки железных дорог, трасс трубопроводов, обочин автодорог, других несельскохозяйственных земель, улиц, площадей и тротуаров в городах;
- очистки водоемов от нежелательной растительности;
- избавления от конкурентов сельскохозяйственных растений в садах, виноградниках и на полях до появления всходов, а также после всходов на посевах устойчивых к глифосату генетически модифицированных культур.

Иногда глифосат используется для высушивания растений перед уборкой (десикации), что вызывает более равномерное созревание.

1.2.3 Токсичность

Классификация ВОЗ (Всемирная организация здравоохранения) относит глифосат к малотоксичным веществам, для млекопитающих животных при проглатывании LD₅₀ (полуметальная доза) у крыс 5000 мг/кг, острая кожная LD₅₀ для кроликов 2000 мг/кг. Большие дозы в течение 30 минут – 2 часов вызывают у животных возбудимость, нарушение координации движений, изменение частоты сердечных сокращений; иногда приводят к коллапсу и смерти.

Проглатывание человеком более 85 мл концентрированного средства вызывает ожоги пищевода, повреждает печень и почки. При тяжелых отравлениях возможны нарушение сознания, отек легких, почечная недостаточность, шок, аритмия, смерть.

По данным Европейского химического агентства в рекомендуемых концентрациях глифосат не является канцерогеном и мутагеном, не влияет на репродукцию, не токсичен для отдельных органов. Данных о раздражении или повреждении кожи недостаточно. При попадании в глаза вызывает конъюнктивит, при вдыхании раздражает нос и горло [5].

Предполагаемое повышение риска онкологических заболеваний при профессиональном обращении с большими количествами глифосата не имеет убедительных доказательств и остается в стадии изучения.

Основной фактор, обеспечивающий адсорбирование глифосата почвенными частицами – уровень фосфата в почве, который приводит к связыванию молекул гербицида. Вещество конкурирует с неорганическим фосфатом за почвенные связывающие центры почвы. Степень его связывания зависит от доступности незанятых связывающих центров. Глифосат в адсорбированном состоянии практически не проявляет гербицидную активность, поэтому не следует высевать семена или высаживать растения на обработанные площади сразу после

использования препарата. К тому же глифосат не проявляет значимой довсходовой активности даже при применении высоких норм расхода.

В водных препаратах запрещен ПОЭА, он более токсичен для рыб и земноводных, чем глифосат. Полураспад ПОЭА в воде продолжается 21-42 дня, а глифосата 7-14 дней путем гидролиза.

Полураспад глифосата в почве длится в среднем 47 дней с участием микроорганизмов. Загрязнение грунтовых вод незначительно, частицы вещества адсорбируются частицами почвы, как и его метаболита аминометилфосфоновой кислоты [8].

В настоящее время отношение к вопросу безопасности глифосата неоднозначное; считается, что действующие стандарты могут быть опасны для здоровья населения или окружающей среды. ЕС примет решение о его использовании к концу 2023 года, Мексика планирует запрет с 2024, Вьетнам не использует с 2019, в Нидерландах с 2014 года запрещена продажа препаратов глифосата физическим лицам.

В России многие гербициды на основе солей глифосата разрешены для профессионального применения, в личных подсобных хозяйствах на 20.01.2021 г. разрешен только один препарат глифосата – Файтер.

В связи с адсорбированием глифосата почвенными частицами и его долгим периодом полураспада было принято решение подобрать штамм почвенных бактерий, имеющих фосфатмобилизирующую способность, и способных расщеплять глифосат, а также использовать его в качестве источника углерода. Для исследования фосфатмобилизирующей способности почвенных бактерий нам были предоставлены бактерии из внутренней коллекции УФИЦ РАН, а именно штаммы бактерий родов *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas*. В следующих подглавах будут разобраны морфологические и биологические свойства вышеописанных бактерий, чтобы понять их роль в исследовании.

1.3 Псевдомонады

Род *Pseudomonas* относится к группе грамотрицательных аэробных бактерий, они широко распространены в природе. Их можно встретить в воздухе, почве, морских и пресных водоемах, сточных водах и иле, нефти и на газовых месторождениях. Псевдомонады могут быть обнаружены на пищевых продуктах, животных и растениях. Кроме того, они могут появляться в экскрементах и гнойных ранах животных. Хотя псевдомонады чувствительны к некоторым дезинфектантам и изменениям температуры, они могут распространяться в госпиталях в виде эковаров синегнойной палочки, обладающих высокой устойчивостью к антибиотикам и антисептикам. Такие бактерии способны контаминировать лекарственные препараты и сохранять свою жизнеспособность даже в присутствии дезинфицирующих растворов и антисептиков.

Клетки Псевдомонад представляют собой мелкие одиночные грамотрицательные палочки, лишены спор и выростов, подвижны, имеют полярно расположенные жгутики, их число у разных видов колеблется.

Большинство бактерий рода *Pseudomonas* классифицируются как хемотротрофы, их источники энергии и углерода являются органические соединения. Процессы биосинтеза осуществляются через обмен окислителя типа, когда кислород действует в качестве конечного акцептора электронов, перенос которых связан с системой цитохромов. Однако, некоторые бактерии из этого рода могут сохранять свою жизнеспособность благодаря анаэробному нитратному дыханию, а другие колонизируют окружающую среду, используя энергию от окисления водорода. Кроме того, известны случаи синтеза витаминов, антибиотиков и токсинов, присутствующих в этом роде бактерий. [2].

Бактерии хорошо растут на простых питательных средах. Для выделения чистой культуры применяют селективные или

дифференциально-диагностические питательные среды с добавлением антисептиков. На жидкой питательной среде бактерии образуют характерную серовато-серебристую пленку на поверхности.

Колонии бактерий очень разнообразны и могут существовать в виде колоний различных форм и размеров: слизистые и пастообразные, выпуклые и плоские, крупные и мелкие. У многих видов при наблюдении в микроскопе можно заметить внутреннюю структуру колоний. Некоторые колонии могут иметь мелкозернистую или ячеистую структуру, в то время как другие выглядят как мелкие комочки или зерна. Однако большинство видов имеет колонии без внутренней структуры и выглядят как однородная гомогенная масса. Культуры издают запах, напоминающий аромат жасмина и при определенных условиях могут производить внеклеточную слизь полисахаридной природы, похожую на капсулу.

Многие виды псевдомонад образуют пигменты, различные по окраске и химической природе, и в основном в качестве пигментов выступают зеленый флюоресцеин и пиоциан, однако некоторые культуры могут образовывать и коричнево-красный пиорубин, красный эритроген, или черный меланоген, тогда как другие виды лишены пигмента. Данные пигменты способны окрашивать по-разному питательные среды при культивировании.

Биохимическая активность слабо выражена, что создает трудности при идентификации. В частности, они не способны производить индол и не ферментируют глюкозу и прочие углеводы. Однако, многие виды способны к окислению многоатомных спиртов и сахаров без образования газа. Часть бактерий характеризуется полной инертностью по отношению к глюкозе, тогда как другие окисляют ее путем последовательного превращения в ацетилкоэнзим А – соединение, входящее в цикл Кребса и обеспечивающий метаболические процессы в клетках аэробных микроорганизмов. Некоторые виды имеют ограниченную

протеолитическую активность, однако для некоторых других видов способность разжижать желатин и свернутую сыворотку является важным дифференциальным признаком. За редким исключением Псевдомонады оксидазоположительные, что свидетельствует о наличии у них в цепи транспорта электронов цитохрома с; оксидазонегативные микроорганизмы имеют лишь цитохромы а и b. Псевдомонады имеют О- и Н-антигены. Липополисахарид клеточной стенки является тип- или группоспецифическим термостабильным О-антигеном, на основе которого проводят серотипирование штаммов. Термолабильный жгутиковый Н-антиген бывает двух типов и обладает протективным свойством. Кроме того, на поверхности клеток находятся антигены пилей.

1.4 Стенотрофомоносы

Данные микроорганизмы относятся к семейству *Xanthomonadaceae* и роду *Stenotrophomonas*. Эти микроорганизмы – мелкие грамотрицательные палочки с наличием одного или нескольких полярных жгутиков и отсутствием спор. Кроме того, микробные клетки обладают внешним полисахаридным слоем.

Стенотрофомоносы растут на стандартных питательных средах и кровяном агаре, для роста в госпитальной среде требуется присутствие цистеина или метионина. Колонии возбудителей гладкие и имеют зеленовато-коричневый пигмент.

Эти микроорганизмы являются строгими аэробами, тип метаболизма – окислительный. Они каталазоположительны, однако отрицательны по оксидазной реакции. Кроме того, они продуцируют ферменты патогенности, такие как эластаза, фибринолизин, ДНКаза, гиалуронидаза и липаза. Наконец, ЛПС клеточной стенки этих бактерий обладает свойствами эндотоксина.

Повсеместно распространены в окружающей среде. Места обитания – вода, почва, растения, бактерии обнаруживаются на пищевых продуктах. Бактерии активно образуют биопленку, в том числе на поверхности дренажей, катетеров и систем для внутривенного введения, а также могут содержаться в растворах для инъекций и гемодиализа. Одна из наиболее характерных особенностей этих бактерий заключается в их множественной природной устойчивости к антибиотикам и антисептикам. Они устойчивы ко многим β -лактамам, включая карбапенемы, а также аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам и левомицетину.

Резистентность к карбапенемам обусловлена продукцией хромосомных металло-бета-лактамаз, а устойчивость к другим группам антибиотиков реализуется благодаря снижению проницаемости наружной мембраны и активному обратному транспорту антибиотиков (эффлюксом). Бактерии обладают высокой генетической вариабельностью, что позволяет им быстро приспосабливаться к условиям окружающей среды. Оба вида бактерий относят к группе ризобактерий, которые способствуют росту растений. (PGPR). Их использование в качестве инокулянтов обеспечивает экологически устойчивый подход к увеличению продуктивности сельскохозяйственных культур. [6].

1.5 Токсическое действие глифосата

1.5.1 Глифосат и пути его катаболизма.

Быстрый рост разнообразия и масштабов производства синтетических фосфонатов – стабильных соединений, содержащих в своей структуре прямую углерод-фосфорную связь (C–P), – сделал их опасными загрязнителями окружающей среды. Наиболее распространенными представителями этой группы ксенобиотиков являются гербициды на основе глифосата (N-фосфонометилглицин, ГФ). ГФ является уникальным ингибитором 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (ЕПФС), ключевого фермента шикиматного пути биосинтеза ароматических соединений у растений и некоторых микроорганизмов. Ингибирование

ЕПФС подавляет синтез белков и вторичных метаболитов (флавоноиды, лигнин, кумарины) и вызывает нарушение регуляции энергетического обмена.

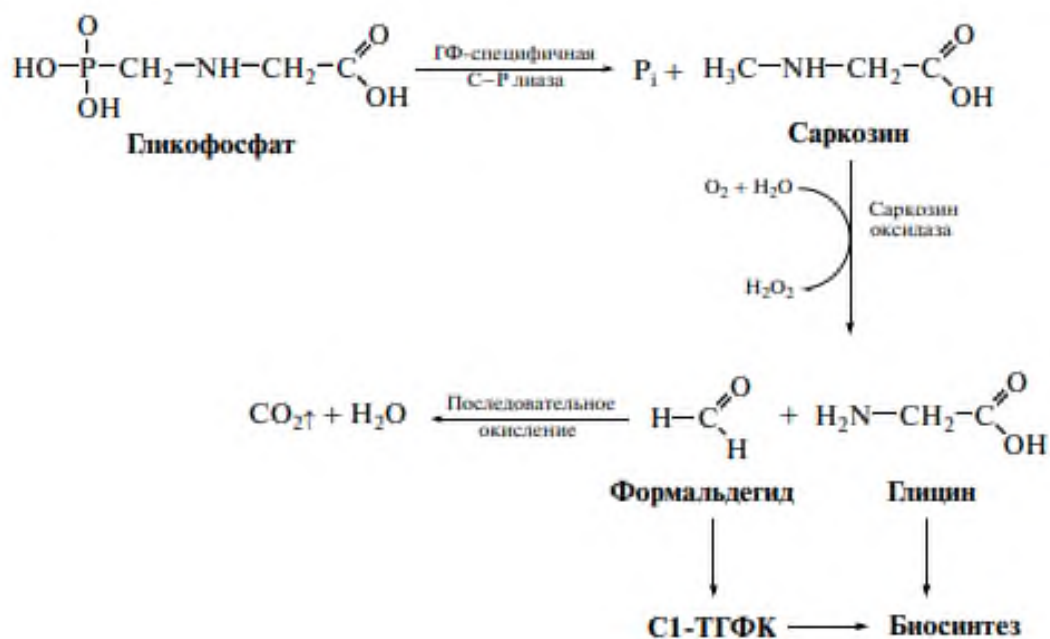
Распространению гербицидов на основе ГФ способствовало, с одной стороны, появлению устойчивых к ГФ трансгенных сортов важнейших сельскохозяйственных культур (соя, рапс, кукуруза, пшеница, сахарная свекла, хлопчатник и др.) – до 90 % урожая все культивируемые трансгенные растения растений мира. Интенсивное использование ГФ привело к его накоплению в почве и водной среде. Кроме того, стали появляться сообщения об отрицательном влиянии ГФ на метаболизм животных, особенно в отношении хронического и длительного воздействия. Основным продуктом деструкции ГФ в природе, АМФК нарушает репарацию ДНК и синтез мРНК у животных и растений. При этом и ГФ и АМФК в сублетальных дозах обнаруживаются в плодах и побегах культурных растений. Данные о безвредности воздействия ГФ на почвенную микробиоту опровергнуты исследованиями, показавшими широкий спектр физиологических реакций почвенных микроорганизмов на воздействие ГФ. Особенно в почвах, загрязненных ГФ, микробиота проявляла большую устойчивость к его токсическому действию и значительно отличалась от нормальных почв по видовому составу.

Эффективным способом удаления ГФ из почвы и водной среды может стать его биodeградация с помощью аборигенных или интродуцированных опасных деструкторов. Однако сведения о метаболических путях катаболизма фосфонатов ограничены, их регуляция и свойства проявляются ферментами.

Ряд изученных бактерий утилизирует ГФ в качестве источника фосфора, что позволяет выявить наличие ферментов, расщепляющих C–P соединения. Редкими исключениями являются мутантный штамм *Arthrobacter* spp. GLP-1/Nit, который использовал ГФ как источник азота, а также *Streptomyces* spp. StC и *Achromobacter* spp. LW9, способные

использовать ГФ в качестве источника углерода. Наблюдаются два ферментативного расщепления ГФ у бактерий «прямое» расщепление связи C–P с образованием саркозина и неорганического фосфора (P_i) (рисунок 1.2), и расщепление C–N связи с образованием глиоксилата и АМФК (рисунок 1.3). Химическая инертная C–P связь продолжается сложно организованным многокомпонентным ферментативным комплексом, который присутствует в виде C–P лиаза. Действие наиболее изученной C–P лиазы *E. coli* определяется продуктами 14 генов, организованных в *phn*-оперон. Входят компоненты, обеспечивающие транспорт фосфонов в пищеварительном тракте, регуляторные, вспомогательные компоненты и, собственно, ферменты, катализирующие расщепление C–P связи. Последний фактически формирует метаболический путь, который ищет трансформацию промежуточных продуктов до и, возможно, после расщепления связи C–P. Согласно первым представлениям о неспецифичности C–P лиазы один и тот же мультиферментный комплекс расщеплял целый ряд аминоксилфосфонатов, включая ГФ, до P_i и соответствующего (амино)углеродного остатка. Однако характер утилизации ГФ по C–P лиазному пути у изученных штаммов-деструкторов заметно отличался от такового для прочих фосфонатов. Это позволило предположить существование двух C–P лиаз, одна из которых аналогична C–P лиазе *E. coli* и специфична в отношении (амино)алкилфосфонатов но не ГФ, а другая расщепляет C–P связь только у ГФ с образованием саркозина и P_i , причем обе системы индуцировались и функционировали независимо друг от друга. Впервые это было показано на примере *Arthrobacter* sp. GLP-1, а затем наличие ГФ-специфичной C–P лиазы, расщепляющей ГФ с образованием саркозина, было показано в работе у *Achromobacter* sp. MPS 12A. По-видимому, существует более, чем две разновидности C–P лиаз у бактерий. В геноме *Pseudomonas stutzeri* были найдены два разных оперона

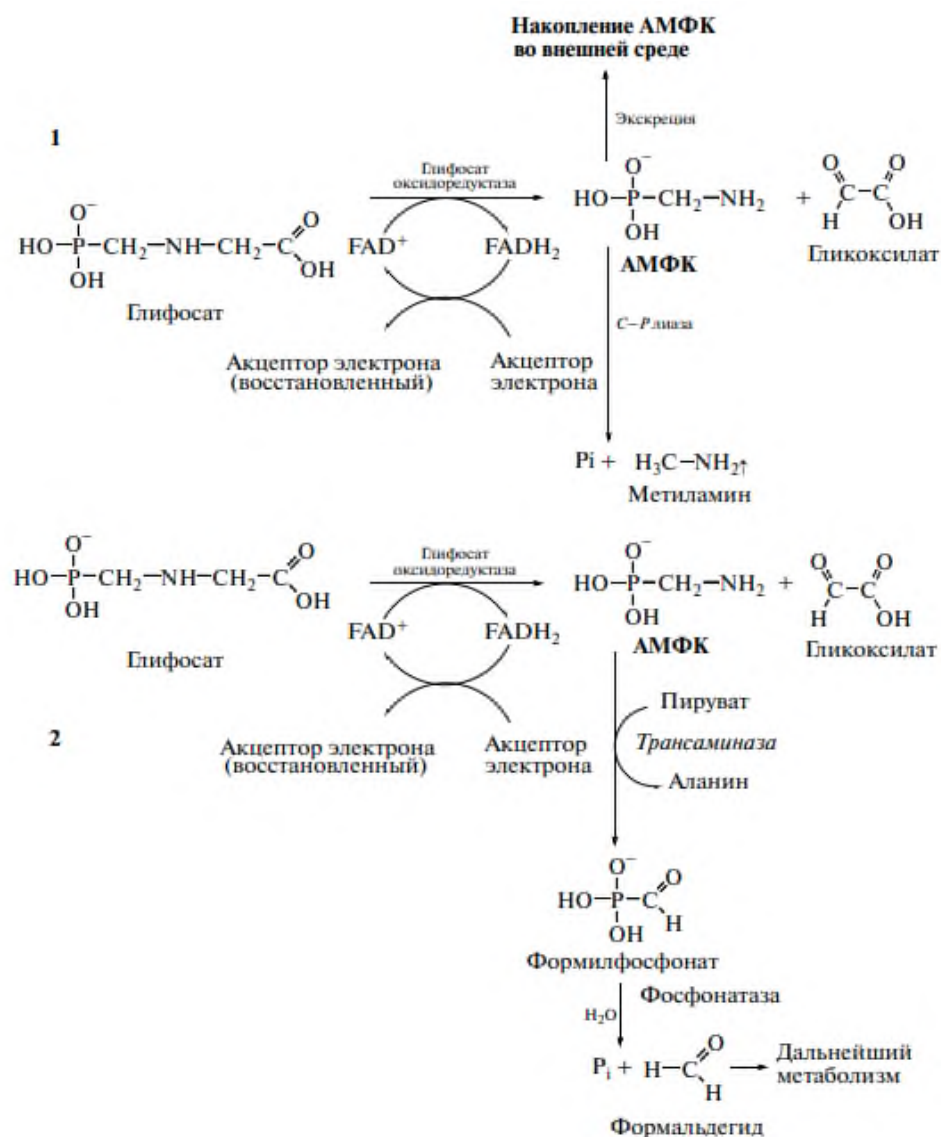
C–P лиазы, определяющие разную субстратную специфичность, причем обе C–P лиазы не разлагали ГФ.



ТГФК – тетрагидро-фолиевая кислота

Рисунок 1.2 – C–P лиазный путь метаболизма [78]

Механизм расщепления ГФ по C–P лиазному механизму еще мало охарактеризован с биохимической и молекулярно-биологической точек зрения и обсуждается лишь по аналогии с уже известными реакциями C–P лиазного пути у *E. coli*. В частности, остается неясным вопрос о происхождении столь узко специфичного для ГФ ферментного комплекса.



1 – путь, характерный для большинства изученных бактерий; 2 – новый путь минерализации ГФ у *O. anthropi* GPK 3

Рисунок 1.3 – ГОР- путь метаболизма ГФ

1.5.2 Микробная деградация глифосата.

Наиболее распространенное явление при попадании ГФ в природную среду (как в почве, так и в воде), а также при трансформации ГФ в очистных сооружениях – это расщепление С–N связи в его структуре с образованием эквимольных количеств АМФК. По-видимому, важную роль в этом процессе играет взаимодействие разных групп микроорганизмов, т.к. подавляющее большинство бактериальных

штаммов, изолированных из таких сообществ, не способно использовать ГФ как источник фосфора в чистых культурах.

Первым среди штаммов, утилизирующих ГФ как источник фосфора, был выделен *Pseudomonas* spp. PG2982, который метаболизировал ГФ до саркозина и P_i . Среди бактерий, превращающих ГФ в АМФК, также был обнаружен ряд штаммов, использующих оба эти соединения как источники фосфора. Накопленные данные по бактериальной деградации ГФ позволяет сделать ряд обобщений:

1. Большая часть изученных бактерий, как лабораторных, так и штаммов дикого типа, превращают ГФ в АМФК. Причем такой механизм обнаруживается даже у бактерий, ранее никогда не контактировавших с ГФ;

2. У штаммов-деструкторов ГФ продукт распада АМФК чаще всего не подвергается минерализации, а экскретируется во внешнюю среду;

3. Распространены штаммы, потребляющие АМФК как источник фосфора, но не способные деградировать сам гербицид. Это позволяет предположить, что ферменты, превращающие ГФ в АМФК, появились и эволюционировали независимо от ферментов фосфорного метаболизма;

4. Саркозиновый путь метаболизма ГФ обеспечивает утилизацию гербицида как источника P_i . Однако процесс расщепления С–Р связи ГФ жестко регулируется концентрацией эндо- и экзогенного P_i и потому функционирует, как правило, в условиях фосфорного голодания, редко встречающегося в природных условиях.

Эти факты указывают на значительное разнообразие ферментных путей деградации ГФ у бактерий и механизмов их регуляции.

1.6 Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) и возможности их применения

Ассоциативный симбиоз состоит из бактерий, колонизирующих ризосферу и ускоряющих рост растений с помощью различных механизмов, которые называются ризобактериями, способствующими росту растений (от Plant Growth-Promoting Rhizobacteria или PGPR – ризобактерии, способствующие росту растений). PGPR представляют собой большую группу бактерий, влияющих на прорастание семян, увеличение массы растений и повышение урожайности. Применение PGPR в сельском хозяйстве позволяет снизить уровень использования химических удобрений, пестицидов, увеличить рост важных сельскохозяйственных культур. и подавлять рост патогенов растений, в том числе патогенных грибов. Кроме того, обработка растений PGPR вызывает у них развитие защитных механизмов, например, приводя к состоянию индуцированной системной стабильности (ISR). Индуцированная системная устойчивость запускает защитные механизмы растений, направленные на борьбу с патогенами.

К PGPR-бактериям принадлежат микроорганизмы, относящиеся к следующим родам: *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Phyllobacterium*, *Xanthomonas* и *Vario-vovax*. Наиболее широко из них изучены *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*.

PGPR-бактерии характеризуются положительными (прямыми и косвенными) действиями на растения. К прямым относится синтез бактериями некоторых метаболитов (ауксинов, цитокининов и гиббереллинов), индукция 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) деаминазы, продуцирование сидерофоров, синтез антибиотиков и цианида водорода (HCN), летучих и гормоноподобных соединений. Косвенные

механизмы включают растворение минералов (например, фосфора), индукцию системного защитного ответа, а также облегчение усвоения растениями различных питательных веществ из окружающей среды, например, растворение фосфатов и фиксация атмосферного азота.

PGPR могут выступать в качестве эффективного стимулятора роста и урожайности растений путем улучшения ризобияльной фиксации атмосферного азота. Одна из наиболее значимых черт ризобактерий – несимбиотическая фиксация азота, и некоторые исследователи полагают, что ризобии способны фиксировать азот и в ассоциативном симбиозе с небобовыми растениями. Была обнаружена редукция ацетилена в растениях риса, инокулированных *Bradirhizobium* sp., *A. caulinodans*. При обработке целлюлазой и пектолиазой корневых волосков проростков риса, рапса и пшеницы в присутствии ризобий получили псевдоклубеньки. Нитрогеназная активность была обнаружена только на рапсе, псевдоклубеньки которого были морфологически и структурно подобны клубенькам бобовых. Также влияние ризобий было изучено на репе: обработка семян штаммами ризобий значительно увеличивало их всхожесть (от 26 до 64 % выше показателя контрольных растений). Кроме того, было показано положительное влияние ризобий на рост проростков репы. Такие результаты подтверждают положительное влияние PGPR-бактерий на всхожесть и рост бобовых растений.

Глава 2. Материалы и методы

Оценку влияния интродукции штаммов псевдомонад на содержание подвижных форм фосфора в грунте проводили в модельном эксперименте. В нестерильную почву (pH 7.2) и стерильный песок (pH 7.4) добавляли ортофосфат кальция (0.5 масс. %) и увлажняли до 60% от полной влагоемкости. Опытные варианты инокулировали жидкой культурой бактерий с титром $\sim 10^9$ КОЕ/мл из расчета $2-3 \times 10^6$ КОЕ/г субстрата. В сосуды с песком дополнительно вносили 100 мл 2%-го раствора сахарозы. Почва – чернозем сегрегационный, содержание гумуса (по Тюрину) – 4.2%, обеспеченность подвижными формами калия (по Чирикову) – 8.2 мг/100 г, содержание общего азота (по Кьельдалю) – 0.5%. После внесения $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ начальное содержание подвижного фосфора (по Чирикову) в песке составило 9.2 мг/кг, в почве – 40.3 мг/кг. Количество повторностей равнялось четырем, продолжительность эксперимента составила восемь недель. Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных программ MS Excel. В таблицах данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка.

Для первичного тестирования толерантности к глифосату использованы двухсуточные культуры коллекционных фосфатрастворяющих ризобактерий, выращенные на картофельном агаре (28 °C). При соблюдении правил асептики в конические колбы (объем 300 мл) вносили стерильный (110 °C, 20 мин) раствор гербицида глифосата различных концентраций, затем приливали по 100 мл расплавленной питательной среды Муромцева, тщательно перемешивали и разливали в чашки Петри (20 мл в каждую). Концентрации глифосата в питательных средах составили (мг/мл): 0, 1,5 (C1), 3,0 (C2), 6,0 (C3), 8,0 (C4) и 10,0 (C5). После застывания питательной среды чашки Петри подсушивали. Культуры бактерий высевали методом штриха и инкубировали в термостате (37 °C) одни сутки. Периодичность визуального мониторинга

активности роста ризобактерий – каждые сутки. Повторность в опытах пятикратная.

Для культивирования ризосферных бактерий была использована среда Муромцева (г/л): глюкоза – 10,0; аспарагин – 1,0; K₂SO₄ – 0,2; MgSO₄*7H₂O – 0,4; дрожжевой экстракт – 0,5; агар – 17,0; вода дистиллированная – до 1 л, непосредственно перед использованием в стерилизованную среду добавлены CaCl₂*6H₂O – 3,4 и Na₂PO₄*12 H₂O – 3,8, pH 6,8. Позже в чашки были добавлены растворы глифосата с концентрациями 1,5, 3,0, 6,0, 8,0, 10,0 мг/мл, после чего посеяли штаммы почвенных бактерий: *Pseudomonas* OBA 2.4.1, *Pseudomonas* OBA 2.9, *Pseudomonas* GOR 4.17, *Pseudomonas* STA 3, *Pseudomonas* 17 НМ, *Pseudomonas* 65 НМ, *Pseudomonas* 67 НМ, *Pseudomonas* 33 FOS, *Pseudomonas* 38 FOS, *Stenotrophomonas* OBA 2.13, *Stenotrophomonas* OBA 2.1, *Stenotrophomonas* 23, *Stenotrophomonas* 102 и *Stenotrophomonas* 103. Все чашки поставили культивироваться в термостат при температуре 37°С на сутки. Через сутки был измерен индекс солюбилизации (IS) с помощью формулы $IS = \frac{\text{Ø гало (мм)}}{\text{Ø колоний (мм)}}$.

Всесторонне изучая фосфатмобилизирующие микроорганизмы, ученые пришли к выводу, что некоторые из них могут быть использованы для биоремедиации загрязненных тяжелыми металлами почв. Так, Teng с соавторами выяснили, что резистентный к свинцу штамм *Leclercia adecarboxylata* L 1-5, индуцируя солюбилизацию фосфатов, тем самым способствует иммобилизации токсичного металла с превращением его в гидроксиапатит и пироморфит. Среди штаммов, описываемых в статье, наибольшую толерантность к свинцу показали IB 51 и АНТ 17.

Скрининг изолятов ризобактерий родов *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas* по способности использовать глифосат в качестве источника углерода для метаболизма. Скрининг включал несколько этапов. На первом этапе оценку роста ризобактерий проводили на твердой питательной среде Муромцева, в которой источником углерода служил

глифосат. Для большинства зональных изолятов *Pseudomonas* spp. и *Stenotrophomonas* spp. отмечено слабое развитие на среде Муромцева, содержащей глифосат в качестве единственного источника углерода, либо рост вовсе отсутствовал. Результаты скрининга показали, что не все фосфатрастворяющие бактерии нашей коллекции практически не способны использовать глифосат как единственный источник углерода для метаболизма.

2.1 Методы исследований

2.1.1 Выделение штаммов *Pseudomonas* spp.

Штамм *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 получен при выделении микроорганизмов из ризосферы остролодочника башкирского (*Oxytropis baschkiriensis*) с помощью гомогенизации образцов почв в стерильной среде LB, дальнейшим пересевом и росте при 28 °С. Инкубировали при 28 °С в термостате.

2.1.2 Приготовление накопительной культуры.

Для получения накопительной культуры в конические колбы объемом 250 мл, содержащие жидкую среду LB (90 мл) с разными концентрациями Cd^{2+} и Ni^{2+} (5, 10, 15, 25 %), выбранными в соответствии с классификацией микроорганизмов по устойчивости к соли, добавляют образцы в жидкой (10 мл) либо твердой (10 г) форме и культивируют в шейкере-инкубаторе при 30 или 37 °С в течение 3–7 суток (170 об/мин).

По окончании времени инкубации выполняют разведение взвеси микроорганизмов методом серийных разведений (рисунок 2.1), для чего в условиях стерильности проводят отбор 1 мл взвеси клеток из накопительной культуры и выполняют следующие процедуры:

1 по 1 мл обогащенной культуры асептически пипетируют в 4-х пробирках с 9 мл стерильного фосфатно-солевого буфера в каждой, различающихся содержанием Cd^{2+} и Ni^{2+} (5, 10, 15, 25 % соответственно),

что позволяет получить 10-ти кратное разведение культуры бактерий (разбавление 10^{-1});

2 затем берут по 1 мл взвеси бактерий, полученных на предыдущем этапе, и последовательно не менее шести раз повторяют аналогичные процедуры разведения, что позволяет получить кратные разбавления ($10^{-2} - 10^{-8}$);

3 начиная с разведения 10^{-5} , отбирают по 1 мл взвеси бактерий и помещают в стерильные пустые чашки петри (90 мм), в которые затем добавляют стерильную агаризованную среду LB (20 мл), разогретую, а затем остуженную до температуры 50–55 °С, содержащую Cd^{2+} и Ni^{2+} , в концентрации, соответствующей той, в которой находилась взвесь бактерий. Суспензию бактерий равномерно распределяют в среде, и оставляют до полного затвердевания среды;

4 затем чашки Петри инкубируют при 28 и 37 °С в термостате в течение от 3 дней до 2 недель. В качестве контроля стерильности среды в термостате выдерживают не инокулированную чашку с агаризованной средой;

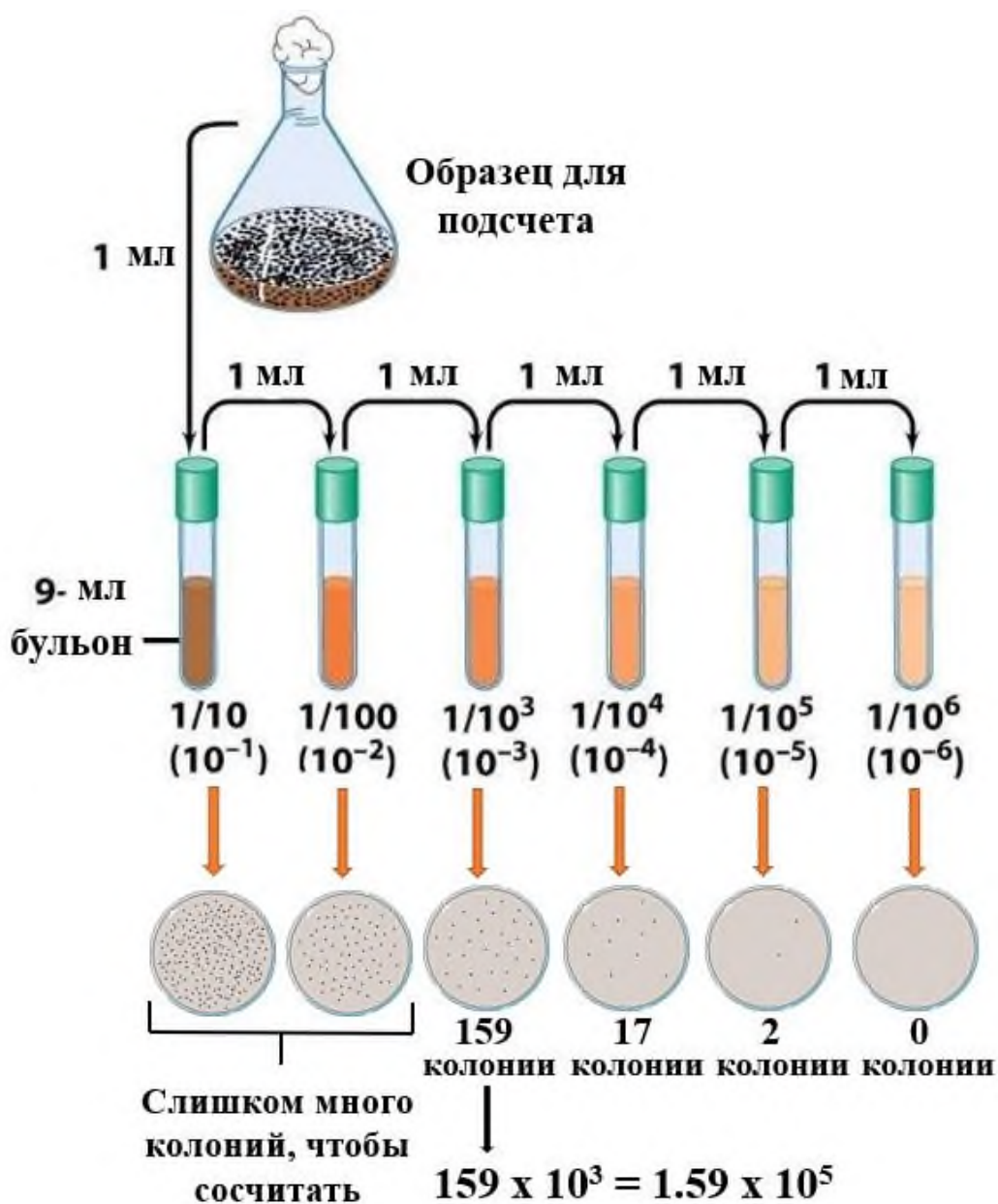


Рисунок 2.1 – Схема разведения накопительной культуры.

5 по мере роста микроорганизмов из накопительной культуры отбирают колонии, растущие на поверхности среды (аэробные). Эти колонии собирают с помощью микробиологической петли и рассеивают на другие чашки Петри со средой аналогичного состава для получения индивидуальных колоний чистых культур (рисунок 2.2).

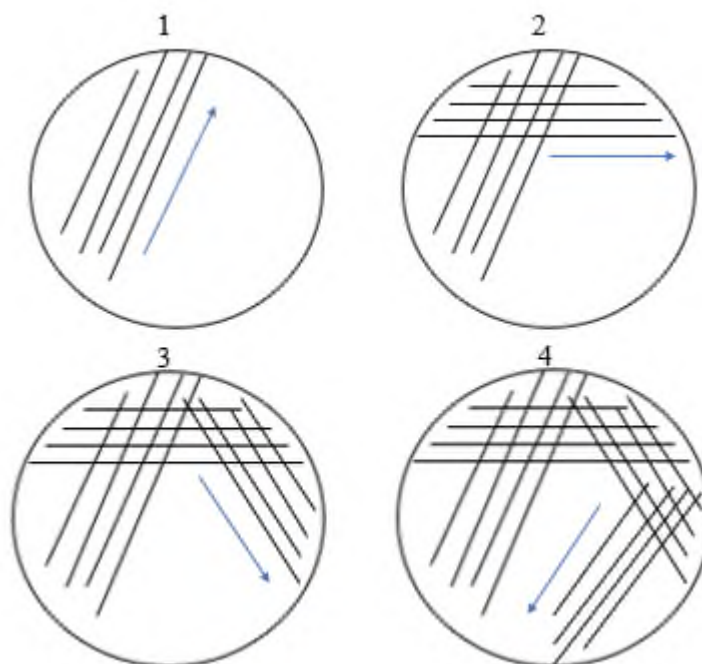


Рисунок 2.2 – Схемы штриховки микробиологической петлём при посеве для получения индивидуальных колоний микроорганизмов.

2.1.3 Выделение и очистка ДНК бактерий.

Для выделения высокомолекулярной бактериальной ДНК ризобий использовали метод Грэхэма с некоторыми модификациями. Культуры бактерий выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл в 100 мл питательного бульона ТУ при постоянном встряхивании для обеспечения достаточной аэрации при 28 °С в течение ночи. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 4000g, 4 °С, суспендировали в 10 мл буфера следующего состава: 100 мМ трис-НСl, рН 8,5, 20 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), 15 % сахароза и 5 мг/мл лизоцима. После инкубации в течение 15 мин при 0 °С, добавляли 10 мл лизирующего раствора (2 %-ный додецилсульфат натрия) и 10 мг/мл протеиназы К) и инкубировали в течение 2 часов при 55 °С. К полученному раствору добавляли равный объем смеси 80 % свежеперегнанного фенола, хлороформа и изоамилового спирта, взятых в

соотношении 25:24:1, и проводили депротеинизацию и очистку ДНК как описано выше для ДНК растений.

Для рутинных ПЦР анализов использовали также быстрый метод выделения ДНК из бактерий лизированием клеток в 1 % TritonX100 и 1 % суспензии Chelex100. Для этого в 1,5 мл пробирки со 100 мкл 1 % TritonX100 и 1 % суспензии Chelex100 помещали небольшое количество бактериальной массы и после суспензирования инкубировали при температуре 95 °С 10 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 12000g в течение 3 мин. Надосадочную жидкость брали в качестве матрицы для ПЦР.

2.1.4 Молекулярно-генетическая идентификация бактериальных штаммов.

Для идентификации выделенных бактерий был амплифицирован ген 16S рРНК с использованием универсальных праймеров fD1 5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3' и rD1 5'-CCGAATTCGTGCGACAACAGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3'. Для амплификации фрагмента гена *rpoD* были использованы праймеры PsEG30F5'-ATYGAAATCGCCAARCG-3' и PsEG790R5'-CGGTTGATKTCCTTGA-3'.

Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3500 фирмы «Applied Biosystems, Inc.» (США) с использованием наборов «Big Dye Terminator v. 3.1». Анализ проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergene фирмы «DNASTAR, Inc.» (США). Нуклеотидные последовательности для сравнительного анализа были взяты из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Компьютерный анализ фрагментов последовательностей ДНК проводили с использованием метода множественного выравнивания Clustal W в программе Megalign Lasergene (DNASTAR, США).

2.1.4 Фосфатмобилизация и сидерофорная активности

Определение способности штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 к мобилизации неорганического фосфора проверяли на чашках со средой Муромцева, содержащей нерастворимый фосфат. В качестве источника фосфора в среду добавляли $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\text{AlPO}_4$ в концентрации 5 г/л. Суточную культуру бактерий наносили в виде капли на поверхность агаризованной среды, инкубировали при температуре 28 °С.

Минимальную среду с CAS-реактивом (синий агар) готовили с некоторыми модификациями. Для приготовления 100 мл среды 6,5 г хромазуrolа S растворяли в 5 мл воды и смешивали с 1 мл раствора, содержащего 1 мМ FeCl_3 и 10 мМ HCl . После этого к раствору хромазуrolа добавляли 4 мл раствора, содержащего 7,3 мг НDTМА. Полученную смесь автоклавировали и добавляли в стерильную среду LB. На полученном «синем агаре» выращивали бактерии в течение 2 суток. Изменение окраски на желтую, оранжевую или розовую выявляло выделение сидерофоров.

Глава 3. Результаты и обсуждение

В ходе исследования, необходимого для определения устойчивости ризобактерий к глифосату, были проведены начальные этапы тестирования. Они предполагали качественную оценку показателей роста бактерий на твердых питательных средах с увеличивающимися концентрациями глифосата. Это позволило провести надежную оценку устойчивости ризобактерий. В результате были получены важные данные о воздействии глифосата на рост бактерий (табл. 1).

Табл 1. Показатели роста почвенных бактерий в зависимости от содержания глифосата в плотной питательной среде Муромцева

Штаммы	Концентрация глифосата в питательной среде, мг/мл				
	1,5	3,0	6,0	8,0	10,0
<i>Pseudomonas</i> OBA 2.4.1	+++	+++	++	+	+
<i>Pseudomonas</i> OBA 2.9	+++	+++	++	+	-
<i>Pseudomonas</i> GOR 4.17	+++	+++	++	+	+
<i>Pseudomonas</i> STA 3	+++	+++	++	+	+
<i>Pseudomonas</i> 17 HM	+++	++	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> 65 HM	++	+	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> 67 HM	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> 33 FOS	+++	++	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> 38	++	+	-	-	-

FOS					
<i>Stenotrophomonas</i> OBA 2.13	++	+	-	-	-
<i>Stenotrophomonas</i> OBA 2.1	+	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas</i> 23	++	++	-	-	-
<i>Stenotrophomonas</i> 102	+++	+++	+++	+++	++
<i>Stenotrophomonas</i> 103	+++	+++	++	++	+

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

В состав данной группы входят ризобактерии, способные адаптироваться к условиям с низким содержанием фосфора и продолжать расширять свою биомассу. Среди них выделяются зональные фосфатрастворяющие изоляты, которые могут выживать при отсутствии стандартных источников фосфора. Значительным явлением является возможность зональных изолятов *Pseudomonas* spp. развиваться на средах с глифосатом без использования традиционных фосфатных источников. Это свидетельствует о способности микроорганизмов использовать гербицид для собственного метаболизма.

Как и следовало ожидать, в условиях минеральной питательной среды показатели роста фосфатмобилизующих ризобактерий на такой среде ниже, чем в условиях роста на неорганических фосфатах. Эффект замедления роста бактерий на минеральных средах с глифосатом подтверждается исследованиями, опубликованными в литературе. Формирование такого эффекта может объясняться тем, что внесение глифосата является химическим стрессом для микроорганизмов.

Поэтому, наличие глифосата как единственного источника фосфора в питательной среде может ограничить рост ризобактерий.

Принцип действия гербицида глифосата на клеточный метаболизм почвенных микроорганизмов вызывает негативные последствия для состава и активности этих организмов. По шикиматному пути глифосат ингибирует биосинтез ароматических аминокислот, таких как тирозин, триптофан и фенилаланин, что приводит к дальнейшему ухудшению жизнедеятельности микроорганизмов [4]. В результате, только отдельные штаммы ризобактерий из одного рода могут быть устойчивыми к действию глифосата, метаболизировать его и продолжать свое существование. Стоит отметить, что устойчивые к глифосату бактерии также испытывают замедленный рост и наличие латентного периода, что свидетельствует о том, что даже устойчивость к этому гербициду не гарантирует полноценное развитие микроорганизмов. Этим тема исследования негативного влияния глифосата на почвенные микроорганизмы остается актуальной и вызывает волну интереса у ученых для дальнейшего изучения [3].

Таким образом, по результатам скрининга в условиях культивирования на твердой питательной среде Муромцева, содержащей глифосат как единственный источник фосфора, определены перспективные целевые объекты среди зональных фосфатмобилизирующих ризобактерий: *Pseudomonas* OBA 2.9, *P. GOR* 4.17 и *P. STA* 3, способные метаболизировать гербицид глифосат. Штамм *Pseudomonas* spp. OBA 2.4.1 не образовывал светлое гало вокруг колоний, что говорит об отсутствии мобилизующей активности данного штамма. Хотя именно данный штамм показывал хороший ростостимулирующий эффект на растениях гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и люцерны посевной (*Medicago sativa* L.). Остальные штаммы показали разный рост: у штамма OBA 2.9 IS = 1,39, у штамма GOR 4.17 IS = 1,58, у штамма STA 3 IS = 2,05. Самый высокий рост среди Псевдомонад выявлен у штамма *Pseudomonas* spp. STA 3.

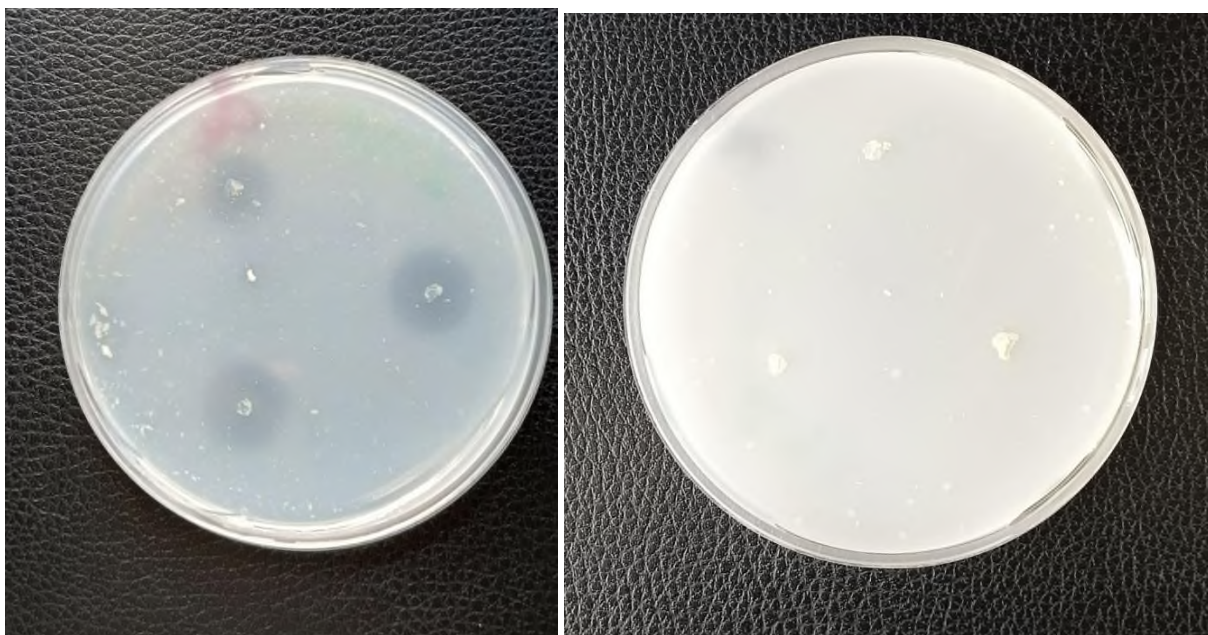


Рис. 1. Определение фосфатмобилизующей активности бактерий на среде Муромцева с разными фосфатами: 1 – с добавлением $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 2 – с добавлением AlPO_4

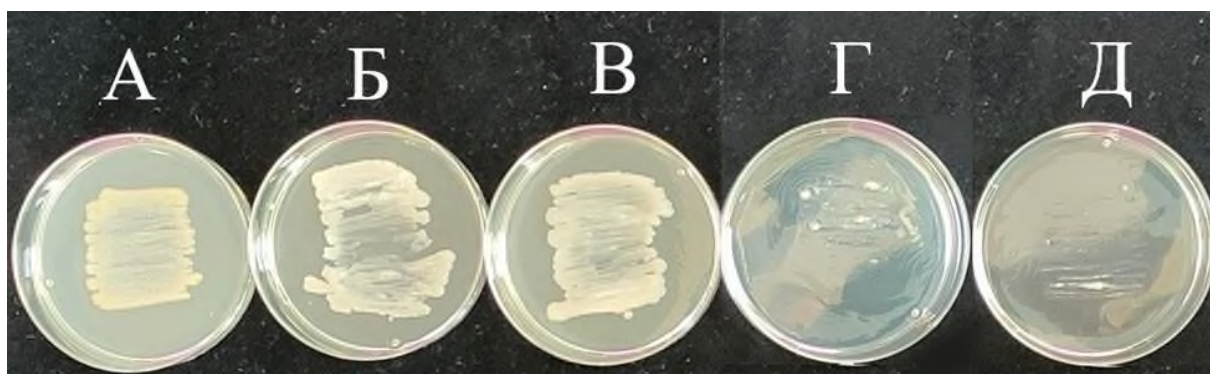


Рис. 2. Рост бактерий при стрессовом воздействии глифосата: А-контроль; Б – 3 мг/мл; В – 6 мг/мл; Г – 8 мг/мл; Д – 10 мг/мл

Среди бактерий рода *Stenotrophomonas* положительный рост на средах с добавлением высоких концентраций глифосата дали 2 штамма из 5: *Stenotrophomonas* 102 и *Stenotrophomonas* 103. Самый высокий индекс солюбилизации среди Стенотрофомоносов и вообще всех исследуемых ризосферных бактерий выявлен у *Stenotrophomonas* 103.

По данным результатам можно сделать вывод, что исследуемые штаммы могут сольюбилизовать фосфаты натрия в разной степени начиная уже с первых суток роста на среде.

Негативное влияние глифосата на состав и активность почвенных микроорганизмов связано с принципом его действия на клеточный метаболизм. Глифосат – единственный гербицид, который ингибирует клеточный биосинтез ароматических аминокислот (тирозин, триптофан, фенилаланин) по шикиматному пути [4]. В пределах одного рода ризобактерий лишь отдельные штаммы являются устойчивыми к действию глифосата и способны его метаболизировать. По литературным данным даже для устойчивых к глифосату бактерий отмечается замедленный рост и наличие определенного латентного периода. Важной физиологической особенностью процесса деградации фосфонатов, и глифосата, в частности, является необходимость периода адаптации микробных клеток к этому гербициду. Уже на начальных этапах исследований по биodeградации ГФ было установлено замедление роста и наличие определенного латентного периода, прежде чем бактерия начинает метаболизировать глифосат. Современная научная литература свидетельствует о негативном действии глифосата на состав и свойства почвенных микроорганизмов. Под действием глифосата элиминируется число культурных бактерий и грибов на загрязненных пестицидом почвах.

Выводы

Представлены результаты исследования зональных изолятов фосфатрастворяющих ризобактерий по оценке устойчивости к глифосату на твердой питательной среде Муромцева, содержащего глифосат как источник фосфора. По результатам скрининга среди зональных изолятов *Pseudomonas* spp. и *Stenotrophomonas* spp. отобраны перспективные целевые объекты, способные метаболизировать гербицид глифосат как источник фосфора для роста. Выявлен самый эффективный штамм, способный метаболизировать глифосат как источник фосфора и способный к фосфатмобилизации: *Stenotrophomonas* 103.

Список литературы:

1. Галлямова О.В. Глифосат / [Электронный ресурс] // Пестициды.ru: [сайт]. – URL: https://www.pesticidy.ru/active_substance/glyphosate.
2. Кузьмина Л.Ю., Архипова Т.Н., Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Четвериков С.П., Мелентьев А.И. Бактерии родов *Advenella*, *Bacillus* и *Pseudomonas* – перспективная основа биопрепаратов для растениеводства. *Биомика*. 2018.
3. Н. А. Михайловская, Т. Б. Барашенко, Т. В. Погирницкая, С. В. Дюсова – Скрининг зональных изолятов *pseudomonas* sp. по устойчивости к глифосату и его утилизации как источника углерода и фосфора. – 2021. – С. 35-48.
4. Ю.А.Чугунова Изменения функциональных свойств пестицидов при их биотрансформации бактериями рода *Rhodococcus*. – 2020. – с. 17-20
5. Castrejón-Godínez, M.L.; Tovar-Sánchez, E.; Valencia-Cuevas, L.; Rosas-Ramírez, M.E.; Rodríguez, A.; Mussali-Galante, P. Glyphosate Pollution Treatment and Microbial Degradation Alternatives, a Review. *Microorganisms* 2021, 9, 2322.
6. Constanza Belén Lobo, María Silvina Juárez Tomás, Emilce Viruel, Marcela Alejandra Ferrero, María Ester Lucca – Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. – 2019.
7. Costas-Ferreira, C.; Durán, R.; Faro, L.R.F. Toxic Effects of Glyphosate on the Nervous System: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 4605.
8. Maria Celina Zabaloy, Marco Allegrini, Keren Hernandez Guijarro, Filipe Behrends Kraemer, Hector Morras, Leonardo Erijman. Microbiomes and glyphosate biodegradation in edaphic and aquatic environments: recent issues and trends, 2022.
9. Haslam, E. The shikimate pathway: biosynthesis of natural products series. Elsevier, New York. 2014. Hui Zhan, Yanmei Feng, Xinghui Fan,

Shaohua Chen. Recent advances in glyphosate biodegradation / E. Haslam // Applied Microbiol. Biotech. – 2018. – Vol. 102. – P. 5033–5043.

1. Grass G. B. Control of expression of a periplasmic nickel efflux pump by periplasmic nickel concentrations // Biometals. – 2005. – Vol 18, №1. – P. 437–448

2. Marrero J. High-level resistance to cobalt and nickel but probably no transenvelope efflux: metal resistance in the *Cuban Serratia marcescens* strain C-1 // Microb. Ecol. – 2007. – Vol 53, № 1. – P. 123–133.

3. Tripathi V.N. Extracytoplasmic storage as the nickel resistance mechanism in a natural isolate of *Pseudomonas putida* S4 // Can. J. Microbiol. – 2006. – Vol. 52, № 4. – P. 287–292.

4. Patel J.S. Isolation and characterization of nickel uptake by nickel resistant bacterial isolate // Biomed. Environ. Sci. – 2006. – Vol 9l, № 4. – P. 297–301.

5. Chen X.C. Biosorption of copper (II) and (II) from aqueous solution by *Pseudomonas* // Colloids Surf. Bio interfaces – 2005. – Vol. 46, № 2. – P. 101–107.

6. Rossbach S. Cadmium-regulated gene fusions in *Pseudomonas* // Microbiol. – 2015. – Vol 2. № 2. P. 373–382.

7. Veiga F. M. Marcos M.L.F. // Sci. Total Environ – 2010. – Vol. 271, № 1–3. – P. 135–144.

8. Dill G.M. Glyphosate Resistance in Crops and Weeds // Ed. V.K. Nandula. Hoboken – 2010. – Vol. 71, № 3. – P. 321.

9. Свиридов А. В. Микробная деградация гербицида глифосата // Прикладная биохимия и микробиология – 2015. – Т. 51, № 2. – С. 183.

10. Paredes P. K. Investigating the mechanisms underlying photoprotection by plant growth-promoting rhizobacteria in *Spartina* flora under metal stress // Plant Biol. – 2018. – Vol. 20, № 3. – P. 497–506.

11. Ponmurugan P. C. In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria // African Journal of Biotechnology – 2006. – Vol. 5, № 4. – P. 348–350.
12. Rueppel M.L. Metal resistance in the *Cuban Serratia marcescens* strain C-1 // J. Agric. Food. Chem. – 1977. – Vol. 25, № 3. – P. 517–528.
13. Herman M.A. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York // Crop Protect. – 2008. – Vol. 27, № 8. – P. 996–1002.
14. Kloepper J.W. A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR // In: Sixth International PGPR Workshop – 2003. – Vol. 7, № 2. – P. 6–10.
15. Хакимова Л.Р., Лавина А.М. Использование штаммов продуцентов адгезина *RapA1* в *Rhizobium leguminosarum* для создания бинарных биоудобрений // Прикладная биохимия и микробиология – 2017. – Т. 53, № 4. – С. 400–405.
16. Recep K. E. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains // Biol Control – 2009. – Vol. 50, № 1. – P. 194–198.
17. Nicholson W.L. Roles of *Bacillus* endospores in the environment // Cell. Mol. Life Sci. – 2002. – Vol. 59, № 1. – P. 410–416.
18. Ashraf M.A. Plant growth promoting rhizobacteria and sustainable agriculture // African. J. Microbiol. Res. – 2013. – Vol. 7, № 1. – P. 704–709.
19. Naidu V.S. Effect of synthetic auxins and *Azorhizobium caulinodans* on growth and yield of rice // J Microbiol. – 2004. – Vol. 44, № 1. – P. 211–213.
20. Вершинина З. Р., Чубукова О. В., Никоноров Ю. М., Хакимова Л. Р., Лавина А. М., Каримова Л. Р., Баймиев Ан. Х., Баймиев А. Х. Влияние сверхэкспрессии гена *rosR* на образование биопленок бактериями

Rhizobium leguminosarum // Микробиология – 2021. – Т. 90, № 2. – С. 191–203.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Алибаков Салават Халилович
Проверяющий: Халитова Рита Камилевна
Организация: Башкирский государственный медицинский университет
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://bashgmu.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 2455
Начало загрузки: 29.06.2023 13:32:07
Длительность загрузки: 00:00:06
Имя исходного файла:
Алибаков_ВКР_финал.docx
Название документа: ИЗУЧЕНИЕ
ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ
ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ
Размер текста: 70 кБ
Тип документа: Выпускная
квалификационная работа
Символов в тексте: 71793
Слов в тексте: 8337
Число предложений: 641

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 29.06.2023 13:32:14
Длительность проверки: 00:01:32
Корректировка от 29.06.2023 13:34:15
Комментарии: [Автосохраненная версия]
Поиск с учетом редактирования: да
Проверенные разделы: основная часть с. 3-43, библиография с. 44-47
Модули поиска: ИПС Адилет, Модуль поиска "БГМУ", Библиография, Сводная
коллекция ЭБС, Интернет Плюс*, Сводная коллекция РГБ, Цитирование,
Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU
(EnRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные
заимствования издательства Wiley , eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС
ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Медицина, Диссертации НББ,
Коллекция НБУ, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по СПС
ГАРАНТ: аналитика*, Перефразирования по Интернету, Перефразирования по
Интернету (EN), Перефразирования по коллекции издательства Wiley , Патенты
СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство
Wiley, Переводные заимствования



СОВПАДЕНИЯ	САМОЦИТИРОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
19.01%	0%	1.07%	79.92%

Совпадения — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» – это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.

Самоцитирования — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» – это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.

Цитирования — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы: библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» – это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальный текст — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» – это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует полному тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарии
[01]	7,58%	0%	не указано	29 Сен 2022	Библиография	
[02]	4,49%	4,26%	СКРИНИНГ ЗОНАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ <i>PSEUDOMO... https://elibrary.ru	31 Дек 2021	eLIBRARY.RU	
[03]	3,24%	2,43%	2476.pdf http://elibrary.sgu.ru	10 Мая 2023	Интернет Плюс*	
[04]	3,08%	0,84%	http://elibrary.sgu.ru/uch_lit/2476.pdf http://elibrary.sgu.ru	01 Июн 2023	Интернет Плюс*	
[05]	3,08%	0%	http://elibrary.sgu.ru/uch_lit/2476.pdf http://elibrary.sgu.ru	29 Июн 2022	Интернет Плюс*	
[06]	2,82%	2,73%	Фосфат-мобилизующая активность эндофитных шт... http://elibrary.ru	11 Мая 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[07]	2,57%	1,68%	Влияние штамма Pseudomonas sp. OBA 2.4.1 на раст... https://elibrary.ru	31 Дек 2022	eLIBRARY.RU	
[08]	2,45%	0,52%	Бактериальный адгезин RapA1 Rhizobium leguminos... http://dslib.net	25 Июн 2021	Интернет Плюс*	
[09]	2,01%	0,57%	Нигматуллина, Лилия Ралисовна Бактериальный ад... http://dlib.rsl.ru	11 Июн 2020	Сводная коллекция РГБ	
[10]	2%	0,12%	СКРИНИНГ СПОСОБНОСТИ КАЛИЙМОБИЛИЗУЮЩ... https://elibrary.ru	15 Авг 2022	eLIBRARY.RU	
[11]	1,84%	0%	Хакимова, Лилия Ралисовна Бактериальный адгези... http://dlib.rsl.ru	19 Фев 2018	Сводная коллекция РГБ	

[12]	1.73%	1.02%	МИКРОБНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ГЕРБИЦИДА ГЛИФОСАТ... http://elibrary.ru	13 Мар 2015	eLIBRARY.RU	
[13]	1.62%	1.62%	РОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АДГЕЗИНОВ И ДРУГИХ КОМ... http://elibrary.ru	22 Фев 2017	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[14]	1.55%	0.69%	МИКРОБНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ГЕРБИЦИДА ГЛИФОСАТ... http://elibrary.ru	13 Мар 2015	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[15]	1.5%	0.16%	СКРИНИНГ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ПО СП... https://elibrary.ru	31 Дек 2022	eLIBRARY.RU	
[16]	1.24%	1.24%	Псевдомонады http://studfiles.ru	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[17]	1.21%	0%	Плазмидосодержащие ризосферные бактерии рода... http://earthpapers.net	01 Июн 2023	Интернет Плюс*	
[18]	1.21%	0%	Плазмидосодержащие ризосферные бактерии рода... http://earthpapers.net	раньше 2011	Интернет Плюс*	
[19]	1.19%	0%	Лавина, Анна Михайловна Гены-регуляторы синтез... http://dlib.rsl.ru	23 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	
[20]	1.13%	1.13%	Генетическое разнообразие и филогения клубеньк... http://elibrary.ru	15 Янв 2019	Перефразирования по eLIBRARY.RU	
[21]	1.07%	1.07%	не указано	29 Сен 2022	Шаблонные фразы	
[22]	0.94%	0%	Сиумова, Татьяна Вячеславовна диссертация ... канд... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[23]	0.87%	0%	https://biomicsj.ru/upload/iblock/a05/1514537074_bm... https://biomicsj.ru	10 Мая 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[24]	0.7%	0%	http://ofr.su/assets/files/annual/crimea2017/OFR2017_... http://ofr.su	09 Окт 2020	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	0.66%	0%	Благова, Дарья Константиновна диссертация ... канд... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	0.64%	0%	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ: ФУН... https://docplayer.ru	11 Мая 2020	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	0.6%	0%	РОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АДГЕЗИНОВ И ДРУГИХ КОМ... http://elibrary.ru	22 Фев 2017	eLIBRARY.RU	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	0.47%	0%	http://ofr.su/assets/files/AbstractCongressKazan2019... http://ofr.su	16 Фев 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0.45%	0%	Шелоник М.А.	01 Июн 2023	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[30]	0.44%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachment/microorganisms/... https://mdpi-res.com	26 Июн 2023	Интернет Плюс*	
[31]	0.41%	0%	Автореферат http://oldvak.ed.gov.ru	30 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[32]	0.35%	0%	https://tvan.nlshk.ru/data/documents/15_11.pdf https://tvan.nlshk.ru	03 Июн 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0.38%	0%	МИКРОБНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ГЕРБИЦИДА ГЛИФОСАТ... http://naukarus.com	10 Мая 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0.33%	0%	RapA1 адгезин для прикрепления полезных бактери... https://cyberleninka.ru	29 Июн 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	0.33%	0%	PDF http://waset.org	09 Янв 2018	Переводные заимствования (RuEn)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	0.32%	0%	Frontiers PGPR in Agriculture: A Sustainable Approac... https://frontiersin.org	29 Июн 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0.31%	0%	https://biomicsj.ru/upload/iblock/b2b/672f6b74c07bf0... https://biomicsj.ru	26 Июн 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0.3%	0%	Ибрахим, Ибрахим Мохамед Ибрахим Структурно-... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0.3%	0%	АНАЛИЗ СИМБИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ КЛУБЕНЬКОВЫ... http://elibrary.ru	27 Дек 2015	eLIBRARY.RU	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0.29%	0%	Фосфат-мобилизующая активность эндофитных шт... http://elibrary.ru	11 Мая 2018	eLIBRARY.RU	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0.29%	0%	Preserving the nutritional quality of crop plants under ... https://link.springer.com	22 Янв 2021	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0.29%	0%	Preserving the nutritional quality of crop plants under ... https://link.springer.com	22 Янв 2021	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0.28%	0%	https://espace.curtin.edu.au/bitstream/handle/20.500.... https://espace.curtin.edu.au	29 Июн 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	0.27%	0%	ВЛИЯНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ АЭРАЦИИ И КИСЛОТН... https://yandex.ru	29 Июн 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0.25%	0%	Вершинина, Зияя Рифовна диссертация ... кандидат... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0.25%	0%	Карамов, Эдуард Владимирович диссертация ... докт... http://dlib.rsl.ru	20 Янв 2010	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0.24%	0%	https://diss.muctr.ru/media/dissertations/2021/02/%D... https://diss.muctr.ru	02 Июн 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький пррцент пересечения.
[48]	0.22%	0%	Mycovirus associated hypovirulence, a potential meth... https://ncbi.nlm.nih.gov	26 Мая 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0.21%	0%	Development and Application of Low-Cost and Eco-Sus... https://frontiersin.org	20 Мая 2021	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0.21%	0%	http://ofr.su/assets/files/AbstractCongressKazan2019... http://ofr.su	01 Июн 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0.21%	0%	Agronomy Free Full-Text Assessment of the Capacit... https://mdpi.com	30 Мая 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[52]	0,2%	0%	Unraveling Aspects of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Media https://frontiersin.org	21 Мая 2020	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,2%	0%	259224 http://e.lanbook.com	раньше 2011	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,18%	0%	http://ofr.su/assets/files/annual/crimea2017/OFR2017_ http://ofr.su	05 Июл 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,17%	0%	Soil beneficial bacteria and their role in plant growth pr... https://translated.turbopages.org	14 Сен 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,15%	0%	The <i>Bacillus subtilis</i> spore coat protein interaction net... https://doi.org	31 Янв 2006	Издательство Wiley	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,15%	0%	Фосфатрастворяющий штамм <i>pseudomonas</i> species... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,15%	0%	Фосфатрастворяющий штамм <i>acinetobacter</i> species ... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,15%	0%	Use of Novel Strains for Biological Control of Pink Rot L... http://freepatentsonline.com	09 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,15%	0%	The Effect of Plant Genotype, Growth Stage, and Mycos... https://frontiersin.org	01 Сен 2020	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,14%	0%	Исследование ареала распространения штаммов б... http://elibrary.ru	24 Янв 2019	eLIBRARY.RU	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,14%	0%	Хархун, Екатерина Викторовна диссертация ... канди... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,13%	0%	ФОСФАТРАСТВОРЯЮЩИЙ ШТАММ <i>Pseudomonas</i> ch... https://patenton.ru	29 Июн 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,12%	0%	Response of Tomato Rhizosphere Bacteria to Root-Kno... https://frontiersin.org	23 Фев 2021	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,12%	0%	Микробный биоценоз кишечника у больных ВИЧ-и... http://emil.ru	20 Янв 2020	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,12%	0%	Новая форма препарата "Споробактерин жидкий" и... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,12%	0%	Микробный биоценоз кишечника у больных ВИЧ-и... http://emil.ru	20 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,1%	0%	https://www.permisc.ru/images/docs/disser/D.999.219... https://permisc.ru	25 Мая 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[69]	0,1%	0%	http://permisc.ru/images/docs/disser/D.999.219.02/Sar... http://permisc.ru	25 Янв 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	0,09%	0%	Псевдомонады https://studfile.net	08 Фев 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	0,07%	0%	https://www.rzgmu.ru/images/upload/users/sc/%D0%... https://rzgmu.ru	01 Ноя 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	0,06%	0%	https://kpfu.ru/staff_files/F1813537468/cmr2015vol5.pdf https://kpfu.ru	08 Июн 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[73]	0,04%	0%	https://elib.pnzgu.ru/files/eb/doc/ZkPr54Dc4pgf.pdf https://elib.pnzgu.ru	22 Дек 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.