

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ШТАММЫ ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩИХ РИЗОБАКТЕРИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К ГЛИФОСАТУ И НИКЕЛЮ

© 2024 г. Л. Р. Хакимова^{1,2,*}, О. В. Чубукова^{1,3}, Е. С. Акимова¹, З. Р. Вершинина^{1,3}

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН
450054 Уфа, просп. Октября, 71, лит. 1Е, Россия

²Башкирский государственный медицинский университет Минздрава РФ
450000 Уфа, ул. Ленина, 3, Россия

³Уфимский государственный нефтяной технический университет
450044 Уфа, ул. Первомайская, 14, Россия

*E-mail: lili-nigmatullina@bk.ru

Осуществили поиск фосфатрастворяющих ризобактерий, способных расти в присутствии разных концентраций гербицида глифосата и ионов тяжелого металла никеля (Ni^{2+}). С помощью среды Муромцева определена фосфатмобилизующая активность лишь у 3-х из 20-ти штаммов *Rhizobium* spp. – с низким индексом солюбилизации (*IS*). Напротив, все штаммы *Pseudomonas* spp. показали положительный результат, а самый высокий *IS* был у *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 и GOR 4.17. Наиболее высокую активность роста при стрессовых условиях показали 4 штамма *Pseudomonas* spp.: ОВА 2.4.1, ОВА 2.9, 4.17 и STA 3, их рост заметно угнетался при увеличении концентрации глифосата в среде до 10.0 мг/мл. Активность роста штаммов *Rhizobium* spp. характеризовалась как средняя. При росте на среде с NiCl_2 штаммы *Pseudomonas* sp. 65 НМ и 67 НМ росли до концентрации 9 мМ NiCl_2 в среде, при концентрации 11 мМ штамм 67 НМ давал рост в виде единичных колоний. Данные штаммы были выделены из образцов почв, взятых из мест, загрязненных химическими стоками. Возможно, в такой почве уже были хлориды никеля в больших концентрациях, превышающих норму, поэтому именно данные штаммы имели такую высокую устойчивость к ионам никеля. Таким образом, штаммы *Rhizobium* spp. обладали не самыми активными PGPR свойствами, а разные штаммы *Pseudomonas* sp. проявили высокую устойчивость к глифосату и хлориду никеля. Тем самым *Pseudomonas* sp. показали свою высокую способность адаптации к стрессовым условиям. Именно такие PGPR-бактерии (Plant Growth Promoting Rhizo bacteria) можно рассматривать в качестве биологических агентов для повышения эффективности биоремедиации сельскохозяйственных почв.

Ключевые слова: ризобактерии PGPR, *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., глифосат, никель.

DOI: 10.31857/S0002188124120116, **EDN:** VUQITA

ВВЕДЕНИЕ

Ризобактерии, способствующие росту растений (PGPR) – это полезные ризосферные свободноживущие микроорганизмы, которые участвуют в стимулировании роста растений. PGPR обитают в ризосфере и корнях растений, благоприятно влияя на их рост и развитие и способствуя антагонизму с фитопатогенами. Такие ризобактерии используют для повышения урожайности сельскохозяйственных культур при нормальных и стрессовых условиях [1]. Они усиливают рост растений за счет создания индуцированной системной устойчивости (ISR), высокой конкурентоспособности, защиты растений от биотических агентов и др. [2]. Ризосфера представляет собой сложную и гетерогенную зону вокруг корней растений, колонизированную многими микроорганизмами, включая

бактерии родов *Pseudomonas* и *Rhizobium*. *Pseudomonas* sp. являются широко распространенными бактериями в ризосферной зоне и обладают многими характеристиками PGPR, включая быстрый рост *in vitro*, высокую конкурентоспособность и колонизацию корневых волосков растений, синтез биологически активных метаболитов, устойчивость к стрессовым ситуациям [3]. *Rhizobium* sp. имеют уникальную способность к азотфиксации в симбиозе с бобовыми растениями [4].

Кроме вышеперечисленных свойств у PGPR-бактерий имеется способность солюбилизировать фосфаты. Описаны штаммы ризобий, включая *R. leguminosarum*, которые способны синтезировать низкомолекулярные органические кислоты, которые действуют на неорганический фосфор [5].

Биоремедиация подразумевает использование способности микроорганизмов разлагать органические загрязнители, в том числе и остатки гербицидов, присутствующие в загрязненных пахотных почвах, и параллельно повышать плодородие почв и урожайность сельскохозяйственных культур [4, 6]. В настоящее время чрезмерное использование гербицидов угрожает равновесию почвенных экосистем и может негативно влиять на рост растений [7]. Глифосат (N-(фосфонометил) глицин) является наиболее эффективным и широко используемым гербицидом во всем мире, и его использование растет с каждым годом [8–10]. Остатки глифосата обнаруживаются в воде, почве, воздухе и грунтовых водах, а также в продуктах питания [11]. Согласно многим исследованиям, глифосат воздействует на репродуктивную систему лабораторных крыс, при этом негативное влияние проявляется в поколениях F2 и F3, на которых не было прямого воздействия глифосата [12, 13]. Известно, что этот гербицид вызывает нарушение в почвенной экосистеме и микробиоте кишечника млекопитающих, домашних птиц, рептилий, а также медоносных пчел [14–17]. Наиболее перспективной и экологичной стратегией удаления таких гербицидов из окружающей среды является микробная деградация [18]. Например, показано, что некоторые бактерии могут превращать пестициды в биохимические строительные блоки, необходимые для цикла Кребса и гликолиза [6].

Кроме гербицидов большую опасность для окружающей среды представляют и тяжелые металлы (ТМ). Поиск штаммов PGPR, устойчивых к ТМ, является наиболее актуальным вопросом в биоремедиации. Такие бактерии способны смягчать токсическое действие ТМ на растения путем различных механизмов, таких как внутриклеточная и внеклеточная секвестрация, биоаккумуляция, биоаугментация и т.д. [19, 20]. Таким образом, улучшение взаимодействия растений и PGPR может способствовать успешной фиторемедиации за счет усиления роста растений и производства биомассы в неблагоприятных условиях окружающей среды [21].

Цель работы – поиск фосфатрастворяющих ризобактерий, способных расти в присутствии глифосата и загрязнения никелем.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Все исследованные штаммы взяты из коллекции ризосферных бактерий «Симбионт» (ИБГ УФИЦ РАН, Уфа). Бактериальные штаммы из рода *Rhizobium*: TRe 1 TRe 3, TRe 5, TRe 7, TRe 14, GOR3, GOR18, GOR7, GOR23, GOR25, TMe 9, TPr 6 были выделены из клубеньков корней растений видов семейства Бобовые (Fabaceae). Бактериальные штаммы рода *Pseudomonas*: *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 и *Pseudomonas* sp.

OBA 2.9 выделены из ризосферы растений Южного Урала – остролодочника башкирского (*Oxytropis baschkirensis*), *Pseudomonas* sp. GOR4.17 – из ризосферы козлятника восточного (*Galega orientalis*), *Pseudomonas* sp. STA 3 – из ризосферы стальника колючего (*Ononis spinosa*) [22]. Бактериальные штаммы *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ выделены из образцов почв, взятых из мест, загрязненных химическими стоками.

Определение минимальной ингибирующей концентрации глифосата для исследованных штаммов определяли путем постановки *in vitro* экспериментов в 3-х повторностях на твердой питательной среде LB для *Pseudomonas* spp. (масс.% в водном растворе: бактотриптон – 1, дрожжевой экстракт – 0.5, NaCl – 0.5, агар – 1) и YM для *Rhizobium* spp. (масс.% в водном растворе: маннитол – 1, дрожжевой экстракт – 0.04, NaCl – 0.01, MgSO₄ – 0.01, K₂HPO₄·3H₂O – 0.05, CaCl₂ – 0.03). Глифосат готовили из гербицида «Торнадо-500» («Август», Россия), в качестве исходного раствора использовали 50%-ный стерильный разведенный препарат. Затем культуру клеток выращивали в чашках Петри с добавлением глифосата в конечных концентрациях 3.0, 6.0, 8.0, 10.0 мг/мл. После инкубации в термостате в течение 24–48 ч при 28 °C рассматривали рост бактериальных клеток.

Способность ризобактерий к росту в присутствии NiCl₂ исследовали также на средах LB и YM при концентрациях 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 мМ (до 11.0 мМ для отдельных штаммов). После инкубации в термостате в течение 24–48 ч при 28 °C рассматривали рост бактериальных колоний.

Способность штаммов ризобактерий к мобилизации неорганического фосфора оценивали по образованию зоны просветления вокруг колоний, выросших в чашках Петри со средой Муромцева (глюкоза 10 г/л, аспарагин 1 г/л, K₂SO₄ 0.2 г/л, MgSO₄ 0.2 г/л, кукурузный экстракт 0.02 г/л, агар 20 г/л, pH 6.8), содержащей нерастворимый фосфат. В качестве нерастворимых фосфатов использовали Ca₃(PO₄)₂ или AlPO₄, которые в качестве единственного источника фосфора добавляли в среду в концентрации 5 г/л [23]. Суточную культуру бактерий наносили в виде капли на поверхность агаризованной среды, инкубировали при температуре 28 °C и оценивали результат через 3 сут для *Pseudomonas* spp., для *Rhizobium* spp. – через 5 сут. Затем измеряли индекс солубилизации (IS) с помощью формулы IS = Ø гало (мм) / Ø колоний (мм).

Эксперименты проводили в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях. Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010. Представленные данные имеют соответствующие доверительные интервалы при уровне доверительной вероятности равной 0.95.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованные бактериальные штаммы были выделены из совершенно разных источников: *Rhizobium* spp. – из клубеньков разных бобовых растений, 4 штамма *Pseudomonas* spp. – из ризосферы разных видов растений, 3 штамма *Pseudomonas* spp. – из образцов почв, взятых из мест, загрязненных химическими стоками.

Использование фосфатсолябилизирующих ризобактерий, повышающих доступность почвенного фосфора для сельскохозяйственных культур, может рассматриваться как экологически чистая альтернатива чрезмерному использованию минеральных удобрений [24].

На начальных этапах исследования были проверены все исследованные штаммы на способность солибилизировать неорганический фосфор. Показали, что практически все штаммы *Pseudomonas* spp. могут растворять фосфат кальция. Однако ни один из исследованных штаммов ризобактерий не был способен растворять фосфат алюминия (рис. 1). Соответственно бактериальные штаммы могут расщеплять не все нерастворимые фосфаты.

Для ризобактерий был посчитан индекс солибилизации фосфата кальция (табл. 1).

В результате лишь у 3-х штаммов *Rhizobium* spp. обнаружена солибилизация фосфата кальция с низким IS, а штаммы *Pseudomonas* spp. показали положительную фосфатомобилизующую активность, самый высокий IS отмечен у *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 и GOR4.17.

Устойчивость ризобактерий к гербициду глифосату. При культивировании *in vitro* на средах с возрастающими концентрациями глифосата было отмечено, что многие фосфатрастворяющие ризобактерии были способны расти в присутствии гербицида до концентрации 8.0 мг/мл в среде (табл. 2, рис. 2).

Наиболее высокий рост в стрессовых условиях показали 4 штамма *Pseudomonas* spp.: OBA 2.4.1, OBA 2.9, 4.17 и STA 3, все они выделены из ризосферы разных видов растений. Их рост заметно угнетался лишь при увеличении концентрации глифосата до 10.0 мг/мл в среде. Активность роста штаммов *Rhizobium* spp. можно охарактеризовать как среднюю.

Хотя в нашем случае штаммы *Rhizobium* spp. не показали высокую устойчивость к глифосату,

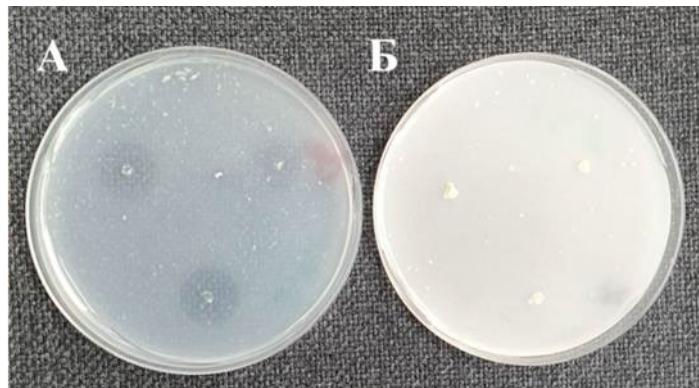


Рис. 1. Определение фосфатомобилизующей активности штамма на среде Муромцева с разными фосфатами: (а) – с добавлением $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, (б) – с добавлением AlPO_4 .

Таблица 1. Индекс солибилизации (IS) фосфата кальция разными штаммами ризобактерий

Штамм	Индекс солибилизации (IS)
<i>Pseudomonas</i> sp. OBA 2.4.1	3.7 ± 0.3
<i>Pseudomonas</i> sp. OBA 2.9	1.9 ± 0.2
<i>Pseudomonas</i> sp. GOR4.17	3.58 ± 0.12
<i>Pseudomonas</i> sp. STA 3	1.5 ± 0.3
<i>Pseudomonas</i> sp. 17 НМ	2.9 ± 0.2
<i>Pseudomonas</i> sp. 65 НМ	1.3 ± 0.1
<i>Pseudomonas</i> sp. 67 НМ	1.1 ± 0.1
<i>R. leguminosarum</i> TPr 6	2.9 ± 0.2
<i>R. leguminosarum</i> G3	1.3 ± 0.1
<i>R. leguminosarum</i> Г15.2	1.1 ± 0.1
<i>R. leguminosarum</i> Л4	1.2 ± 0.3

Таблица 2. Показатели роста ризобактерий в зависимости от содержания глифосата в среде

Штамм	Концентрация глифосата в питательной среде, мг/мл				
	1.5	3.0	6.0	8.0	10.0
<i>Pseudomonas</i> sp. OBA 2.4.1	+++*	+++	++	+	—
<i>Pseudomonas</i> sp. OBA 2.9	+++	+++	++	+	—
<i>Pseudomonas</i> sp. GOR4.17	+++	+++	++	+	—
<i>Pseudomonas</i> sp. STA 3	+++	+++	++	+	—
<i>Pseudomonas</i> sp. 17 HM	+++	++	—	—	—
<i>Pseudomonas</i> sp. 65 HM	++	+	—	—	—
<i>Pseudomonas</i> sp. 67 HM	+	+	—	—	—
<i>R. leguminosarum</i> TRe 1	+++	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> TRe 3	+++	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> TRe 5	+++	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> TRe 7	+++	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> TRe 14	++	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> GOR3	+	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> GOR7	+	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> GOR18	++	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> GOR23	++	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> GOR25	++	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> TMe 9	++	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> TPr 6	+	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> Thy 6	++	++	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> MLu 10	++	+	—	—	—
<i>R. leguminosarum</i> G3	++	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> K14	+	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> K25	+	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> Г15.2	++	+	+	—	—
<i>R. leguminosarum</i> L4	+	+	+	+	—
<i>R. leguminosarum</i> Л6	+	+	+	—	—

* +++ хороший рост, ++ средний рост, + слабый рост, прочерк – нет роста. То же в табл. 3.

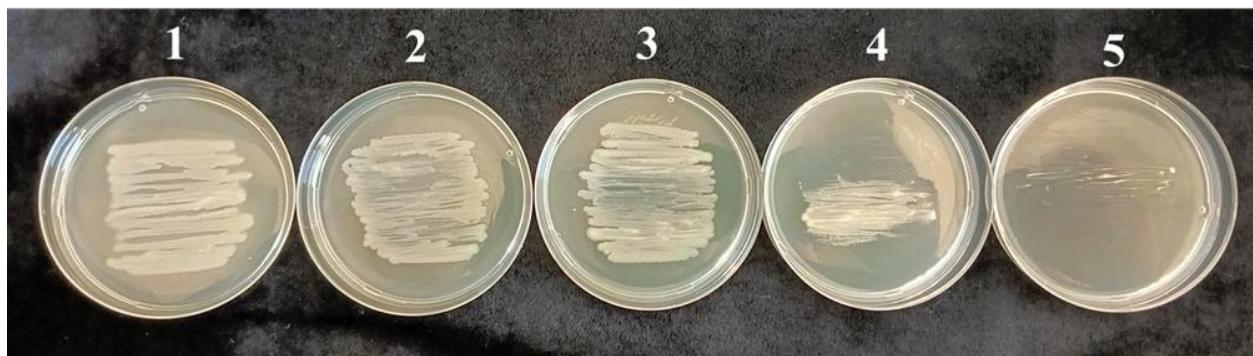


Рис. 2. Рост штаммов ризобактерий на примере *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 при стрессовом воздействии глифосата: 1 – контроль, 2–3.0, 3–6.0, 4–8.0, 5–10.0 мг/мл.

в литературе, например, описан штамм *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV из ризосферы *Lotus corniculatus* L., способный метаболизировать глифосат в высоких концентрациях [25]. Однако многочисленные исследования показали, что бесконтрольное применение

глифосата отрицательно влияет на процесс фиксации азота растениями за счет уменьшения популяции бактерий *Rhizobium* sp., т.к. рост ризобий ингибируется даже при рекомендуемых концентрациях гербицида в почве [26, 27].

Бактерии рода *Pseudomonas*, напротив, относят к микроорганизмам, способным эффективно разлагать глифосат и различные ТМ [28, 29]. Например, показана возможность *Pseudomonas* sp. QJX-1 [30] и других штаммов *Pseudomonas* sp. (GA07, GA09 и GC04) использовать глифосат в качестве источников питания для своего роста [31]. Штаммы *P. nitroreducens* FY43 и FY47 показали устойчивость к глифосату в концентрации до 32 раз больше, чем при внесении в землю при обработке. Они были выделены из почвы, в которую в течение длительного времени вносили данный гербицид [32]. Все это дает возможность полагать, что использование псевдомонад для биодеградации глифосата может быть эффективным методом утилизации токсичных соединений из окружающей среды.

Рост ризобактерий в присутствии никеля. В литературе описаны фосфатрастворяющие штаммы, резистентные к ТМ. Были выделены *P. fluorescens* TL97

и *P. putida* TL80, устойчивые к AsNaO_2 и *R. radiobacter* TL52, который был устойчив к высоким концентрациям хлорида ртути [33]. Показано, что бактерии рода *Rhizobium* способны расти в присутствии разных ТМ, включая цинк, свинец и кадмий [34]. Поэтому было решено рассмотреть рост исследованных штаммов ризобактерий на средах, содержащих различные концентрации NiCl_2 (табл. 3).

Наибольшую устойчивость к ТМ показали штаммы *Pseudomonas* spp., выделенные из образцов почв, взятых из мест, загрязненных химическими стоками: 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ (рис. 3).

Минимальное ингибиование роста этих штаммов наблюдали при концентрации хлорида никеля 7 мМ, штаммы 65 НМ и 67 НМ росли до 9 мМ NiCl_2 в среде, при концентрации хлорида никеля 11 мМ штамм 67 НМ показал рост в виде единичных колоний. Скорее всего, в такой почве уже были хлориды никеля в больших концентрациях, превышающих

Таблица 3. Показатели роста ризобактерий в зависимости от содержания NiCl_2 в среде

Исследованный штамм	Концентрация NiCl_2 в питательной среде, мМ				
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
<i>Pseudomonas</i> sp. OBA 2.4.1	+++*	+++	++	+	-
<i>Pseudomonas</i> sp. OBA 2.9	+++	++	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. GOR4.17	+++	++	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. STA 3	+++	++	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 17 НМ	+++	+++	++	++	++
<i>Pseudomonas</i> sp. 65 НМ	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Pseudomonas</i> sp. 67 НМ	+++	+++	+++	+++	+++
<i>R. leguminosarum</i> TRe 1	+	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> TRe 3	+	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> TRe 5	-	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> TRe 7	-	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> TRe 14	-	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> GOR3	+	+	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> GOR7	+	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> GOR18	-	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> GOR23	-	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> GOR25	-	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> TMe 9	+	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> TPr 6	++	+	+	+	+
<i>R. leguminosarum</i> Thy 6	+	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> MLu 10	-	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> G3	+	+	+	+	+
<i>R. leguminosarum</i> K14	-	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> K25	-	-	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> Г15.2	+	+	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> Л4	+	+	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> Л6	-	-	-	-	-

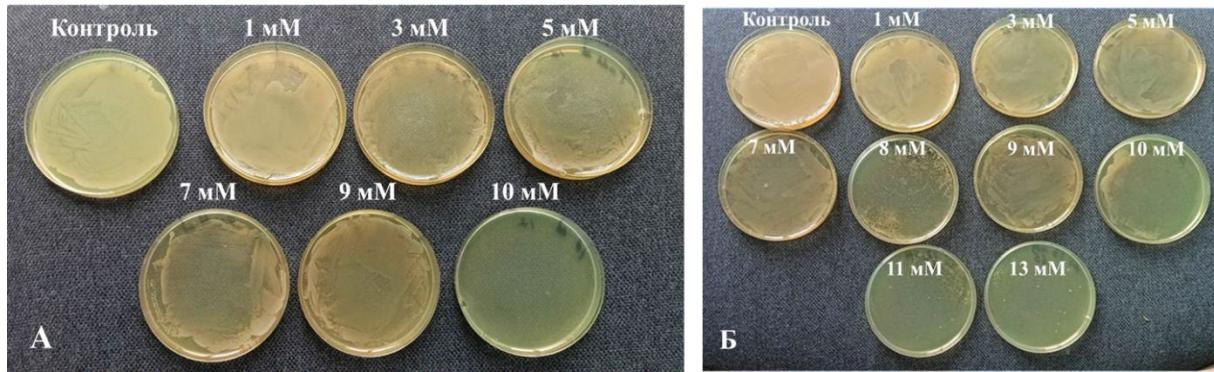


Рис. 3. Рост штаммов *Pseudomonas* sp. 65 НМ (а) и 67 НМ (б) на среде с добавлением NiCl_2 .

норму, поэтому именно данные штаммы имели такую высокую устойчивость к ионам никеля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время агрохимикаты, в частности, глифосат, а также тяжелые металлы (ТМ) являются одними из основных экологических проблем в аграрной сфере. В будущем снижения объемов применения гербицидов в сельском хозяйстве не намечается, а аккумуляция ТМ в почве только возрастет. Поэтому необходимы способы разработки биотехнологического инструмента для эффективной биодеградации гербицидов и ТМ в сельскохозяйственных почвах.

В нашем исследовании рассмотрели 27 ризосферных штаммов бактерий, выделенных из разных источников, относящихся к родам *Rhizobium* и *Pseudomonas*. Показано, что именно *Pseudomonas* spp. обладали фосфатмобилизующей активностью, тогда как у *Rhizobium* spp. положительной активностью обладали лишь несколько штаммов с низким индексом солюбилизации. Высокую устойчивость к хлориду никеля показали именно штаммы *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ, выделенные из образцов почв, взятых из мест, загрязненных химическими стоками. Таким образом, ризосферные бактерии, имеющие PGPR свойства и устойчивые к различным ТМ и агрохимикатам, могут защищать растения от токсичности окружающей среды и стимулировать их рост даже при неблагоприятных условиях. Поскольку такие бактерии как *Pseudomonas* sp. хорошо адаптированы к таким стрессовым условиям, их можно использовать в качестве биоинокулянтов почв, загрязненных ТМ, что представляет собой биологическую альтернативу для повышения эффективности фиторемедиации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ali B., Wang X., Saleem M. H., Sumaira, Hafeez A., Afridi M.S., Khan S., Zaib-Un-Nisa, Ullah I., Amaral Júnior A.T. PGPR-mediated salt tolerance in maize
2. Afzal M., Ali S., Salam A., César Terra W., Hafeez A., Sumaira, Ali B., S. AlTami M., Ameen F., Ercisli S., Marc R.A., Medeiros F.H.V., Karunakaran R. Plant microbiome engineering: Hopes or hypes // Plants. 2022. V. 11. P. 345. <https://doi.org/10.3390/plants11030345>
3. Afzal M., Ali S., Salam A., César Terra W., Hafeez A., Sumaira, Ali B., S. AlTami M., Ameen F., Ercisli S., Marc R.A., Medeiros F.H.V., Karunakaran R. Plant microbiome engineering: Hopes or hypes // Biology. 2022. V. 11. P. 1782. <https://doi.org/10.3390/biology11121782>
4. Morris C.E., Lamichhane J.R., Nikolic I., Stankovic S., Moury B. The overlapping continuum of host range among strains in the *Pseudomonas syringae* complex // Phytopathol. Res. 2019. V. 1. P. 4. <https://doi.org/10.1186/s42483-018-0010-6>
5. Motamedi M., Zahedi M., Karimmojeni H., Baldwin T.C., Motamedi H. Rhizosphere-associated bacteria as biofertilizers in herbicide-treated alfalfa (*Medicago sativa*) // J. Soil Sci. Plant Nutr. 2023. V. 23. P. 2585–2598. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01214-6>
6. Gopalakrishnan S., Sathiya A., Vijayabharathi R., Varshney R.K., Gowda C.L., Krishnamurthy L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities // Biotechnology. 2015. V. 5(4). P. 355–377. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0241-x>
7. Akbar S., Sultan S. Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement // Brazil. J. Microbiol. 2016. V. 47. P. 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.BJM.2016.04.009>
8. Bocker T., Mohring N., Finger R. Herbicide free agriculture? A bio-economic modelling application to Swiss wheat production // Agric. Syst. 2019. V. 173. P. 378–392. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.03.001>
9. Tang F.H.M., Lenzen M., McBratney A., Maggi F. Risk of pesticide pollution at the global scale // Nat. Geosci. V. 2021. № 14. P. 206–210. <https://doi.org/10.1038/s41561-021-00712-5>
10. Maggi F., la Cecilia D., Tang F.H.M., McBratney A. The global environmental hazard of glyphosate

- use // Sci. Total. Environ. 2020. V. 717. P. 137167.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137167>
10. Wang L., Deng Q., Hu H., Liu M., Gong Z., Zhang S., Xu-Monette Z.Y., Lu Z., Young K.H., Ma X., Li Y. Glyphosate induces benign monoclonal gammopathy and promotes multiple myeloma progression in mice // J. Hematol. Oncol. 2019. V. 12. № 70. P. 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0767-9>
 11. Zoller O., Rhyn P., Rupp H., Zarn J. A., Geiser C. Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation // Food Addit. Contam. Part B. 2018. V. 11. № 2. P. 83–91. <https://doi.org/10.1080/19393210.2017.1419509>
 12. Li J., Chen W. J., Zhang W., Zhang Y., Lei Q., Wu S., Huang Y., Mishra S., Bhatt P., Chen S. Effects of free or immobilized bacterium *Stenotrophomonas acidaminophila* Y4B on glyphosate degradation performance and indigenous microbial community structure // J. Agric. Food Chem. 2022. V. 70. № 43. P. 13945–13958. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c05612>
 13. Kubasad D., Nilsson E.E., King S.E., Sadler-Riggleman I., Beck D., Skinner M.K. Assessment of glyphosate induced epigenetic transgenerational inheritance of pathologies and sperm epimutations: generation-al toxicology // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 6372. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42860-0>
 14. Aitbali Y., Ba-M'hamed S., Elhidar N., Nafis A., Soraa N., Bennis M. Glyphosate based-herbicide exposure affects gut microbiota, anxiety and depression-like behaviors in mice // Neurotoxicol. Teratol. 2018. V. 67. P. 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.04.002>
 15. Kittle R.P., McDermid K.J., Muehlstein L., Balazs G.H. Effects of glyphosate herbicide on the gastrointestinal microflora of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) Linnaeus // Mar. Pollut. Bull. 2018. V. 127. P. 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.11.030>
 16. Blot N., Veillat L., Rouz, R., Delatte H. Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota // PLoS One. 2019. V. 14. № 4. e0215466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215466>
 17. Zhang F., Qiao Z., Yao C., Sun S., Liu W., Wang J. Effects of the novel HPPD-inhibitor herbicide QYM201 on enzyme activity and microorganisms, and its degradation in soil // Ecotoxicology. 2021. V. 30. P. 80–90. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02302-4>
 18. 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. V. 9. № 11. P. 2322. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112322>
 19. Jayaram S., Ayyasamy P.M., Aishwarya K.P., Devi M.P., Rajakumar S. Mechanism of microbial detoxification of heavy metals: A review // J. Pure Appl. Microbiol. 2022. V. 16(3). P. 1562–1574. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.3.64>
 20. El Alaoui A., Raklami A., Bechtaoui N., El Gharmali A., Ouhammou A., Imziln B., Achouak W., Pajuelo E., Oufdou K. Use of native plants and their associated bacteria rhizobiomes to remediate-restore Draa Sfar and Kettara mining sites // Environ. Monitor. Assess., Morocco. 2021. V. 193(4). P. 232. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-08977-4>
 21. Madline A., Benidire L., Boularbah A. Alleviation of salinity and metal stress using plant growth-promoting rhizobacteria isolated from semiarid Moroccan copper-mine soils // Environ. Sci. Pollut. Res. 2021. V. 47. P. 67185–67202. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15168-8>
 22. Чубукова О.В., Хакимова Л.Р., Акимова Е.С., Вершинина З.Р. Филогения и свойства новых штаммов *Pseudomonas* sp. из ризосфера бобовых растений Южного Урала // Микробиология. 2022. Т. 91. № 5. С. 537–546. <https://doi.org/10.31857/S0026365622100196>
 23. Егоршина А.А., Хайруллин Р.М., Лукьянцев М.А., Курамшина З.М., Смирнова Ю.В. Фосфатомобилизующая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их влияние на степень микоризации корней пшеницы // Журн. СибирФУ. Биология. 2011. Т. 4. № 2. С. 172–182.
 24. Кузина Е.В., Рафиков Г.Ф., Коршунова Т.Ю. Фосфатсодулицирующие бактерии рода *Pseudomonas* и эффективность их применения для увеличения доступности фосфора // Изв. УфНЦ РАН. 2021. № 3. С. 11–16. <https://doi.org/10.31040/2222-8349-2021-0-3-11-16>
 25. Massot F., Gkorezis P., Van Hamme J., Marino D., Trifunovic B.S., Vukovic G., d'Haen J., Pintelon I., Giulietti A.M., Merini L., Vangronsveld J., Thijs S. Isolation, biochemical and genomic characterization of glyphosate tolerant bacteria to perform microbe-assisted phytoremediation // Front Microbiol. 2021. V. 11. P. 598507. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.598507>
 26. Aynalem B., Assefa F. Effect of glyphosate and mancozeb on the rhizobia isolated from nodules of *Vicia faba* L. and on their N₂-fixation, North Showa, Amhara Regional State, Ethiopia // Adv. Biol. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5864598>
 27. Asrat A., Sitotaw B., Dawoud T.M., Nafidi H.A., Bourhia M., Mekuriaw A., Wondmie G.F. Effect of glyphosate on the growth and survival of rhizobia isolated from root nodules of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) // Sci. Rep. 2023. V. 13(1). P. 21535. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48424-7>
 28. Masotti F., Garavaglia B.S., Piazza A., Burdisso P., Altabe S., Gottig N., Ottado J. Bacterial isolates from Argentine Pampas and their ability to degrade glyphosate // Sci. Total. Environ. 2021. V. 774. P. 145761. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145761>

29. Oleńska E., Małek W., Wójcik M., Szopa S., Świecka I., Aleksandrowicz O., Włostowski T., Zawadzka W., Sillen W.M.A., Vangronsveld J., Cholakova I., Langill T., Thijs S. Bacteria associated with Zn-hyperaccumulators *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis arenosa* from Zn–Pb–Cd waste heaps in Poland as promising tools for bioremediation // Sci. Rep. 2023. V. 13(1). P. 12606.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-39852-6>
30. Yu J., Jin B., Ji Q., Wang H. Detoxification and metabolism of glyphosate by a *Pseudomonas* sp. via biogenic manganese oxidation // J. Hazard Mater. 2023. V. 448. P. 130902.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130902>
31. Zhao H., Tao K., Zhu J., Liu S., Gao H., Zhou X. Bioremediation potential of glyphosate-degrading *Pseudomonas* spp. strains isolated from contaminated soil // J. Gen. Appl. Microbiol. 2015. V. 61. № 5. P. 165–170.
<https://doi.org/10.2323/jgam.61.165>
32. Tan X.L., Othman R.Y., Teo C.H. Isolation and functional characterization of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase gene from glyphosate-tolerant *Pseudomonas nitroreducens* strains FY43 and FY47 // Biotechnology. 2020. V. 10(4). P. 183.
<https://doi.org/10.1007/s13205-020-02176-7>
33. Rojas-Solis D., Larsen J., Lindig-Cisneros R. Arsenic and mercury tolerant rhizobacteria that can improve phytoremediation of heavy metal contaminated soils // PeerJ. 2023. V. 11. e14697.
<https://doi.org/10.7717/peerj.14697>
34. Oleńska E., Małek W., Sujkowska-Rybikowska M., Szopa S., Włostowski T., Aleksandrowicz O., Świecka I., Wójcik M., Thijs S., Vangronsveld J. An alliance of *Trifolium repens*–*Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii-mycorrhizal fungi from an old Zn–Pb–Cd rich waste heap as a promising tripartite system for phytostabilization of metal polluted soils // Front. Microbiol. 2022. V. 13. P. 853407.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.853407>

Promising Strains of Phosphate-Mobilizing Rhizobacteria Resistant to Glyphosate and Nickel

L. R. Khakimova^{a,b,✉}, O. V. Chubukova^{a,c}, E. S. Akimova^a, Z. R. Vershinina^{a,c}

^aInstitute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, RAS,

prosp. Oktyabrya 71, Ufa 450054, Russia

²Ufa State Petroleum Technological University,

ul. Kosmonavtov 1, Ufa 450062, Russia

^cUfa State Petroleum Technical University,

ul. Pervomaiskaya 14, Ufa 450044, Russia,

[✉]E-mail: lili-nigmatullina@bk.ru

A search was carried out for phosphate-soluble rhizobacteria capable of growing in the presence of different concentrations of the herbicide glyphosate and nickel heavy metal ions (Ni^{2+}). Using the Muromtsev medium, the phosphate-mobilizing activity was determined only in 3 out of 20 strains of *Rhizobium* spp. – with a low solubilization index (*IS*). On the contrary, all strains of *Pseudomonas* sp. showed a positive result, and the highest *IS* was in *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 and GOR 4.17. The highest growth activity under stressful conditions was shown by 4 strains of *Pseudomonas* spp.: OBA 2.4.1, OBA 2.9, 4.17 and STA 3, their growth was noticeably inhibited with an increase in the concentration of glyphosate in the medium to 10.0 mg/ml. The growth activity of *Rhizobium* spp. strains was characterized as average. When growing on a medium with $NiCl_2$, *Pseudomonas* strains sp. 65 HM and 67 HM grew to a concentration of 9 mM $NiCl_2$ in the medium, at a concentration of 11 mM, strain 67 HM gave growth in the form of single colonies. These strains were isolated from soil samples taken from sites contaminated with chemical effluents. It is possible that nickel chlorides were already present in such soil in high concentrations exceeding the norm, that is why these strains had such high resistance to nickel ions. Thus, *Rhizobium* sp. strains did not have the most active PGPR properties, but different strains of *Pseudomonas* sp. showed high resistance to glyphosate and nickel chloride. Thus, *Pseudomonas* sp. they demonstrated their high ability to adapt to stressful conditions. It is such PGPR bacteria (Plant Growth Promoting Rhizo bacteria) that can be considered as biological agents to increase the efficiency of bioremediation of agricultural soils.

Keywords: rhizobacteria PGPR, *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., glyphosate, nickel.