

ВПЛИВ ГЕРБИЦИДУ РАУНДАП НА АЗОТОФІКСУВАЛЬНІ БАКТЕРІЇ РОДУ *AZOTOBACTER*

Звір Галина Іванівна,

кандидат біологічних наук, доцент,

доцент кафедри мікробіології

Львівського національного університету імені Івана Франка

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9047-4418>

Scopus Author ID: 57217245960

Web of Science Researcher ID: L-4077-2017

Різун Ганна Михайлівна,

асистент кафедри лабораторної медицини

КЗВО ЛОР «Львівська медична академія імені Андрея Крупинського»

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3059-3789>

У статті наведено результати дослідження впливу гербициду Раундап на нагромадження біомаси та утворення йонів амонію клітинами азотофіксуювальних бактерій *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 та *Azotobacter* sp. А2. Чутливість бактерій до дії гербициду досліджували диско-дифузійним методом, використовуючи паперові диски, просочені різними концентраціями препарату. З метою дослідження впливу Раундапу на нагромадження біомаси азотофіксуювальні бактерії вирощували в середовищі Ешбі упродовж 2–3 діб за температури 28 °С та аеробних умов. Гербицид додавали в концентраціях 8 мл/л (рекомендована доза) та 16 мл/л. Біомасу та концентрацію йонів амонію вимірювали фотоелектроколориметричним методом за довжини хвилі 390 нм та 640 нм відповідно. Встановлено, що Раундап за рекомендованої до використання та вдвічі вищої дози інгібував ріст та утворення йонів амонію мікроорганізмами-діазотрофами за лабораторних умов. Внесення у середовище культивування бактерій Раундапу спричинило зниження нагромадження біомаси обома штамами азотофіксуювальних бактерій у логарифмічній фазі росту. Зниження біомаси, можливо, відбувається внаслідок присутності в гербициді, крім діючої речовини, інертних компонентів, консервантів тощо, призначених для підвищення ефективності препарату, стабільності, подовження терміну зберігання тощо. Попереднє культивування азотофіксуювальних бактерій у середовищі з Раундапом у рекомендованій дозі робить їх чутливими до дії гербициду і зумовлює зниження мікробної біомаси порівняно з вихідними культурами. Відновлення атмосферного азоту до аміаку вільноживучими азотофіксуювальними бактеріями роду *Azotobacter* пригнічувалося гербицидом залежно від його концентрації у середовищі та сенсителізації мікроорганізмів. Продемонстровано, що неодноразове застосування Раундапу сенсителізує мікроорганізми до дії гербициду, що зрештою негативно позначається не лише на нагромадженні біомаси, але й на процесі діазотрофії. Наголошено на важливості дозованого та обґрунтованого застосування гербицидів на основі гліфосату задля уникнення негативного впливу на мікроорганізми ґрунту, що беруть участь у кругообігу нітрогену.

Ключові слова: гербициди, гліфосат, Раундап, азотофіксуювальні мікроорганізми, *Azotobacter*, діазотрофія.

Zvir Galyna, Rizun Hanna. Effect of the herbicide Roundup on nitrogen-fixing bacteria of the genus *Azotobacter*

The article presents the results of a study on the effect of the herbicide Roundup on biomass accumulation and ammonium ion formation by nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter chroococcum* VKM B-1272 and *Azotobacter* sp. A2. The sensitivity of the bacteria to the herbicide was assessed by the disc diffusion method using paper discs impregnated with different concentrations of the preparation. To investigate the effect of Roundup on biomass accumulation, nitrogen-fixing bacteria were cultivated in Ashby medium for 2–3 days at 28 °C under aerobic conditions. The herbicide was added at concentrations of 8 mL/L (recommended dose) and 16 mL/L. Biomass and ammonium ion concentrations were measured using a photoelectric colorimeter at wavelengths of 390 nm and 640 nm, respectively. The results showed that Roundup, at both the recommended and double doses, inhibited the growth and ammonium ion production by diazotrophic microorganisms under laboratory conditions. The addition of Roundup to the cultivation medium reduced biomass accumulation by both strains of nitrogen-fixing bacteria during the logarithmic growth phase. This reduction may be attributed not only to the active ingredient, but also to the presence of inert components, preservatives, and other additives in the herbicide formulation, designed to enhance efficacy, stability, and shelf life. Preliminary cultivation of nitrogen-fixing bacteria in medium containing Roundup at the recommended dose increased their sensitivity to the herbicide, resulting in lower microbial biomass compared with the original cultures. The reduction of atmospheric nitrogen to ammonia by free-living nitrogen-fixing bacteria of the genus *Azotobacter* was inhibited by the herbicide depending on its concentration in the medium and the sensitisation of microorganisms. The findings demonstrated that repeated application of Roundup sensitizes microorganisms to its action, ultimately exerting a negative impact not only on biomass accumulation but also on the process of diazotrophy. These results emphasize the importance of the rational and controlled use of glyphosate-based herbicides to minimize adverse effects on soil microorganisms involved in the nitrogen cycle.

Key words: herbicides, glyphosate, Roundup, nitrogen-fixing microorganisms, *Azotobacter*, diazotrophy.

Вступ. Пестициди є ефективним та економічним способом підвищення якості та кількості врожаю. Вони забезпечують продовольчу безпеку країн в умовах постійно зростаючої кількості населення на нашій планеті. За оцінками фахівців, третину сільськогосподарської продукції у світі отримують завдяки застосуванню засобів захисту рослин. Їх використовують для різних видів культур з метою знищення, відлякування та контролю чисельності шкідників (гризунів, комах), зниження забур'яненості полів. Без застосування пестицидів втрати плодів, овочів та зернових від шкідників, фітопатогенів і бур'янів сягали б від 30 % до 100 % [1]. У квітникарстві та ландшафтному дизайні пестициди використовують з метою контролю чисельності шкідливих комах, що пошкоджують квіти й листя, знищення кліщів, які становлять загрозу для рослин, особливо в умовах теплиць, а також для профілактики та лікування грибкових захворювань, таких як фітофтороз, борошниста роса, сіра й коренева гниль, парша тощо. Гербіциди застосовують також для знищення небажаної рослинності на узбіччях, тротуарах та інших територіях несільськогосподарського призначення.

Кожна країна самостійно визначає перелік препаратів, дозволених до застосування, а також список хімічних речовин, заборонених для використання на сільськогосподарських угіддях. Державну реєстрацію пестицидів і агрохімікатів здійснює Міністерство захисту довкілля та природних ресурсів України, що реалізує державну політику у сфері охорони навколишнього природного середовища, в порядку та розмірах, встановлених Кабінетом Міністрів України, на підставі позитивних результатів випробувань та матеріалів досліджень. Перелік пестицидів та агрохімікатів, дозволених до використання в Україні, побудований на основі інтерактивної версії державного реєстру пестицидів та агрохімікатів [2]. Його оновлюють автоматично залежно від поточної дати на основі даних про реєстрацію препаратів. Станом на червень 2024 року, у цьому переліку понад 1000 гербіцидів, обсяги застосування яких продовжують зростати в Україні, незважаючи на війну. За даними керівника агрохімічного напрямку та бренду DEFENDA LNZ Group Сергія Борисова, за перше півріччя 2024 року обсяги продажу гербіцидів зросли практично в усіх виробників. Цьому сприяли такі чинники, як ціна, котра порівняно з 2023 роком стала доступнішою для аграріїв, а також необхідність обробок, без яких неможливе отримання запланованого врожаю [3].

Застосування гербіцидів у сільському господарстві зумовлене насамперед високою забур'яненістю посівів. Використання поживних речовин бур'янами за відсутності заходів боротьби з ними значно перевищує можливість засвоєння їх культурними рослинами. На площах із високою забур'яненістю погіршується якість проведення передпосівного обробітку, сівби та догляду за посівами під час вегетації, що призупиняє ріст і розвиток рослин, погіршує умови формування репродуктивних органів, унаслідок чого відбувається зниження урожайності та якості продукції [4, 5].

У переліку дозволених до використання в Україні гербіцидів приблизно 10 % – препарати, діючою речовиною яких є гліфосат (N-фосфометильне похідне амінокислоти гліцину (*Глі-Фос-ат*) (рис. 1).

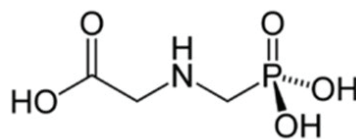


Рис. 1. Структурна формула гліфосату ($C_3H_8NO_5P$) [6]

З хімічного погляду гліфосат – слабка органічна кислота. У препаратах гліфосат ($C_3H_8NO_5P$) представлений у вигляді солей – калієвої, етаноламінної, диметиламінної, амонійної чи ізопропіламінної, завдяки чому він набуває високої розчинності у воді і стає хімічно стабільним [6].

Гліфосат – неспецифічний фосфорорганічний пестицид, який широко застосовують в сільському господарстві проти багаторічних та однорічних бур'янів, а також у лісівництві, присадибних господарствах та міських районах. Він є важливим компонентом неселективних та післясходових гербіцидів, які використовують для захисту сільськогосподарських культур від трав, однорічних широколистяних бур'янів, деревної рослинності тощо [4]. Гліфосат – єдиний гербіцид, який діє на 5-енолпірувілшикимат-3-фосфатсинтазу (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase, EPSPS)). Цей фермент каталізує синтез хоризмату – рослинного попередника трьох ароматичних амінокислот (фенілаланіну, тирозину, триптофану), а також низки інших важливих для рослини сполук, зокрема саліцилової кислоти та деяких алкалоїдів [7]. Інгібування ферменту EPSPS гліфосатом призводить до зниження інтенсивності біосинтезу вторинних метаболітів та структурних білків, що обумовлює порушення білкового обміну в клітинах рослин. Унаслідок цього відбувається пригнічення утворення хлорофілу, що зумовлює порушення фотосинтезу і подальшу загибель рослин. Фітотоксична дія гербіциду проявляється в поступовому в'яненні оброблених бур'янів, побурінні надземних органів і відмиранні підземної частини рослини.

Солі гліфосату використовують також як десиканти з метою прискорення досягання культури і полегшення збирання врожаю, оскільки вони чинять системну дію на рослину – як на надземну, так і на кореневу частину, пришвидшуючи природний процес дозрівання зерна [8, 9]. Тому гербіциди на основі гліфосату є найпоширенішими пестицидами у світі. Комерційні продукти, що містять гліфосат, різняться за складом і продаються під численними торговими назвами у більш ніж 130 країнах світу [10]. Найпопулярнішими в Україні є Раундап, Ураган, Гліфовіт, Торнадо, Отаман, Напалм. Ці препарати зазвичай містять добавки, інертні інгредієнти та поверхнево-активні речовини (ПАР). Наприклад, крім основної діючої речовини, до складу Раундапу

входять сорбінова кислота, натрій сульфат, амоній сульфат, калій гідроксид, метилпіролідон, ізобутан, 3-йодо-2-пропінілбутилкарбамат [11].

Гліфосат вважають безпечнішим за інші гербіциди, проте його надмірне використання має хронічний вплив на навколишнє середовище. Його висока розчинність у гідрофільних розчинниках, особливо у воді, та висока мобільність призводять до вимивання гліфосату в ґрунт, що спричинює забруднення ґрунтових вод та накопичення його в тканинах рослин. Наслідком є зниження врожайності, низька якість сільськогосподарської продукції, погіршення родючості ґрунту, забруднення води та виникнення загрози життю людини та тварин [4].

Деградація гліфосату у воді, водних осадах та ґрунті обумовлена головню його руйнуванням мікроорганізмами [7, 12]. Основний шлях деградації гліфосату полягає в розщепленні С-N-зв'язку з утворенням первинного метаболіту – амінометилфосфонової кислоти (АМФК), яка згодом розкладається мікроорганізмами до вуглекислого газу та інших простих неорганічних сполук. АМФК, яку часто виявляють в осадових, поверхневих та ґрунтових водах, спричинює вторинне забруднення навколишнього середовища [13].

Гліфосат може змінювати структуру та біологічні властивості ґрунту, впливати на мікробне різноманіття, однак його вплив на ґрунтовий мікробіом залишається суперечливим. Інгібування EPSPS гліфосатом порушує синтез основних вторинних метаболітів і білків у рослин, в також пригнічує ключові енергетичні метаболічні шляхи у клітинах ґрунтових мікроорганізмів [7]. Багаторічні дослідження впливу гліфосату на полях канадських прерій у сівозміні пшениця – польовий горох – канола – пшениця не виявили суттєвих змін мікробних властивостей ґрунту [14]. Vázquez et al. продемонстрували тимчасовий стимулювальний ефект на нагромадження біомаси ґрунтових грибів та негативний вплив гліфосату на їхнє видове різноманіття на сільськогосподарських угіддях у разі внесення в ґрунт подвійних доз гербіциду або тривалого (повторного) застосування гліфосату [15]. Застосування подвійних доз гліфосату спричинює зниження чисельності актинобактерій ґрунту та зростання кількості еубактерій та мікроміцетів, ріст та розмноження яких залежать від продукованих актинобактеріями антибіотиків [16]. Інертні компоненти, добавки, ПАР препаратів на основі гліфосату можуть компенсувати токсичний вплив діючої речовини, стимулюючи ріст мікроорганізмів та прискорюючи деградацію гліфосату [11, 17]. Препарати гліфосату можуть пригнічувати ключові енергетичні метаболічні шляхи у клітинах ґрунтових мікроорганізмів, у тому числі роботу нітрогеназного комплексу азотофіксувальних мікроорганізмів, завдяки яким відбувається фіксування атмосферного нітрогену.

Мета дослідження – дослідити вплив гербіциду Раундап на нагромадження біомаси та утворення йонів амонію клітинами азотофіксувальних бактерій роду *Azotobacter* за лабораторних умов.

Матеріал та методи. Об'єктом дослідження були азотофіксувальні бактерії *Azotobacter chroococcum* ВКМ

В-1272, які зберігаються в колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка, а також штаму *Azotobacter* sp. А2, виділений із ґрунту, забрудненого пестицидами. Бактерії виділяли з ґрунту, відібраного з верхнього шару (0–15 см) поблизу складу пестицидів та мінеральних добрив на території Пустомитівського району Львівської області, висіваючи зразки на середовище Ешбі [18]. Колонії мікроорганізмів, які вирости на середовищі Ешбі, пересівали на щільне елективне середовище для *Azotobacter chroococcum* такого складу (г/л): глюкоза – 20,0; K_2HPO_4 – 0,8; $CaCO_3$ – 20,0; $FeCl_3 \times 6H_2O$ – 0,1; $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ – 0,005; агар – 20,0; вода дистильована – 1 л. Після отримання чистих культур проводили морфологічну ідентифікацію та досліджували біохімічні властивості бактерій з метою підтвердження їхньої приналежності до роду *Azotobacter*.

На елективному для *A. chroococcum* середовищі бактерії росли у вигляді слизистих, круглих, матових колоній діаметром 5–10 мм, білого чи молочного кольору, з випуклим профілем, маслянистою чи пастоподібною консистенцією. Бактерії Грам-негативні, аеробні, неспортовірі, овальної чи кулястої форми, розміром 1,5–2 мкм, оточені капсулою, рухливі. Клітини розташовані поодинокі чи парами (рис. 2). Оптимальна температура росту +25...+30 °С. Як джерело карбону використовують глюкозу, сахарозу, маніт, гліцерин. Бактерії каталазо- та оксидазопозитивні. Загалом виділено 5 штамів, один з яких (*Azotobacter* sp. А2) використано для подальших досліджень.



Рис. 2. Азотофіксувальні бактерії, виділені з ґрунту на елективному для *Azotobacter chroococcum* середовищі (світлова мікроскопія, $\times 1000$)

З метою визначення чутливості бактерій роду *Azotobacter* до дії Раундапу використовували метод дифузії в агаризоване середовище з використанням паперових дисків, які насичували різними концентраціями гербіциду. Розплавлене живильне середовище (м'ясо-пептонний агар, МПА) розливали в стерильні чашки Петрі, наносили дві-три краплі суспензії бактерій, які розтирали стерильним шпателем по поверхні середовища (посів газоном). Диски, насичені різними концентраціями гербіциду (8 мл/л – рекомендована

виробником доза; подвійна доза – 16 мл/л; половинна доза – 4 мл/л), поміщали на чашку з МПА за допомогою профламбованого пінцета. Чашки культивували в термостаті за температури 28 °С упродовж 48 год. За діаметром зони затримки росту досліджуваних культур навколо дисків оцінювали їхню чутливість до Раундапу. У роботі використовували препарат фірми Монсанто, який містить 360 г/л гліфосату.

З метою дослідження впливу Раундапу на ріст бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272 та *Azotobacter* sp. А2 культури вирощували в пробірках об'ємом 20 мл у середовищі Ешбі (густина засіву – 0,05 г/л) упродовж 2–3 діб за температури 28 °С та аеробних умов, вносячи Раундап у концентраціях 8 та 16 мл/л середовища. Контролем було середовище Ешбі без гербіциду. Біомасу вимірювали за мутністю розведеної суспензії клітин фотометричним методом з використанням фотоелектроколориметра КФК-3 ($\lambda = 390$ нм) у кюветі з оптичним шляхом 3 мм і розраховували за формулою: C (г/л) = $E_{390} \times n / K$, де E_{390} – екстинкція за довжини хвилі 390 нм; n – розведення, разів; K – коефіцієнт перерахунку, отриманий за калібрувальною кривою залежності екстинкції від сухої маси клітин (для *A. chroococcum* ВКМ В-1272 $K = 0,77 \pm 0,08$, для *Azotobacter* sp. А2 $K = 0,79 \pm 0,09$). Концентрацію йонів амонію вимірювали фотоелектроколориметричним методом ($\lambda = 640$ нм) [18].

Усі дослідження виконували у трьох повторях. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програм Microsoft Excel 2003, Origin Pro 7,0. Вираховували основні статистичні показники за безпосередніми даними (середнє арифметичне – M ; стандартна похибка середнього арифметичного – m).

Результати дослідження. Нітроген є життєво важливою сполукою для росту та розвитку живих організмів, проте через його інертний потрійний зв'язок атмосферний азот не може безпосередньо засвоюватися рослинами. Приблизно 80% N_2 перетворюється у форми, придатні для засвоєння рослинами (солі амонію та нітрати), завдяки біологічній фіксації азоту азо-

тофікувальними мікроорганізмами, що належать до різних таксономічних груп [19]. Застосування засобів захисту рослин (гербіцидів, фунгіцидів, інсектицидів) може впливати на різноманітність та активність мікробних угруповань і на кругообіг нітрогену в природі загалом. Тому важливо суворо дотримуватися рекомендацій виробника щодо дозування цих препаратів.

Застосування диско-дифузійного методу показало, що гербіцид Раундап у рекомендованій концентрації (8 мл/л) не впливав на ріст музейної культури азотофіксувальних бактерій. За вдвічі вищої концентрації унаслідок дифузії в агар Раундапу спостерігали незначне інгібування росту бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272, про що свідчить утворення стерильних зон навколо індикаторних дисків, діаметр яких становив 8–11 мм (рис. 3).

Бактерії *Azotobacter* sp. А2, виділені із забрудненого пестицидами ґрунту, були більш чутливими до дії досліджуваного гербіциду. За рекомендованої до використання дози гербіцид унаслідок дифузії в агар інгібував ріст бактерій – діаметр зони затримки росту становив 12–15 мм. Збільшення концентрації гербіциду вдвічі (16 мл/л) зумовлювало збільшення діаметру стерильної зони до 17–18 мм (рис. 4). М'ясо-пептонний агар є багатим живильним середовищем, яке містить джерела карбону, нітрогену, вітамінів, амінокислот, тому поява стерильних зон навколо дисків демонструє пряму токсичність і локальний ефект гербіциду відповідно до його концентрації.

Мікробний ценоз ґрунту першим контактує з чужорідними для довкілля речовинами (ксенобіотиками). Адаптуючись до нових умов існування, мікроорганізми формують стійкість до них або змінюють свої фізіологічні властивості, що може позначитись на родючості ґрунту загалом. Особливо чутливою до дії токсичних сполук є логарифмічна фаза росту, в якій клітини активно діляться, синтезують білки, нуклеїнові кислоти, компоненти клітинної стінки. У випадку азотофіксувальних бактерій навіть невеликі дози ксенобіотиків можуть спричинити значне уповільнення росту й зни-

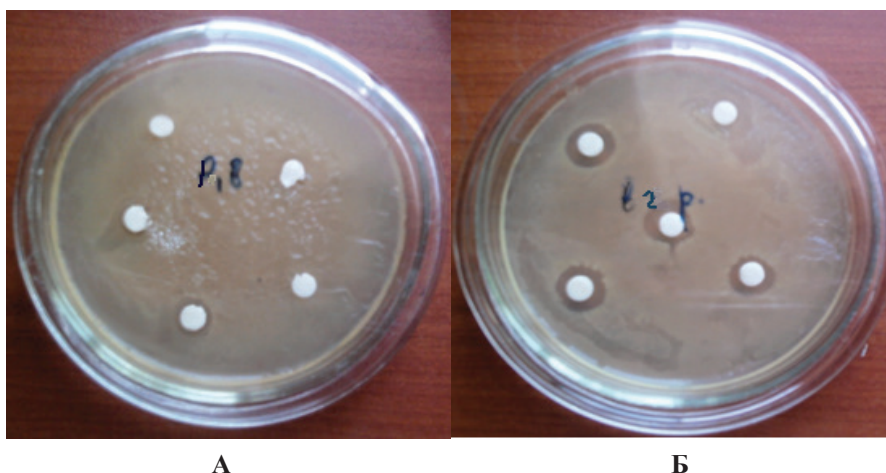


Рис. 3. Чутливість бактерій *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 до дії гербіциду Раундап (А – 8 мл/л; Б – 16 мл/л)

ження показників біомаси. Внесення Раундапу у середовище Ешбі призвело до зниження нагромадження біомаси обома штамми азотфіксувальних бактерій у логарифмічній фазі росту (рис. 5).

Упродовж першої доби культивування значення біомаси в контролі було більшим у 1,4 разу для *A. chroococcum* ВКМ В-1272 та в 1,1 разу для *Azotobacter* sp. A2 порівняно з відповідним показником за впливу гербіциду у рекомендованій дозі. За внесення у середовище Ешбі подвійної концентрації Раундапу спостерігали зниження біомаси азотфіксувальних бактерій у 4,2 разу для *A. chroococcum* ВКМ В-1272 та у 2,5 разу

для *Azotobacter* sp. A2 стосовно контролю. На другу добу росту на фоні зростання біомаси у середовищі без гербіциду виявлено пригнічення росту обох штамів азотфіксувальних бактерій за дії рекомендованої та вдвічі вищої дози Раундапу. Зниження біомаси, можливо, відбувається внаслідок присутності в гербіциді крім гліфосату (який бактерії можуть використовувати як джерело карбону, нітрогену, фосфору) інертних компонентів, ПАР тощо, призначених для підвищення ефективності препарату, стабільності, подовження терміну зберігання тощо. До складу Раундапу входять ізобутан, метилпіролідон, сорбінова кислота, натрій сульфат, амоній суль-

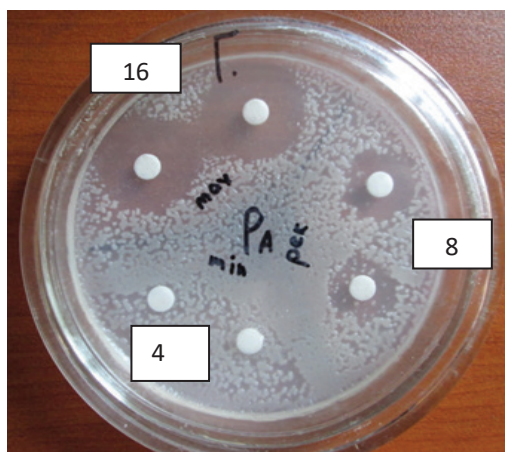


Рис. 4. Чутливість *Azotobacter* sp. A2 до дії гербіциду Раундап за різних концентрацій

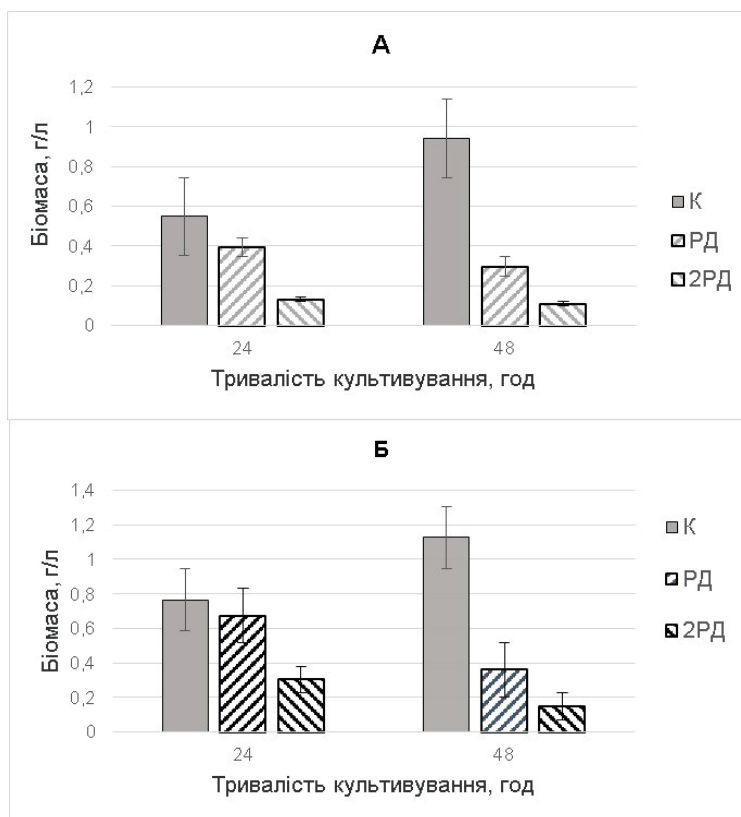


Рис. 5. Нагромадження біомаси азотфіксувальними бактеріями *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 (А) та *Azotobacter* sp. A2 (Б) за впливу Раундапу (К – контроль; РД – рекомендована доза; 2РД – подвійна доза)

фат, калій гідроксид, 3-йодо-2-пропінілбутилкарбамат, що, можливо, робить препарат токсичнішим порівняно з його діючою речовиною – гліфосатом. Суттєве зниження біомаси бактерій виявлено у разі збільшення концентрації гербіциду в 2 рази, тобто у разі перевищення рекомендованої дози (у 8,7 разу для *A. chroococcum* ВКМ В-1272 та в 7,6 разу для *Azotobacter* sp. А2).

У сільськогосподарській практиці одноразове внесення гербіциду не забезпечує повного знищення бур'янів, тому з метою контролю забур'яненості посівних площ та підвищення врожайності застосовують повторні обробки ділянок (проти так званої другої хвилі сходів). Враховуючи здатність гліфосату акумулюватися в ґрунті та його тривалий період напіврозпаду (від 20 до 100 днів), ми дослідили нагромадження біомаси азотофіксувальними бактеріями, попередньо вирощеними у середовищі з Раундапом у рекомендованій дозі, за впливу гербіциду (рис. 5).

Попереднє культивування азотофіксувальних бактерій у середовищі з Раундапом робить їх чутливими (сенсibiliзованими) до гербіциду і зумовлює зниження мікробної біомаси у середовищі Ешбі порівняно з вихідними культурами. Вирощені у середовищі з Раундапом за концентрації 8 мл/л бактерії *A. chroococcum* ВКМ В-1272 накопичували упродовж першої доби в 1,8 разу менше біомаси порівняно з музей-

ною культурою. У випадку бактерій *Azotobacter* sp. А2, попередньо вирощених у середовищі з гербіцидом, біомаса знизилася в 1,4 разу порівняно з контролем. Додавання в середовище культивування Раундапу в концентрації 8 та 16 мл/л призвело до зниження біомаси порівняно з вихідними культурами: в 1,8 та 3,0 рази для *A. chroococcum* ВКМ В-1272, в 1,4 та 2,2 разу – для *Azotobacter* sp. А2 відповідно.

Упродовж другої доби спостерігали зростання біомаси обох культур, проте сенсibiliзовані до Раундапу азотофіксувальні бактерії нагромаджували біомаси менше порівняно з контролем (*A. chroococcum* ВКМ В-1272 – в 1,2 разу, *Azotobacter* sp. А2 – в 1,4 разу). За дії 8 та 16 мл/л Раундапу біомаса обох сенсibiliзованих культур знижувалася порівняно з контролем: у 2,5 та 4,0 рази для *A. chroococcum* ВКМ В-1272, в 2,1 та 3,4 рази – для *Azotobacter* sp. відповідно. Можна припустити, що попереднє культивування бактерій за дії гербіциду підвищує їхню чутливість до препарату, водночас сприяючи формуванню адаптаційних механізмів чи активуванню ферментних систем за умов дефіциту джерел нітрогену.

Бактерії роду *Azotobacter* є вільноживучими діазотрофами, здатними фіксувати атмосферний азот. Вони мають комплекс ферментів, необхідних для процесу діазототрофії: ферредоксини, гідрогенази, нітрогенази. Глі-

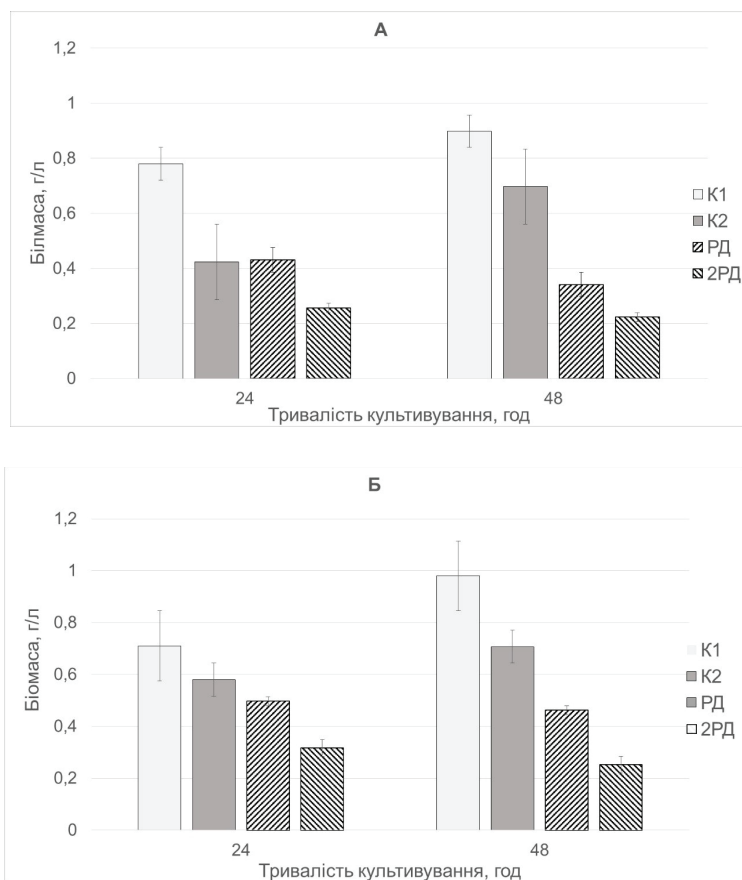


Рис. 5. Вплив Раундапу на нагромадження біомаси бактеріями *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 (А) та *Azotobacter* sp. А2 (Б), попередньо вирощеними у середовищі з гербіцидом (К1 – контроль; К2 – культура, сенсibiliзована до Раундапу; РД – рекомендована доза; 2РД – подвійна доза)

фосат не чинить прямої токсичної дії на нітрогеназний комплекс, оскільки не є специфічним інгібітором цих білків. Проте він може діяти опосередковано – порушувати метаболізм клітин, блокуючи шикиматний шлях, оскільки 5-енолпірувілшикимат-3-фосфатсинтаза чутлива до дії гліфосату. На прикладі симбіотичних азотофіксувальних мікроорганізмів *Bradyrhizobium japonicum* показано, що гліфосат знижував кількість бульбочок на коренях сої та вміст у них леггемоглобіну [20].

Відновлення атмосферного азоту до аміаку вільноживучими азотофіксувальними бактеріями роду *Azotobacter* пригнічувалося гербіцидом залежно від його концентрації у середовищі, фази росту культури та сенситивізації мікроорганізмів (рис. 6).

Азотофіксувальний потенціал бактерій *Azotobacter* sp. A2, виділених із забрудненого пестицидами ґрунту, виявився дещо вищим як у вихідної, так і в сенситивізованої до Раундапу культури порівняно з *A. chroococcum* ВКМ В-1272 – виділені з ґрунту бактерії *Azotobacter* sp. A2 під час росту у середовищі Ешбі нагромаджували в 1,3 разу вищі концентрації йонів амонію порівняно з музейною культурою. Попереднє вирощування бактерій у середовищі з Раундапом зумовило зниження концентрації йонів амонію під час логарифмічної фази росту обох штамів. За дії Раундапу у концентрації 8 та 16 мл/л сенситивізовані бактерії *A. chroococcum*

ВКМ В-1272 утворювали відповідно в 1,2 та 1,6 разу менше йонів амонію стосовно контролю. Сенситивізовані бактерії *Azotobacter* sp. A2 упродовж першої доби утворювали в 2,7 та 4,3 разу менше йонів амонію порівняно з контролем за впливу Раундапу у рекомендованій та вдвічі вищій концентрації відповідно. Отримані результати дозволяють припустити, що процес діазототрофії у цього штаму є більш чутливим до дії гербіциду порівняно з музейною культурою.

На другу добу концентрація йонів амонію знижувалася порівняно з першою добою і в контролі, і за впливу гербіциду. Причиною цього може бути інгібування нітрогенази утвореними у процесі діазототрофії йонами амонію. Раундап зумовлював дозозалежне зниження концентрації йонів амонію у середовищі росту бактерій. Сенситивізовані бактерії *A. chroococcum* ВКМ В-1272 утворювали в 3,4 та 4,2 разу менше йонів амонію за впливу Раундапу у рекомендованій та вдвічі вищій концентрації. Порівняно з вихідною культурою ці показники були нижчими в 5,3 та 6,7 разу відповідно. Бактерії *Azotobacter* sp. A2 на другу добу утворювали в 2,8 та 4,1 разу менше йонів амонію за впливу Раундапу у концентрації 8 та 16 мл/л відповідно. Порівняно з несенситивізованою культурою ці показники були нижчими в 3,1 та 4,7 разу. Нітрогеназа є дуже чутливим ферментним комплексом, активність якого залежить

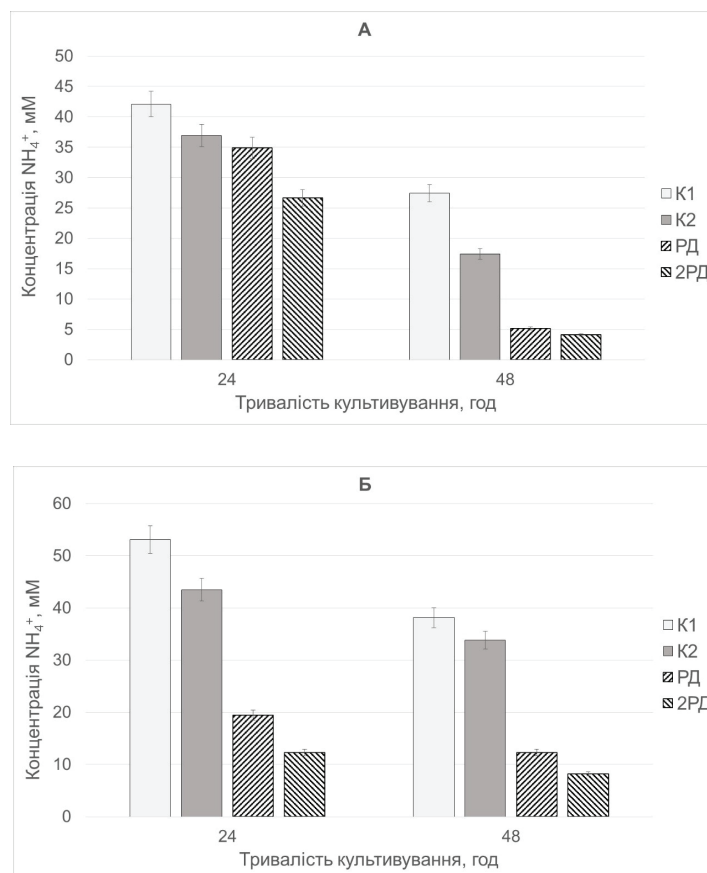


Рис. 6. Вплив Раундапу на утворення йонів амонію бактеріями *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 (А) та *Azotobacter* sp. A2 (Б), попередньо вирощеними у середовищі з гербіцидом (K1 – контроль; K2 – культура, сенситивізована Раундапом; РД – рекомендована доза; 2РД – подвійна доза)

від концентрації молекулярного кисню, зв'язаних форм нітрогену (нітратів, нітритів, йонів амонію), металів-антагоністів, які витісняють молібден або ферум з активного центру, органічних сполук тощо. Розчинники, емульгатори, стабілізатори, ПАР, які входять до складу пестицидів і перелік яких виробники зазвичай не зазначають на етикетці, можуть негативно впливати на ріст та метаболізм азотофіксуювальних бактерій, зумовлюючи денатурацію білків, порушення проникності й цілісності клітинних мембран, транспорту електронів, блокування FeMo-кофактора. Вплив гербіциду залежить від культури діазотрофа, концентрації гліфосату, кратності його внесення та інших чинників.

Висновки. У роботі продемонстровано чутливість вільноживучих азотофіксуювальних бактерій *A. chroococcum* BKM B-1272 та *Azotobacter* sp. A2 до дії гербіциду Раундапу, який широко використовують у сільськогосподарській практиці. Встановлено, що

навіть рекомендовані виробником дози цього препарату здатні інгібувати ріст та утворення йонів амонію мікроорганізмами-діазотрофами за лабораторних умов. Враховуючи здатність гліфосату акумулюватися частинками ґрунту та тривалий період напіврозпаду, ми продемонстрували наслідки для азотофіксуювальних бактерій збільшення концентрації Раундапу та його повторного внесення в ґрунт задля досягнення бажаного гербіцидного ефекту. Неодноразове застосування гербіциду робить мікроорганізми підвищено чутливими до дії гліфосату, що зрештою негативно позначається не тільки на нагромадженні біомаси, але й на процесі діазототрофії. Тому результати, представлені у цій роботі, вказують на важливість дозованого та обґрунтованого застосування гербіцидів на основі гліфосату та перспективність подальшого вивчення їхнього впливу на мікроорганізми ґрунту, що беруть участь у кругообігу нітрогену у природі.

Література:

1. Капустіна К. Захист культур від побічних ефектів: як врятувати і поля, і довкілля. 2021. URL: <https://kurkul.com/>.
2. Державний реєстр пестицидів та агрохімікатів, дозволених до використання в Україні (інтерактивна версія). URL: <https://agrarii-razom.com.ua/derzhavnyj-rejestr-pestycydiv-agrohimikativ>.
3. Цибульська С. Підсумки 2024: ринок ЗЗР у грошовому вимірі зменшився, але за обсягами зріс. 2024. URL: <https://agroportal.ua/news/>.
4. Rawat D., Bains A., Chawla P., Kaushik R., Yadav R., Kumar A., Sridhar K., Sharma M. Hazardous impacts of glyphosate on human and environment health: Occurrence and detection in food. *Chemosphere*. 2023. Vol. 329. 138676. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138676>.
5. Малярчук М. П., Томницький А. В., Малярчук А. С., Мишукова Л. С. Забур'яненість посівів і продуктивність сівозмін залежно від співвідношення культур і систем обробітку ґрунту на зрошенні півдня України. *Аграрні інновації*. 2020. № 2. С. 56–61. DOI: <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2020.2.9>.
6. Білан М. В., Лещова М. О. Корекція мікробіоти кишечника під впливом ксенобіотиків та імуностимуляторів. Монографія. Дніпро, 2022. 128 с.
7. Singh S., Kumar V., Gill J. P. K., Datta S., Singh S., Dhaka V., Kapoor D., Wani A. B., Dhanjal D. S., Kumar M., Hari Kumar S. L., Singh J. Herbicide Glyphosate: toxicity and microbial degradation. *Int J Environ Res Public Health*. 2020. Vol. 17(20). 7519. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph17207519>.
8. Гринько Ю. Особливості десикації. Коли, навіщо і чим? *Агроном*. 2021. URL: <https://www.agronom.com.ua/>.
9. Zioga E., White B., Stout J. C. Glyphosate used as desiccant contaminates plant pollen and nectar of non-target plant species. *Heliyon*. 2022. e12179. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12179>.
10. Недопитанська Н.М. Проблема канцерогенної небезпеки гліфосату: нові дані. *Сучасні проблеми токсикології*. 2011. № 1–2. С. 5–15.
11. Pochron S., Simon L., Mirza A., Littleton A., Sahebzada F., Yudell M. Glyphosate but not Roundup® harms earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*. 2020. Vol. 241. 125017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125017>.
12. Zhan H., Feng Y., Fan X., Chen S. Recent advances in glyphosate biodegradation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018. Vol. 102(12). P. 5033–5043. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9035-0>.
13. Кузнєцова О. М., Чміль В. Д. Гліфосат: поведінка у навколишньому середовищі та рівні залишків. *Сучасні проблеми токсикології*. 2010. № 48(1). С. 87–95.
14. Lupwayi N. Z., Blackshaw R. E., Geddes C. M., Dunn R., Petri R. M. Multi-year and multi-site effects of recurrent glyphosate applications on the wheat rhizosphere microbiome. *Environ Res*. 2022. Vol. 215(Pt 3). 114363. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114363>.
15. Vázquez M. B., Moreno M. V., Amodeo M. R., Bianchinotti M. V. Effects of glyphosate on soil fungal communities: A field study. *Rev Argent Microbiol*. 2021. Vol. 53(4). P. 349–358. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.10.005>.
16. Sumalan R. M., Alexa E., Negrea M., Sumalan R. L., Doncean A., Pop G. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Romanian soils. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 2010. Vol. 75(2). P. 167–172.
17. Звір Г. І., Мороз О. М., Гнатуш С. О. Дисиміляційна сульфатредукція у бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* ІМВ К-6 за впливу гербіцидів Ураган і Раундап. *Вісник Дніпропетровського університету. Серія : Біологія. Медицина*. 2015. Вип. 6(1). С. 40–44. DOI: <https://doi.org/10.15421/021508>.
18. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Яворська Г. В., Білінська І. С., Борсукевич Б. М. Практикум з мікробіології // Підручник. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2014. 436 с.
19. Alomari S. M., Hasan R. S., Al-Najim A. N., Saadi A. M. Nitrogen-fixing bacteria and their applications in the environment: A Review. *Int J Med & All Body Health Res*. 2024. Vol. 5, Iss. 4. P. 178–187. DOI: <https://doi.org/10.54660/IJMBHR.2024.5.4.178-187>.

20. Zablotowicz R. M., Reddy K. N. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. *J Environ Qual*. 2004. Vol. 33(3). P. 825–831. DOI: <https://doi.org/10.2134/jeq2004.0825>.

References:

1. Kapustina, K. (2021). Zakhyst kultur vid pobichnykh efektiv: yak vriatuvaty i polia, i dokillia [Protecting crops from side effects: how to save both fields and the environment]. URL: <https://kurkul.com/> [in Ukrainian].
2. Derzhavnyi reiestr pestytsydiv ta ahrokhimikativ, dozvolenykh do vykorystannia v Ukraini (interaktyvna versia). URL: <https://agrarii-razom.com.ua/derzhavnyj-reiestr-pestytsydiv-agrokhimikativ> [in Ukrainian].
3. Tsybul'ska, S. (2024). Pidsumky 2024: rynok ZZR u hroshovomu vymiri zmenshyvsia, ale za obsiahamy zris [Results of 2024: the market for plant protection products decreased in monetary terms but grew in volume]. URL: <https://agroportal.ua/news/> [in Ukrainian].
4. Rawat, D., Bains, A., Chawla, P., Kaushik, R., Yadav, R., Kumar, A., Sridhar, K., Sharma, M. (2023). Hazardous impacts of glyphosate on human and environment health: Occurrence and detection in food. *Chemosphere*, 329, 138676. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138676>.
5. Maliarchuk, M. P., Tomnytskyi, A. V., Maliarchuk, A. S., Myshukova, L. S. (2020). Zaburianenist posiviv i produktyvnist sivozmin zalezno vid spivvidnoshennia kultur i system obrobitku gruntu na zroshenni pivdnia Ukrainy [Weed infestation of crops and crop rotation productivity depending on the ratio of crops and tillage systems in irrigated areas of southern Ukraine]. *Ahrarni innovatsii*, 2, 56–61. DOI: <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2020.2.9> [in Ukrainian].
6. Bilan, M. V., Lieshchova, M. O. (2022). Korektsiia mikrobioty kyshechnyky pid vplyvom ksenobiotykyv ta imunostymulatoriv [Correction of the intestinal microbiota under the influence of xenobiotics and immunostimulants]. *Monohrafiia*. Dnipro, 128 s. [in Ukrainian].
7. Singh, S., Kumar, V., Gill, J. P. K., Datta, S., Singh, S., Dhaka, V., Kapoor, D., Wani, A. B., Dhanjal, D. S., Kumar, M., Harikumar, S. L., Singh, J. (2020). Herbicide Glyphosate: toxicity and microbial degradation. *Int J Environ Res Public Health*, 17(20), 7519. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph17207519>.
8. Hrynko, Yu. (2021). Osoblyvosti desykatsii. Koly, navishcho i chym? [Features of desiccation. When, why and with what?]. *Ahronom*. URL: <https://www.agronom.com.ua/> [in Ukrainian].
9. Zioga, E., White, B., Stout, J. C. (2022). Glyphosate used as desiccant contaminates plant pollen and nectar of non-target plant species. *Heliyon*, e12179. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12179>.
10. Nedopytanska, N. M. (2011). Problema kancerogennoi' nebezpeky glifosatu: Novi dani [The problem of cancerogenous danger of glyphosate: New data]. *Suchasni Problemy Toksykologii*, 1–2, 5–15 [in Ukrainian].
11. Pochron, S., Simon, L., Mirza, A., Littleton, A., Sahebzada, F., Yudel, M. (2020). Glyphosate but not Roundup® harms earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, 241, 125017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125017>.
12. Zhan, H., Feng, Y., Fan, X., Chen, S. (2018). Recent advances in glyphosate biodegradation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102(12), 5033–5043. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9035-0>.
13. Kuznietsova, O. M., Chmil, V. D. (2010). Hlifosat: povedinka u navkolyshnomu seredovyschi ta rivni zalyshkiv [Glyphosate: behaviour in the environment and residue levels]. *Suchasni problemy toksykologii*, 48(1), 87–95 [in Ukrainian].
14. Lupwayi, N. Z., Blackshaw, R. E., Geddes, C. M., Dunn, R., Petri, R. M. (2022). Multi-year and multi-site effects of recurrent glyphosate applications on the wheat rhizosphere microbiome. *Environ Res*, 215(Pt 3), 114363. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114363>.
15. Vázquez, M. B., Moreno, M. V., Amodeo, M. R., Bianchinotti, M. V. (2021). Effects of glyphosate on soil fungal communities: A field study. *Rev Argent Microbiol*, 53(4), 349–358. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.10.005>.
16. Sumalan, R. M., Alexa, E., Negrea, M., Sumalan, R. L., Doncean, A., Pop, G. (2010). Effect of glyphosate on the microbial activity of two Romanian soils. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 75(2), 167–172.
17. Zvir, G. I., Moroz, O. M., Hnatysh, S. O. (2015). Dysymiliatsiina sulfatreduktsiia u bakterii *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6 za vplyvu herbitsydiv Urahan i Raundap [Dissimilatory sulfate reduction in bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6 upon influence of Urahan and Raundap herbicides]. *Visnyk Dnipropetrovskoho universytetu. Seriia : Biologiia. Medytsyna*. 6(1), 40–44. DOI: <https://doi.org/10.15421/021508> [in Ukrainian].
18. Gudzy, S. P., Hnatysh, S. O., Yavorska, G. V., Bilinska, I. S., Borsukevych, B. M. (2014). Praktykum z mikrobiologii' [Workshop on microbiology]. Lviv. Nac. Univ. imeni Ivana Franka. Ser. Biol. Stud., Lviv (in Ukrainian). 436 s.
19. Alomari, S. M., Hasan, R. S., Al-Najim, A. N., Saadi, A. M. (2024). Nitrogen-fixing Bacteria and their Applications in the Environment: A Review. *Int J Med & All Body Health Res*, 5(4), 178–187. DOI: <https://doi.org/10.54660/IJMBHR.2024.5.4.178-187>.
20. Zablotowicz, R. M., Reddy, K. N. (2024). Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. *J Environ Qual*, 33(3), 825–831. DOI: <https://doi.org/10.2134/jeq2004.0825>.

Дата першого надходження рукопису до видання: 21.08.2025

Дата прийнятого до друку рукопису після рецензування: 23.09.2025

Дата публікації: 31.10.2025