

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології**

**ОСОБЛИВОСТІ РОСТУ КУЛЬТУР *BACILLUS SPP.*
ЗА КОРОТКО- ТА ДОВГОТРИВАЛОЇ ДІЇ
N-(ФОСФОНОМЕТИЛ)ГЛІЦИНУ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 407 групи
Спеціальності

162«Біотехнології та біоінженерія»

Кузема Валерія Віталіївна

Керівник:

Кандидат біологічних наук, доцент

Васіна Л.М.

До захисту допущено

на засіданні кафедри біохімії та біотехнології

протокол № _____ від _____ 2025 р.

Зав. кафедрою _____ доцент Волощук О.М.

Чернівці – 2025

АНОТАЦІЯ

Досліджено коротко- та довготривалий вплив різних концентрацій N-(фосфометил)гліцину на розвиток *Bacillus subtilis* і *Bacillus megaterium*. Оцінювали динаміку нагромадження біомаси бактерій за показником оптичної густини та кількістю колонієутворювальних одиниць, можливість реалізації бактеріями стратегії *quorum sensing*, вміст екзополісахаридів, протеазну активність і рівень фосфатів.

Встановлено чітку дозозалежну дію гліфосату: низькі концентрації зумовлювали незначну стимуляцію росту й синтетичних активностей *Bacillus spp.*, високі – пригнічення розвитку вегетативних клітин, появу біоплівок та зниження ферментативних активностей.

Ключові слова: гліфосат, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, дозозалежність, ріст бактерій.

ABSTRACT

The short- and long-term effects of various concentrations of N-(phosphonomethyl)glycine on the development of Bacillus subtilis and Bacillus megaterium were studied. The dynamics of bacterial biomass accumulation were evaluated using optical density measurements and the number of colony-forming units. Additionally, the ability of the bacteria to implement quorum sensing strategies, the content of exopolysaccharides, protease activity, and phosphate levels were assessed.

A clear dose-dependent effect of glyphosate was established: low concentrations caused a slight stimulation of growth and synthetic activities in Bacillus spp., while high concentrations inhibited the development of vegetative cells, induced biofilm formation, and reduced enzymatic activity.

Keywords: *glyphosate, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, dose-dependent effect, bacterial growth.*

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів
мають посилання на відповідне джерело.

підпис автора

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. N-(фосфометил)гліцин(гліфосат): властивості, вплив і методи виявлення	7
1.1.1. Хімічна структура та фізико-хімічні властивості гліфосату.....	7
1.1.2. Вплив гліфосату на довкілля: стабільність, накопичення та розпад у природних середовищах	9
1.1.3. Шляхи метаболізму гліфосату та основні методи ідентифікації	11
1.2. Бактерії роду <i>Bacillus</i> як модельні організми для вивчення впливу хімічних агентів.....	14
1.2.1. Загальна характеристика роду <i>Bacillus</i> : систематика, морфологія та біологічна роль	14
1.2.2. Фізіолого-біохімічні особливості <i>Bacillus spp.</i>	16
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	19
2.1. Матеріали досліджень	19
2.2. Схема дослідження.....	19
2.3. Методи дослідження..	23
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	26
3.1. Вплив N-(фосфометил)гліцину на щільність популяцій <i>B. subtilis</i> та <i>B. megaterium</i> за умов коротко- та довготривалої дії	26
3.2. Вплив гербіцидного навантаження на засвоєння неорганічного фосфору <i>B.subtilis</i> та <i>B.megaterium</i>	33
3.3. Визначення вмісту екзополісахаридів та протеаз у <i>Bacillus subtilis</i> і <i>Bacillus megaterium</i> за тривалої дії N-(фосфометил)гліцину.....	35
ВИСНОВКИ	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	41
ДОДАТКИ	50

ВСТУП

N-(фосфометил)гліцин, відомий у науковій літературі та комерційно як гліфосат, є одним із найпоширеніших гербіцидів у світовому сільському господарстві. Цей органічний фосфоровмісний препарат широкого спектру дії був розроблений компанією Monsanto у 1970-х роках і отримав визнання як "гербіцид століття" завдяки своїй ефективності та економічній доцільності застосування [1]. Унікальність дії гліфосату зумовлена його здатністю інгібувати 5-енолпірувілшкімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS), що є ключовим ферментом у шкіматному шляху синтезу ароматичних амінокислот у рослин [2]. Завдяки такому механізму дії та низькій токсичності для ссавців гліфосат швидко посів провідне місце серед агрохімікатів у глобальному масштабі [3].

З розвитком генно-інженерних технологій та створенням гліфосат-резистентних сільськогосподарських культур, особливо сої, кукурудзи та бавовни, використання цього гербіциду суттєво зросло [4]. За даними багатьох дослідників, гліфосат залишається у ґрунті зі значним періодом напіврозпаду, що може тривати від декількох днів до кількох місяців залежно від ґрунтових та кліматичних умов [5, 6]. Унаслідок тривалого та інтенсивного застосування гліфосату в сільському господарстві постає проблема його накопичення в навколишньому середовищі, зокрема в ґрунтах, поверхневих та підземних водах [7].

Важливим аспектом екологічної безпеки використання гліфосату є його вплив на нецільові організми, особливо на корисну ґрунтову мікрофлору [8]. Хоча первинний механізм дії гліфосату спрямований на рослинні метаболічні шляхи, дослідження останніх років виявили його дію на мікробні угруповання та їхні функціональні характеристики [9, 10]. Зокрема, гліфосат та його основний метаболіт – амінометилфосфонова кислота (АМРА) – здатні модифікувати структуру мікробних ценозів ґрунту, що може мати довгострокові наслідки для ґрунтових екосистем [11].

Бактерії роду *Bacillus* є однією з найважливіших груп ґрунтових мікроорганізмів завдяки їхній участі в біогеохімічних циклах, сприянні росту

рослин та здатності до біодеградації органічних сполук. Представники цього роду широко розповсюджені в різноманітних екологічних нішах, включаючи ґрунт, воду, рослинну ризосферу та навіть шлунково-кишковий тракт тварин і людини [12]. Серед видів *Bacillus* особливу увагу варто звертати на *B. subtilis* та *B. megaterium*, які мають значний біотехнологічний потенціал для ремедіації забруднених середовищ [13].

Тому, метою нашої роботи була оцінка впливу N-(фосфометил)гліцину на життєдіяльність бактерій роду *Bacillus*, зокрема *Bacillus subtilis* та *Bacillus megaterium*. Відповідно до мети поставлені наступні завдання:

1. Оцінити коротко- та довготривалий вплив N-(фосфометил)гліцину на щільність культур *B. subtilis* та *B. megaterium*;
2. Визначити кількість КУО бактерій *B. subtilis* та *B. megaterium* після довготривалого впливу N-(фосфометил)гліцину;
3. Оцінити кількість спожитого фосфору N-(фосфометил)гліцину за непрямим показником вмісту неорганічних фосфатів у середовищі культивування *Bacillus spp.*;
4. Дослідити вміст екзополісахаридів у біоплівках *B. subtilis* та *B. megaterium* за дії різних концентрацій N-(фосфометил)гліцину;
5. Визначити протеолітичну активність *B. subtilis* та *B. megaterium* за умов дії N-(фосфометил)гліцину.

РОЗДІЛ 1 . ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. N-(фосфометил)гліцин (гліфосат): властивості, вплив і методи виявлення

1.1.1. Хімічна структура та фізико-хімічні властивості гліфосату

N-(фосфометил)гліцин, також відомий як гліфосат, належить до класу органічних фосфоровмісних сполук із хімічною формулою $C_3H_8NO_5P$ (рис 1.1.1).

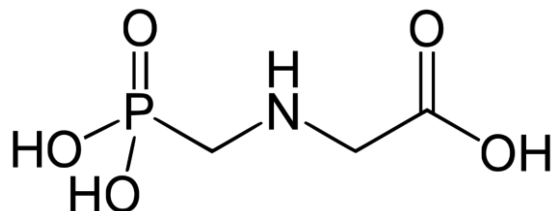


Рис.1.1.1 Хімічна формула N-(фосфометил)гліцину

Він є похідною амінокислоти гліцину, де до атома азоту приєднана фосфометильна група. У структурі молекули наявні три функціональні групи: карбоксильна, амінна та фосфонатна, що забезпечують його унікальні хімічні властивості та здатність утворювати комплексні сполуки з різними металами. Завдяки такій будові речовина проявляє амфотерні властивості й існує в різних іонних формах залежно від кислотності середовища [14].

За фізичними характеристиками гліфосат є безбарвною кристалічною речовиною з температурою плавлення 184-186°C та високою розчинністю у воді, яка досягає 12 г/л при 25°C. Водночас розчинність у органічних розчинниках значно нижча, що суттєво впливає на методи його екстракції та поведінку в ґрунтових екосистемах. Молекулярна маса сполуки становить 169,07 г/моль, а відносна щільність – приблизно 1,7 г/см³. Особливістю гліфосату в ґрунті є його висока адсорбційна здатність, що визначає біодоступність для мікроорганізмів та рослин [15].

Вагомою фізико-хімічною особливістю гліфосату виступає здатність формувати хелатні комплекси з різними катіонами металів, особливо з Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} та Al^{3+} . Це явище пояснюється наявністю фосфонатної групи з високою спорідненістю до катіонів металу. Утворення таких комплексів

суттєво впливає на рухливість гліфосату в ґрунтовому профілі та модифікує його біологічну активність. Дослідження демонструють формування стабільних комплексів гліфосату з металами II групи, що відіграє значну роль у екологічній поведінці сполуки. У водних розчинах гліфосат характеризується чотирма константами дисоціації: 0,8 для першої фосфонатної групи, 2,3 для карбоксильної групи, 6,0 для другої фосфонатної групи та 11,0 для аміної групи. Ці показники визначають ступінь іонізації молекули при різних значеннях рН, що безпосередньо впливає на адсорбцію ґрунтовими частинками та доступність для мікробної деградації. При нейтральних значеннях рН, типових для більшості ґрунтів, гліфосат переважно існує у формі цвіттеріону, що сприяє взаємодії з мінеральними компонентами ґрунту, особливо з оксидами та гідроксидами заліза й алюмінію [16].

У комерційних препаратах гліфосат зазвичай використовується у формі солей, найчастіше ізопропіламіної, амонійної або калійної, що підвищує його розчинність і ефективність як гербіциду. Комерційні формуляції також містять різноманітні поверхнево-активні речовини та ад'юванти, які сприяють проникненню діючої речовини через кутикулу листків рослин і посилюють гербіцидний ефект. Важливо зазначити, що токсикологічні властивості комерційних препаратів можуть суттєво відрізнятися від властивостей чистої діючої речовини саме через наявність цих допоміжних компонентів [17].

Дослідження останніх років виявили, що фізико-хімічні особливості гліфосату відіграють вирішальну роль у його взаємодії з мікроорганізмами. Іонний стан молекули впливає на її проникнення через клітинні мембрани бактерій та подальшу взаємодію з внутрішньоклітинними мішенями. Кислотно-основні властивості гліфосату також визначають його здатність впливати на рН цитоплазми бактеріальних клітин, що може призводити до порушення метаболічних процесів та змін у популяційній динаміці мікроорганізмів [18].

Всебічне розуміння фізико-хімічних характеристик гліфосату становить фундаментальну основу для дослідження механізмів його впливу на мікробні

угруповання та розробки ефективних аналітичних методів визначення цієї сполуки в об'єктах довкілля. Особливо важливим є вивчення взаємозв'язку між фізико-хімічними властивостями гліфосату та його біодоступністю для бактерій роду *Bacillus*, що може стати ключовим фактором у біоремедіації забруднених екосистем [19].

1.1.2. Вплив гліфосату на довкілля: стабільність, накопичення та розпад у природних середовищах

Хімічна стійкість гліфосату залежить від умов навколишнього середовища. У водних розчинах за відсутності мікробної активності ця сполука відносно стабільна, особливо при низьких значеннях рН. Однак у природних екосистемах гліфосат піддається біодеградації з утворенням амінометилфосфонові кислоти як головного метаболіту. Вона демонструє вищу стійкість порівняно з вихідною молекулою, що зумовлює її тривале перебування в довкіллі. Процес деградації гліфосату може також супроводжуватися формуванням інших метаболітів, включаючи саркозин та гліцин, однак їхня екологічна значущість менша через швидке включення у природні біохімічні цикли. Фізико-хімічні характеристики гліфосату визначають його екологічну поведінку, зокрема сорбцію ґрунтовими компонентами, рухливість у ґрунтовому профілі та схильність до міграції у підземні водоносні горизонти [20].

Міграція гліфосату у водні об'єкти може відбуватися шляхом поверхневого стоку, ерозії ґрунту та, меншою мірою, через вимивання у підземні води. Незважаючи на високу розчинність у воді, вертикальна міграція гліфосату у ґрунтовому профілі зазвичай обмежена через сильну адсорбцію. Крім того, присутність фосфатів може збільшувати мобільність гліфосату через конкуренцію за сорбційні центри [21].

Екологічний вплив гліфосату на водні екосистеми проявляється у потенційному негативному впливі на гідробіонти, включаючи водорості, безхребетних та риб. Встановлено, що токсичність комерційних формуляцій

гліфосату часто перевищує токсичність чистої діючої речовини через присутність поверхнево-активних речовин та інших допоміжних компонентів [22].

Важливим аспектом екологічної поведінки гліфосату є його дія на мікробні угруповання ґрунту та водних екосистем. Дослідження показують, що тривале застосування гліфосату може призводити до змін у структурі та функціональній активності мікробних ценозів. Ці зміни можуть включати як пригнічення певних груп мікроорганізмів, так і стимуляцію розвитку видів, здатних до деградації гліфосату. Особливу увагу привертає вплив гліфосату на азотфіксуючі та фосфатмобілізуючі бактерії, які відіграють ключову роль у ґрунтовій родючості [23].

Важливим напрямком досліджень є вивчення ролі бактерій роду *Bacillus* у деградації гліфосату в природних середовищах. Зокрема *B.subtilis*, демонструє значний потенціал щодо біоремедіації забруднених гліфосатом ґрунтів та водних об'єктів, оскільки прокаріот можливо здатен не лише розкласти гліфосат, але й використовувати його як джерело поживних речовин, що відкриває перспективи для розробки біотехнологічних методів очищення навколишнього середовища від залишків гербіциду [24].

Питання токсикологічної безпеки гліфосату викликає значні дискусії в науковій спільноті та суспільстві. Тривалий час полютант вважався відносно безпечним гербіцидом для людини та тварин завдяки специфічному механізму дії, спрямованому на біохімічний шлях, відсутній у ссавців. Однак накопичення даних щодо потенційних ризиків призвело до переоцінки його токсикологічного профілю [25].

Гостра токсичність гліфосату для ссавців відносно низька. Значення LD₅₀ при пероральному надходженні для щурів становить понад 5000 мг/кг маси тіла, що дозволяє класифікувати його як малотоксичну сполуку. Отруєння даною сполукою у людей здебільшого пов'язане з навмисним вживанням концентрованих препаратів і характеризується проявами подразнення

шлунково-кишкового тракту, гіпотензією, порушенням кислотно-лужного балансу та, в тяжких випадках, нирковою недостатністю [26].

Більш складним є питання хронічної дії гліфосату. Дослідження на тваринах показують, що тривалий вплив цього гербіциду в низьких дозах може впливати на репродуктивну функцію, розвиток ембріонів і функціонування ендокринної системи. Зокрема, виявлено потенційну здатність гліфосату порушувати гормональний баланс через взаємодію з естрогеновими рецепторами. Також отримано дані про вплив на метаболізм в печінці та функцію нирок при хронічній експозиції [27,28].

1.1.3. Шляхи метаболізму гліфосату та основні методи ідентифікації

Гліфосат став одним із найуспішніших гербіцидів у історії сільського господарства завдяки унікальному механізму дії, який принципово відрізняється від багатьох інших засобів захисту рослин. Основою його гербіцидної активності є здатність інгібувати ключовий фермент шикіматного шляху – 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS), який відповідає за синтез ароматичних амінокислот: фенілаланіну, тирозину та триптофану. Шикіматний шлях – це метаболічний каскад реакцій, який присутній у рослинах, грибах та більшості бактерій, але відсутній у тваринних організмах. Ця біохімічна особливість забезпечує селективність дії гліфосату, оскільки ссавці, включаючи людину, отримують необхідні ароматичні амінокислоти з їжі та не мають ферментних систем для їх синтезу. [29]

Мікробна трансформація гліфосату відбувається двома основними шляхами: через розщеплення C-N зв'язку з утворенням АМРА або через розщеплення C-P зв'язку з утворенням саркозину. Перший шлях є домінуючим у більшості ґрунтів. Здатність до деградації гліфосату виявлена у багатьох таксономічних груп мікроорганізмів, включаючи бактерії родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium* та грибів. [30].

Молекулярний механізм дії N-(фосфонометил)гліцину полягає в тому, що він структурно подібний до фосфоенолпірувату – одного з субстратів

ферменту EPSPS. Гліфосат конкурентно зв'язується з активним центром ферменту, утворюючи потрійний комплекс із EPSPS та шикілат-3-фосфатом, що блокує нормальне функціонування ферменту. Це призводить до припинення синтезу ароматичних амінокислот, які є не лише будівельними блоками для білків, але й попередниками багатьох вторинних метаболітів, необхідних для нормального розвитку рослин. Порушення синтезу ароматичних амінокислот викликає каскад метаболічних змін у рослинному організмі. Дефіцит фенілаланіну та тирозину призводить до пригнічення синтезу фенілпропаноїдів – сполук, що беруть участь у формуванні клітинних стінок, захисті від патогенів та ультрафіолетового випромінювання. Крім того, виснаження запасів триптофану негативно впливає на синтез ауксинів – фітогормонів, які регулюють процеси росту та розвитку рослин [31].

Особливістю дії гліфосату є системний характер його транспорту в рослині. Після потрапляння на поверхню листя, активна речовина проникає через кутикулу і транспортується флоемою до всіх органів, включаючи кореневу систему та меристематичні тканини. Цей системний характер дії забезпечує ефективне знищення навіть багаторічних бур'янів з розвиненою підземною частиною, оскільки сполука накопичується в точках росту та кореневищах, блокуючи процеси поділу клітин [32].

В організмі тварин і людини метаболізм гліфосату відбувається обмежено. Більша частина поглинутого N-(фосфометил)гліцину виводиться в незміненому вигляді через нирки. Однак невелика частина може піддаватися метаболічним перетворенням з утворенням АМРА. Важливо зазначити, що шикілатний шлях, на який спрямована дія гліфосату в рослинах, присутній також у багатьох кишкових бактерій, що може призводити до порушення складу мікробіому при надходженні гліфосату в організм [33].

Біологічна роль метаболітів гліфосату в екосистемах вивчена недостатньо. Основний метаболіт АМРА, аналогічно вихідній сполуці, може проявляти фітотоксичні властивості, хоча й менш виражені. Дослідження демонструють, що накопичення даної сполуки в ґрунті може негативно

впливати на ріст і розвиток чутливих рослин. Крім того, речовина здатна модифікувати структуру мікробних угруповань ґрунту, що може мати довгострокові наслідки для функціонування екосистем [34].

Хроматографічні методи є основою аналізу гліфосату та його метаболітів. Високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) у поєднанні з різними детекторами широко використовується для визначення цих сполук у воді, ґрунті та біологічних зразках. Через відсутність хромофорних груп у молекулах N-(фосфометил)гліцину та АМРА їх пряме виявлення за допомогою УФ-детектування ускладнене, що зумовлює необхідність дериватизації або застосування специфічних детекторів [35].

Одним із найбільш чутливих і селективних методів аналізу гліфосату є рідинна хроматографія-тандемна мас-спектрометрія (LC-MS/MS). Цей підхід дозволяє досягти високої специфічності та низьких меж виявлення навіть без дериватизації. Метод базується на іонізації аналітів за допомогою електророзпилення та подальшому аналізі продуктів фрагментації в тандемному мас-спектрометрі. LC-MS/MS дозволяє визначати гліфосат та АМРА в концентраціях на рівні частин на мільярд у різних матрицях [36].

Для підвищення чутливості аналізу часто використовують методи передколоночної або післяколоночної дериватизації. Найбільш поширеними реагентами для дериватизації гліфосату є 9-флуоренілметилхлороформат (FMOC), о-фталевий альдегід (OPA) та п-толуолсульфонілхлорид. Дериватизація дозволяє вводити хромофорні або флуорофорні групи в молекули аналітів, що значно підвищує чутливість їх виявлення за допомогою флуоресцентного або УФ-детектування. Важливим етапом аналізу гліфосату та АМРА є пробопідготовка, яка включає екстракцію аналітів із зразка та очищення екстракту. Для водних зразків часто застосовують твердофазну екстракцію на аніонообмінних сорбентах, що дозволяє концентрувати аналіти та видаляти інтерферуючі компоненти матриці. Екстракція гліфосату з ґрунту більш складна і зазвичай включає використання водних розчинів із високим рН або розчинів солей для десорбції аналітів з ґрунтових частинок [37]. Для

аналізу N-(фосфонометил)гліцину та АМРА в морській воді розроблено спеціальні методики, що враховують високий вміст солей та інших інтерферуючих компонентів. Ці підходи часто передбачають специфічні етапи очищення екстрактів та використання ізотопно-мічених внутрішніх стандартів для компенсації матричних ефектів [37].

1.2. Бактерії роду *Bacillus* як модельні організми для вивчення впливу хімічних агентів

1.2.1. Загальна характеристика роду *Bacillus*: систематика, морфологія та біологічна роль

Рід *Bacillus* належить до родини *Bacillaceae*, порядку *Bacillales*, класу *Bacilli*, типу *Firmicutes*. Це велика і гетерогенна група грампозитивних, аеробних або факультативно анаеробних, паличкоподібних бактерій, що характеризуються здатністю до утворення ендоспор. Таксономія роду *Bacillus* зазнала значних змін упродовж останніх десятиліть завдяки розвитку молекулярно-генетичних методів. Наразі цей рід включає понад 200 видів, хоча значна частина з них була реорганізована в окремі роди, такі як *Geobacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* та інші [38].

Морфологічно представники роду *Bacillus* являють собою прямі палички розміром $0,5-2,5 \times 1,2-10$ мкм, які можуть розташовуватися поодинокі, парами або формувати короткі ланцюжки. Клітини оточені типовою для грампозитивних бактерій клітинною стінкою, що містить товстий шар пептидоглікану. Більшість видів рухливі завдяки перитрихіальному розташуванню джгутиків, хоча зустрічаються й нерухомі форми. Ключовою фенотиповою ознакою, що відрізняє цей рід від інших, є здатність до формування ендоспор – високостійких морфолого-диференційованих форм, які утворюються внутрішньоклітинно в процесі спорогенезу [39].

Представники роду *Bacillus* характеризуються надзвичайно широким метаболічним потенціалом, що дозволяє їм адаптуватися до різноманітних екологічних ніш. Більшість видів є хемоорганогетеротрофами, здатними

використовувати різноманітні джерела вуглецю, включаючи вуглеводи, амінокислоти, органічні кислоти та, в деяких випадках, складні органічні сполуки, такі як пестициди. Багато представників роду продукують різноманітні екзоферменти, включаючи амілази, протеази, целюлази та ліпази, що забезпечує їм важливу роль у деградації органічної речовини в природних екосистемах [40].

Біологічна роль бактерій роду *Bacillus* надзвичайно різноманітна і визначається їх поширенням у різних нішах. Ґрунт є основним природним резервуаром цих мікроорганізмів, де вони входять до складу зональних мікробних угруповань усіх типів ґрунтів – від арктичних до тропічних. У ґрунтовому середовищі бацили беруть активну участь у мінералізації органічних сполук, трансформації елементів мінерального живлення, формуванні гумусу та підтриманні структури ґрунту. Особливо важливою є їхня роль у кругообігу азоту (деякі види здатні до фіксації атмосферного азоту) та фосфору (солубілізація важкодоступних фосфатів) [41].

Крім ґрунту, бактерії роду *Bacillus* широко розповсюджені у водних екосистемах, від прісних водойм до морських середовищ, де вони також беруть участь у деградації органічних сполук та біогеохімічних циклах. Багато видів асоційовані з рослинами, формуючи ризосферні та ендofітні угруповання, та сприяють росту рослин через різні механізми: продукцію фітогормонів, покращення доступності поживних елементів, індукцію системної стійкості до патогенів та стресових факторів [42].

Здатність до спороутворення надає бактеріям роду *Bacillus* унікальної екологічної переваги, дозволяючи їм виживати в несприятливих умовах протягом тривалого часу. Спори характеризуються надзвичайною стійкістю до високих температур, висушування, радіації, ультрафіолетового випромінювання та хімічних агентів, включаючи антибіотики та дезінфектанти. Ця особливість забезпечує повсюдне поширення бацил у природі та їхню здатність швидко колонізувати нові середовища при настанні сприятливих умов [43].

1.2.2. Фізіолого-біохімічні особливості *Bacillus spp.*

Фізіолого-біохімічні особливості бактерій роду *Bacillus* визначаються їх генетичним потенціалом та адаптацією до різноманітних екологічних ніш. Більшість видів характеризуються швидким ростом на простих поживних середовищах за температури 28-37°C та нейтральних значеннях рН. Оптимальні умови росту варіюють залежно від виду: психрофільні види можуть рости при температурах близько 0°C, тоді як термофільні – при 65°C і вище. Широкий діапазон рН (від 5,5 до 8,5) та толерантність до різних концентрацій солей (деякі види здатні рости в присутності до 10% NaCl) також сприяють екологічній пластичності цих бактерій [44].

У лабораторних умовах представники роду *Bacillus* утворюють колонії різноманітної морфології – від гладких і блискучих до шорстких і матових, часто з неправильними краями та радіальною структурою. Колір колоній варіює від білого до кремового або коричневого. Багато видів продукують позаклітинні полісахариди, що надає колоніям слизистої консистенції. При культивуванні у рідких середовищах бацили можуть рости у вигляді гомогенної суспензії, формувати поверхневу плівку або утворювати осад, залежно від виду та умов культивування [44].

Метаболізм бактерій роду *Bacillus* надзвичайно різноманітний. Центральний вуглецевий метаболізм включає гліколіз, пентозофосфатний шлях та цикл трикарбонових кислот. Більшість видів здатні до аеробного дихання з використанням кисню як кінцевого акцептора електронів, хоча деякі можуть здійснювати і анаеробне дихання з використанням нітратів або інших акцепторів. Факультативно анаеробні види здатні також до ферментації з утворенням молочної кислоти, етанолу, ацетоїну або бутандіолу [45].

Важливою особливістю метаболізму багатьох представників роду *Bacillus* є здатність до продукції широкого спектру вторинних метаболітів, включаючи антибіотики, бактеріоцини, сидерофори та поверхнево-активні речовини. Ці сполуки відіграють важливу роль у міжклітинних взаємодіях, конкуренції за ресурси та адаптації до різних екологічних ніш. Зокрема, *B.*

subtilis продукує понад 24 антибіотики, що належать до різних структурних класів [46].

Ключовим аспектом фізіології бактерій роду *Bacillus* є формування біоплівки – структурованих мікробних угруповань, прикріплених до поверхні або міжфазних границь і оточених матриксом із екзополісахаридів. Формування біоплівки регулюється механізмами міжклітинної комунікації, відомими як "quorum sensing", та залежить від щільності популяції та екологічних умов. Біоплівки забезпечують підвищену стійкість бактерій до стресових факторів, включаючи антибіотики та дезінфектанти, і можуть відігравати важливу роль у деградації ксенобіотиків у навколишньому середовищі [47].

Кворум-сенсинг (QS) – це механізм міжклітинної комунікації бактерій, який дозволяє їм координувати генну експресію та групову поведінку залежно від щільності популяції. Цей процес базується на продукції, вивільненні та детекції сигнальних молекул, концентрація яких зростає пропорційно щільності клітин у середовищі. Коли концентрація сигнальних молекул досягає порогового рівня (кворуму), відбувається активація чи репресія певних генів, що призводить до колективної зміни поведінки мікробної популяції [47]. У грампозитивних бактерій кворум-сенсинг опосередковується переважно олігопептидними автоіндукторами, які синтезуються всередині клітини, модифікуються та транспортуються у позаклітинне середовище. Ці пептиди взаємодіють із мембранними рецепторними кіназами, які, у свою чергу, активують внутрішньоклітинні регуляторні білки через фосфорилування. Активовані регуляторні білки контролюють експресію цільових генів, впливаючи на різноманітні фізіологічні процеси [48].

У *Bacillus subtilis* ідентифіковано кілька систем кворум-сенсингу, включаючи ComQXPA, що регулює розвиток компетентності та здатність до поглинання екзогенної ДНК; систему Rap-Phr, що контролює спороутворення; та систему AgrBDSA, залучену до регуляції формування біоплівки. Ці системи функціонують не ізольовано, а формують складну регуляторну мережу, що

забезпечує інтеграцію різних сигналів та адаптивну відповідь на зміни умов середовища [47].

Припускають, що *Bacillus megaterium* також володіє системами кворум-сенсингу, хоча вони менш детально вивчені порівняно з *B. subtilis*. Показано, що ці системи залучені до регуляції продукції ферментів, антибіотиків, формування біоплівки та спороутворення. Крім того, *B. megaterium*, як і інші представники роду, здатний до міжвидової комунікації, розпізнаючи сигнальні молекули, продуковані іншими бактеріями, що має важливе значення в природних мікробних угрупованнях [49].

Дослідження показують, що кворум-сенсинг регулює експресію генів, відповідальних за синтез компонентів матриксу біоплівки, особливо екзополісахаридів та структурних білків. У *B. subtilis* ключову роль у формуванні біоплівки відіграє оперон *eps*, що кодує ферменти синтезу екзополісахаридів, та оперон *tapA-sipW-tasA*, що кодує білки матриксу. Експресія цих оперонів регулюється білком *Spo0A*, активність якого, у свою чергу, контролюється системами кворум-сенсингу [47].

Важливим аспектом міжклітинної взаємодії у бактерій роду *Bacillus* є продукція метаболітів із антимікробною активністю, включаючи антибіотики, бактеріоцини та ліпопептиди. Ці сполуки надають продуцентам селективної переваги у конкуренції за ресурси та колонізації екологічних ніш [47].

Вивчення впливу гліфосату на міжклітинну взаємодію та формування біоплівки у бактерій роду *Bacillus spp.* має важливе значення для розуміння екологічних наслідків застосування цього гербіциду та розробки стратегій біоремедіації забруднених середовищ.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали досліджень

Матеріалами досліджень слугували чисті культури *Bacillus*, зокрема *Bacillus subtilis* та *Bacillus megaterium* з колекції музейних культур кафедри біохімії та біотехнології Чернівецького національного університету імені Ю. Федьковича, які були люб'язно надані Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного.

2.2. Схема дослідження

Приготування поживних середовищ

Для культивування *Bacillus subtilis* та *Bacillus megaterium* використовували живильні середовища, розроблені з урахуванням потреб грампозитивних спороутворюючих бактерій. Основу складали білкові гідролізати тваринного походження, м'ясний та дріжджовий екстракти, а також мікроелементи, необхідні для стабільного росту та спороутворення.

Для приготування щільного середовища використовували агар-агар як ущільнювач, а сухі поживні суміші розчиняли у дистильованій воді з розрахунку 20 г на 1 літр, доводили до кипіння з подальшим стерилізаційним циклом в автоклаві (30 хв при 120 °C).

Рідке середовище готували аналогічним чином, але без додавання агар-агару: у 250 мл дистильованої води розчиняли 8,75 г сухого поживного середовища. Стерилізацію проводили автоклавуванням при 120 °C впродовж 30 хвилин. Особливу увагу приділяли уникненню перегріву в процесі стерилізації, оскільки це могло негативно вплинути на стабільність компонентів середовища.

*Отримання посівного матеріалу культур *B.subtilis* та *B.megaterium**

Отримання інокуляту здійснювали наступним чином: у стерильну пробірку вносили 5 мл м'ясо-пептонного бульйону й одну мікробіологічну петлю музейної культури *Bacillus subtilis* та *Bacillus megaterium*.

Культивування тривало впродовж 24 год у термостаті за температури 37 °С, яка є оптимальною для фізіологічної активності обраних мікроорганізмів.

Визначення впливу N-(фосфонометил)гліцину на щільність популяцій V.subtilis та V.megaterium за короткотривалої дії

Для оцінки короткотривалого впливу гліфосату на досліджувані види мікроорганізмів приготували робочий водний розчин комерційного гербіцидного препарату на основі N-(фосфонометил)гліцину у концентрації 500 мг/л.

Культивування здійснювали у пробірках з робочим об'ємом середовища 5 мл. Вміст інокуляту складав 10 %. Кількість клітин стандартизували до $1,5 \cdot 10^8$. Для моделювання умов короткотривалого хімічного стресу, спричиненого гербіцидним навантаженням, вносили такі концентрації гербіциду: 2,5 мг/л, 25 мг/л, 50 мг/л, 75 мг/л, 125 мг/л. До контрольної групи гліфосат не додавали.

Зразки інкубувалися за температури 37 °С, впродовж 48 годин. Після завершення 48-годинної інкубації проводили оцінку приросту мікроорганізмів шляхом вимірювання оптичної густини культур на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм.

Визначення впливу N-(фосфонометил)гліцину на щільність популяцій V.subtilis та V.megaterium за довготривалої експозиції

Для моделювання довготривалого гербіцидного навантаження в середовищі було обрано концентрації гліфосату 25 мг/л, 75 мг/л та 125 мг/л, які відображають як фонові так і потенційно токсичні дози, що перевищують гранично допустимі межі.

Культивування досліджуваних прокариот проводили в рідкому поживному середовищі. Основну ферментацію здійснювали в умовах періодичного культивування у стерильних колбах Ерленмеєра об'ємом 250 мл. У 50 мл м'ясо-пептонного бульйону відповідно містилися досліджувані

концентрації гліфосату (25 мг/л, 75 мг/л та 125 мг/л), а також 10% інокуляту *B.subtilis* та *B.megaterium*, стандартизованого за кількістю клітин. Контрольний зразок не містив гербіциду.

Культивування проводили у стаціонарних умовах за температури 37 °С впродовж 14 діб. Дослід виконувався в умовах закритої системи, без додаткового внесення поживних речовин чи заміни середовища, що безпосередньо відповідає класичній моделі періодичного культивування. Проби відбиралися виключно з метою аналітичного контролю оцінки оптичної щільності культуральної рідини на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм.

Отримання біоплівки *B.subtilis* та *B.megaterium*

Біоплівки формувалися за умов пролонгованого періодичного культивування відповідних культур 14 діб.

На завершення інкубаційного періоду (14-та доба) сформовану плівку обережно відбирали стерильними шпателями Дригальського та переносили до центрифужних пробірок, що містили по 1 мл фізіологічного розчину (0,9% NaCl). Для збереження фізіологічної активності клітин та запобігання деградації біомаси зразки утримували на льоду до моменту подальшої обробки.

Дезінтеграцію біоплівкової структури здійснювали за допомогою УЗДН при силі струму 7200 μ A протягом 360 с. Обраний режим забезпечував ефективне руйнування біоплівкової матриці до окремих клітинних елементів без істотного зниження життєздатності бактерій.

Отриману суспензію центрифугували з метою відокремлення бактеріальної біомаси від рідкої фази. Центрифугування проводили при швидкості 4000 обертів за хвилину протягом 10 хвилин. У результаті формувалася щільний клітинний осад, який відділяли від супернатанту.

Оцінювання кількості життєздатних мікроорганізмів проводили окремо для трьох фракцій бактеріальної популяції: планктонних форм, вегетативних клітин у складі біоплівки та спорогенних (терморезистентних) форм, асоційованих з біоплівкою.

Оцінка кількості планктонних КУО

Біоматеріал для дослідження відбирали з культуральних колб Ерленмеєра, в яких протягом 14 діб здійснювали періодичне культивування мікроорганізмів у рідкому середовищі із додаванням гліфосату в концентраціях 25 мг/л, 75 мг/л, 125 мг/л. Після завершення періоду інкубування з кожної колби стерильною піпеткою відбирали 100 мкл суспензії, яку висівали на чашки Петрі з твердим агаризованим середовищем методом суцільного газону.

Інкубація тривала 24 години при температурі 37 °С. На наступну добу експерименту проводили підрахунок кількості колонієутворювальних одиниць, що дозволило оцінити життєздатність мікроорганізмів після впливу гербіциду.

Оцінка кількості вегетативних та термостабільних КУО у складі біоплівки

Після дезінтеграції біоплівки та осадження мікроорганізмів 100 мкл отриманої суспензії одразу висівали на тверде поживне середовище для визначення загальної кількості вегетативних форм, асоційованих із біоплівкою.

Іншу частину бактеріальної суспензії піддавали термічній обробці у водяній бані при температурі 80 °С протягом 30 хвилин з метою виявлення спорогенних (термостабільних) форм. Отриманий зразок також висівали на м'ясо-пептонний агар методом суцільного газону. Зразки інкубували протягом 24 годин за температури 37 °С.

2.3. Методи дослідження

Визначення концентрації неорганічних фосфатів здійснювали фотометричним методом з відновленням аскорбіновою кислотою. Вимірювання при довжині хвилі 690 нм.

Реакційну суміш готували шляхом додавання 5 мл попередньо приготовленого змішаного реактиву до 2 мл культуральної рідини, розведеної дистильованою водою до 50 мл. Змішаний реактив містив 2,27 мл розчину нітратної кислоти, 0,91 мл амоній молібдату, 0,91 мл аскорбінової кислоти та 0,45 мл калій антимонілтартрату. Контрольну суміш готували ідентично, замінюючи культуральну рідину дистильованою водою. Через 15 хвилин після додавання реактиву вимірювали оптичну густину, а концентрацію фосфатів визначали за калібрувальним графіком, побудованим на основі стандартних розчинів фосфату калію.

Масову концентрацію іонів фосфатної кислоти (PO_4^{3-}) у мг/л визначали за формулою:

$$x = (c \cdot 50) / v$$

де: x — вміст фосфатів у мг/дм³;

c — концентрація фосфатів, визначена за калібрувальною кривою, мг/дм³;

v — об'єм проби, взятий для аналізу (у даному випадку $v = 2$ мл) [50].

Розрахунок вмісту фосфору в іонах фосфатної кислоти проводили за такою формулою:

$$P_{\text{мг/л}} = [PO_4^{3-}]_{\text{мг/л}} \times \left(\frac{M_P}{M_{PO_4}} \right)$$

де: $P_{\text{мг/л}}$ — шуканий вміст фосфору;

$[PO_4^{3-}]$ — масова концентрація фосфат-іону;

M_P — атомна маса фосфору;

M_{PO_4} — молекулярна маса PO_4^{3-} ;

Для розрахунку вмісту фосфору у N-(фосфонометил)гліцину використовували формулу:

$$P_{\text{мг/л}} = C_{\text{гліфосат}} \times \left(\frac{M_P}{M_{\text{гліфосат}}} \right)$$

де: $P_{\text{мг/л}}$ – шуканий вміст фосфору;

$C_{\text{гліфосат}}$ – масова концентрація гліфосату в середовищі;

M_P – атомна маса фосфору;

$M_{\text{гліфосат}}$ – молекулярна маса гліфосату;

Кількість фосфору, засвоєного досліджуваними мікроорганізмами, визначали шляхом обчислення різниці між загальним вмістом фосфору в середовищі, що містило гліфосат, та концентрацією фосфат-іонів (PO_4^{3-}), яка залишалася після культивування. Такий підхід дозволяв оцінити частку фосфору, спожитого мікроорганізмами саме з гліфосату.

Кількісне визначення екзополісахаридів екзополісахаридів (ЕПС), що входять до матриксу біоплівки досліджуваних мікроорганізмів проводили за допомогою фенольно-сірчаного методу згідно з протоколом Dubois et al. [51].

До 0,5 мл супернатанту (отриманий у результаті центрифугування суспензії, що утворилася після дезінтеграції біоплівки) додавали 0,5 мл 5% водного розчину фенолу. Потім вносили 2,5 мл концентрованої сірчаної кислоти, та постійно перемішували. Зразки інкубували при кімнатній температурі у темному місці протягом 30 хвилин. Після інкубації абсорбцію вимірювали при 490 нм на спектрофотометрі.

Для побудови калібрувальної кривої використовували стандартні розчини глюкози у концентраціях 0, 20, 40, 60, 80 та 100 мкг у 0,5 мл. Кожен зразок обробляли за ідентичним протоколом, як і аналітичні проби (0,5 мл стандарту + 0,5 мл фенолу + 2,5 мл H_2SO_4).

Абсорбцію стандартів також вимірювали при 490 нм. За отриманими даними будували калібрувальну криву, яку використовували для розрахунку концентрації екзополісахаридів у зразках. Результати виражали у мкг/мл еквіваленту глюкози.

Визначення протеолітичної активності здійснювали за модифікованим методом Ансона з використанням казеїну як субстрату при рН

7,4. Метод ґрунтується на гідролізі білка під дією позаклітинних протеаз з утворенням пептидів і вільних амінокислот, зокрема тирозину, кількість якого визначали колориметрично за реакцією з реактивом Фоліна–Чокальтеу [52].

У реакційну суміш (0,125 мл 2% казеїну та 0,25 мл бактеріальної суспензії) після 30-хвилинної інкубації при 3 °С додавали 0,5 мл 5% ТХК для зупинки реакції. Контрольні проби готували з одночасним додаванням усіх реагентів без інкубації. У холостих замість суспензії використовували буфер. Після центрифугування (3000 об/хв, 15 хв) до 0,5 мл надосадової рідини додавали 2,5 мл 0,5 М Na₂CO₃ і 0,5 мл реактиву Фоліна (1:1 з водою), залишали на 30 хв у темному місці, після чого вимірювали абсорбцію при 640 нм.

Активність обчислювали за різницею між дослідною та контрольною пробами, використовуючи формулу:

$$A = \frac{D_{\text{досл.}} - D_{\text{контр.}}}{0,25 \times 30 \times 0,25}$$

де: A – протеолітична активність (од/мл);

D – оптична щільність при 640 нм;

0,25 – об'єм суспензії (мл);

30 – час інкубації (хв);

0,25 – еквівалент 1 мкмоль тирозину.

Статистичний аналіз даних отриманих в ході досліджень здійснювали за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив N-(фосфонометил)гліцину на щільність популяцій *B. subtilis* та *B. megaterium* за умов коротко- та довготривалої дії

На початковому етапі дослідження оцінювали вплив гліфосату на щільність популяцій *Bacillus subtilis* та *Bacillus megaterium* після 48 годин культивування. У контрольних зразках обидві культури накопичували біомасу на еквівалентному рівні, що підтверджується незначними коливаннями оптичної густини, виміряної фотоелектроколориметричним методом (рис 3.1.1).

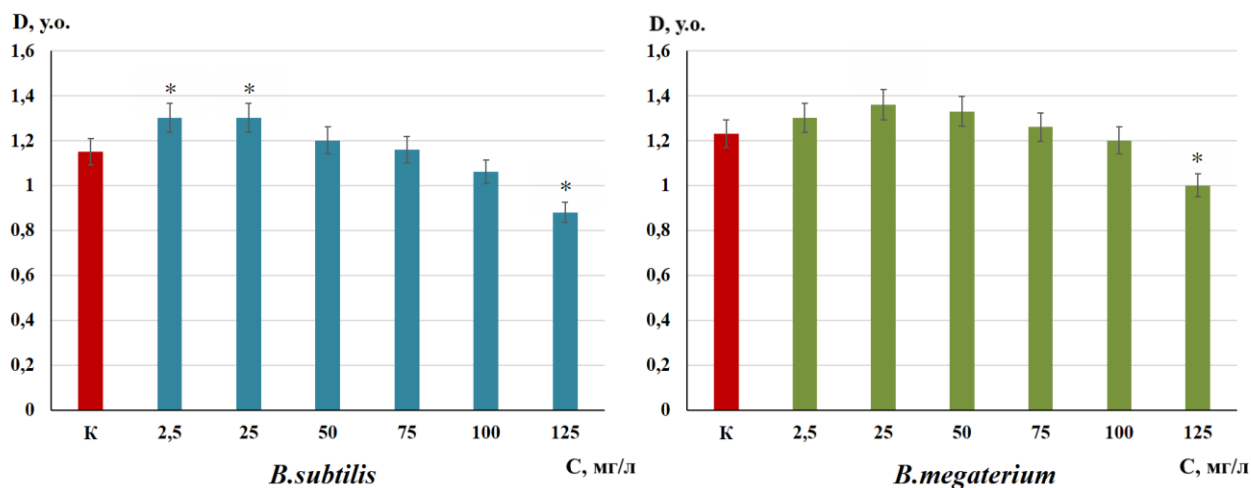


Рис. 3.1.1. Вплив N-(фосфонометил)гліцину на щільність культур *B. subtilis* та *B. megaterium* через 48 год культивування

Примітка:

* - достовірна різниця в порівнянні з контрольними значеннями

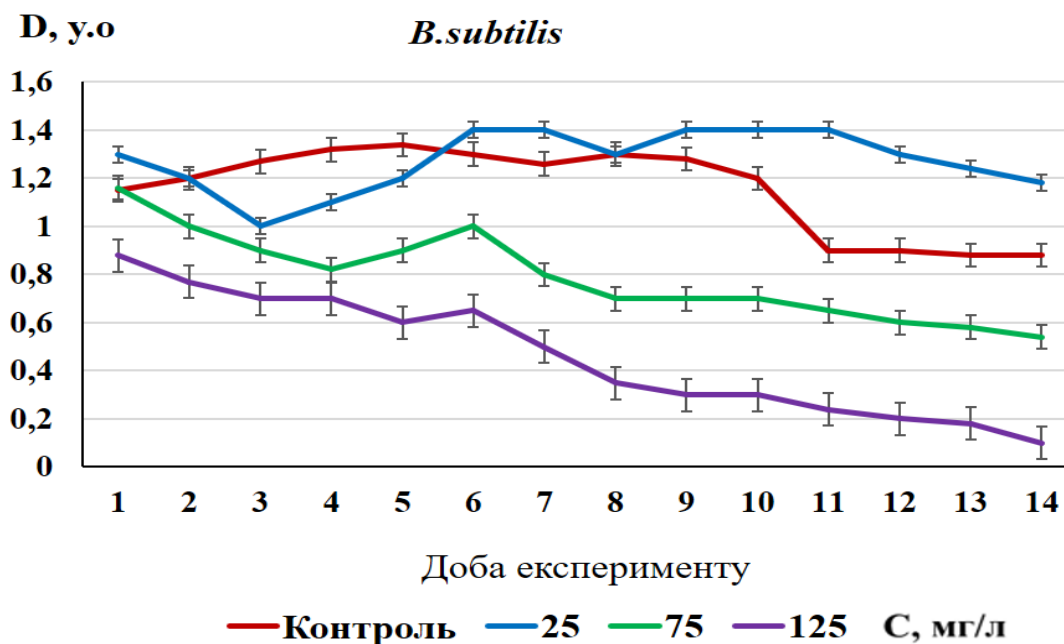
За дії низьких концентрацій сполуки спостерігалось несуттєве підвищення щільності бактеріальних суспензій, що може свідчити про прояв гормезису – біфазної відповіді мікроорганізмів, коли слабкий стрес стимулює ріст. Як зазначено у *Advances in Weed Science* (2023), сублетальні дози гліфосату можуть активувати сигнальні каскади, відповідальні за адаптивні

реакції, що потенційно можуть бути властиві й бактеріям роду *Bacillus* spp. [53].

Натомість за найвищої концентрації гербіциду відзначено суттєве пригнічення росту обох культур. Це можна пояснити інгібуванням ферменту EPSPS, що блокує біосинтез ароматичних амінокислот (триптофану, фенілаланіну, тирозину), необхідних для білкового синтезу, побудови клітинної стінки та регуляції метаболізму. Як наслідок – зменшення біомаси та енергетичне виснаження клітини.

При цьому *B. subtilis* виявився більш чутливим до N-(фосфометил)гліцину порівняно з *B. megaterium*, що ймовірно пов'язано з меншими адаптаційними можливостями. *B. megaterium* має більший геном, ширший набір генів стресостійкості, а також здатність до накопичення поліфосфатів і осмопротекторів, які можуть знижувати проникність мембран або забезпечувати альтернативні метаболічні шляхи [54].

На наступному етапі ми досліджували довготривалий вплив гліфосату на розвиток *Bacillus* spp. (рис 3.1.2.).



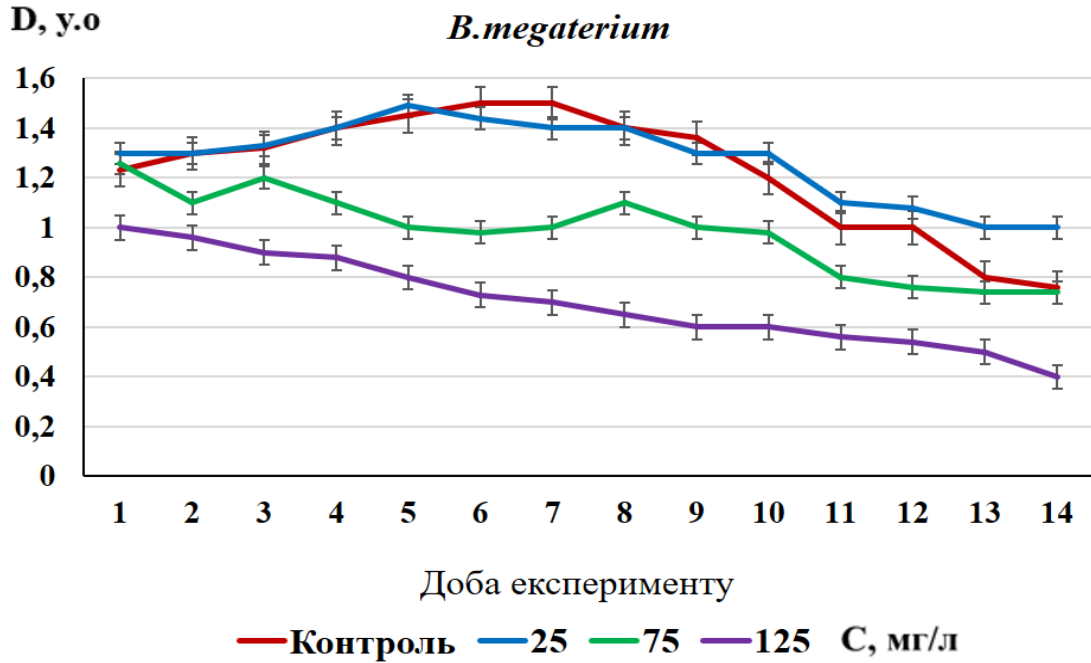


Рис. 3.1.2. Динаміка щільності культур *B. subtilis* та *B. megaterium* за умов довготривалого впливу N-(фосфометил)гліцину

Отримані результати підтвердили тенденції, зафіксовані під час короткочасного експерименту, зокрема вищу чутливість *B. subtilis* до дії гербіциду та однонаправлений інгібуючий вплив при високих концентраціях.

Уже з 2-ї доби культивування в середовищах, що містили 75 та 125 мг/л гліфосату, спостерігалось суттєве зниження оптичної щільності, що свідчить про поступове пригнічення клітинної активності. При цьому *B. subtilis* втрачає життєздатність швидше, ніж *B. megaterium*, що підтверджує його нижчу толерантність до гербіциду за умов тривалої експозиції. Припускаємо, що уповільнення росту могло бути зумовлене накопиченням внутрішньоклітинних ушкоджень, дисбалансом в обміні речовин або порушенням регуляторних механізмів, які підтримують стабільність клітинного середовища.

Водночас при концентрації 25 мг/л істотного зниження біомаси не спостерігалось – щільність бактеріальних суспензій залишалася на рівні

контрольних значень упродовж усього досліджу. Це може свідчити про ефективну компенсацію впливу низькодозового навантаження, яка не потребує залучення глибоких метаболічних перебудов. У такому випадку стійкість може реалізовуватись через тонкі налаштування клітинного метаболізму або тимчасову активацію захисних механізмів.

Цікавим спостереженням цього етапу стало поступове формування біоплівки обох культур. Починаючи з 6–8 доби, на поверхні культурального середовища з'являлися плівчасті структури, особливо виражені у зразках із середньою та високою концентрацією гліфосату. На 10–11 добу експерименту було зафіксовано утворення цілісної біоплівки, що свідчить про перехід бактеріальних популяцій до біоплівкової форми існування як адаптивної реакції на тривалий стрес. Така форма, ймовірно, може забезпечити мікроорганізмам підвищену стійкість завдяки колективному захисту, фенотиповим змінам та обмеженню проникнення токсичних речовин у глибші шари клітинної маси [55].

Таким чином, результати довготривалого експерименту не лише підтверджують інгібуючий вплив гліфосату при підвищених концентраціях, але й демонструють відмінності в стратегіях адаптації між досліджуваними видами *Bacillus*.

Для оцінки впливу гліфосату на життєздатність бактерій було визначено вміст планктонних колонієутворювальних одиниць *Bacillus subtilis* та *Bacillus megaterium* у культуральному середовищі на 14-ту добу культивування. Це дозволило виявити характер змін ростової активності мікроорганізмів залежно від концентрації гербіциду та порівняти чутливість досліджуваних видів до хімічного стресу (табл.3.1.).

На 14-ту добу експозиції у контрольному середовищі обидва види бактерій зберігали високий рівень планктонної життєздатності.

Таблиця 3.1.

Кількість колонієутворюючих одиниць *Bacillus spp.* на 14 добу
культивування під впливом N-(фосфометил)гліцину

<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Bacillus megaterium</i>		
	Планктонні КУО/мл	Веgetативні у складі біоплівки КУО/мл		Планктонні КУО/мл	Веgetативні у складі біоплівки КУО/мл
Контроль	$2,3 \times 10^5 \pm$ $0,3 \times 10^5$	біоплівка не утворилася	Контроль	$3 \times 10^5 \pm$ $0,5 \times 10^5$	біоплівка не утворилася
25 мг/л	$2,5 \times 10^4 \pm$ $0,4 \times 10^4$	$5,8 \times 10^5 \pm$ $0,9 \times 10^5$	25 мг/л	$3,2 \times 10^4 \pm$ $0,5 \times 10^4$	$4,5 \times 10^5 \pm$ $0,7 \times 10^5$
75 мг/л	$1,1 \times 10^4 \pm$ $0,2 \times 10^4$	$6,9 \times 10^5 \pm$ 1×10^5	75 мг/л	$2,1 \times 10^4 \pm$ $0,3 \times 10^4$	$4,7 \times 10^5 \pm$ $0,7 \times 10^5$
125 мг/л	$0,4 \times 10^4 \pm$ $0,6 \times 10^4$	$7,8 \times 10^5 \pm$ $1,2 \times 10^5$	125 мг/л	$1,4 \times 10^4 \pm$ $0,2 \times 10^4$	$6 \times 10^5 \pm$ $0,2 \times 10^5$

Вищий вміст КУО у *Bacillus megaterium*, може свідчити про його здатність до активнішого розмноження в оптимальних умовах або кращу адаптацію до складу культурального середовища.

За концентрації гліфосату 25 мг/л спостерігається збереження або навіть незначне підвищення кількості КУО порівняно з контролем. У *B. subtilis* рівень КУО залишився стабільним, а у *B. megaterium* – зріс. Припускаємо, що це може бути пов'язано з активацією механізмів стресової регуляції, підвищенням експресії ферментів детоксикації або використанням

компонентів гербіциду (зокрема фосфоногруп) як додаткового джерела фосфору в обмежених умовах.

Подальше зростання концентрації гліфосату до 75 мг/л призводить до чіткого зниження вмісту КУО в обох видів, що свідчить про токсичний ефект сполуки. При цьому *B. subtilis* демонструє суттєве зниження життєздатності, ймовірно, через менш ефективні системи антиоксидантного захисту, меншу буферну ємність клітинної оболонки або чутливіші ферментативні комплекси. *B. megaterium* зберігає вищий рівень КУО, що може свідчити про структурно-функціональні особливості виду, які забезпечують стійкість до гербіцидного навантаження.

На фоні дії 125 мг/л гліфосату КУО *B. subtilis* знижується майже до нуля, що свідчить про глибоке порушення клітинного метаболізму та пригнічення ростових процесів. *B. megaterium* продовжує формувати колонії, хоч і в значно меншій кількості, що підтверджує його вищу толерантність.

Слід зазначити, що зменшення кількості планктонних КУО може бути зумовлене не лише загибеллю клітин, а й переходом частини популяції у прикріпленій стан з утворенням біоплівки.

Отже, результати вказують на дозозалежний токсичний вплив гербіциду на обидва види бактерій, з виражено вищою стійкістю *Bacillus megaterium*, що дозволяє розглядати його як перспективний об'єкт для біотехнологічного застосування в системах очищення довкілля від агрохімікатів.

Дослідження показало, що під впливом гліфосату в концентраціях 25, 75 та 125 мг/л обидва види бактерій переходять у прикріплену форму існування, формуючи біоплівки. За результатами аналізу вмісту КУО у біоплівках на 14 добу культивування встановлено чітку тенденцію до зростання кількості клітин зі збільшенням концентрації гліфосату.

У *Bacillus subtilis* цей показник зростає більш виражено, що може свідчити про його вищу чутливість до гербіцидного стресу та активацію захисних стратегій на ранніх етапах дії токсиканту. Така реакція вказує на те,

що формування біоплівки є для *B. subtilis* ключовим механізмом виживання в агресивному середовищі.

У свою чергу, *Bacillus megaterium* продемонстрував помірніше нарощування біомаси в біоплівці, проте значно вищу частку терmostійких форм – понад 88 % при 125 мг/л (рис 3.1.3.).

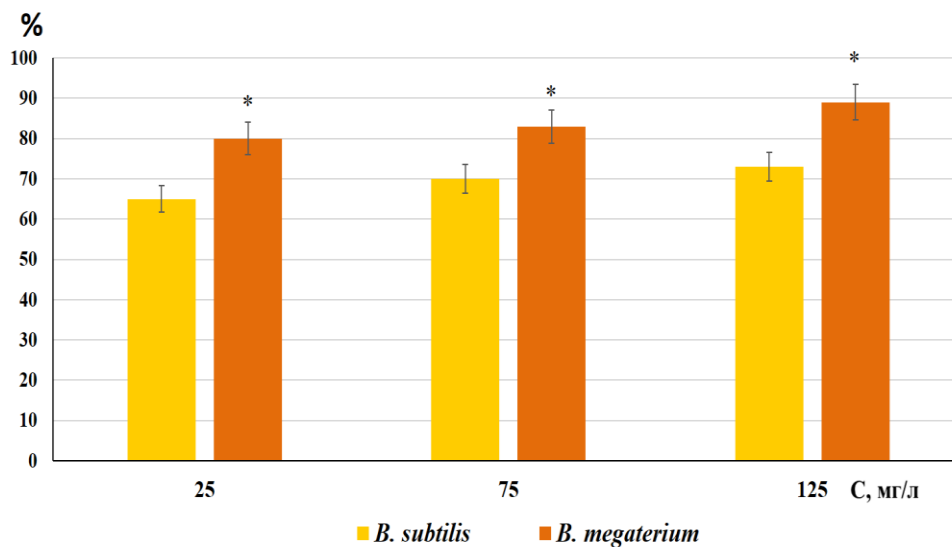


Рис. 3.1.3. Відсоток терmostабільних клітин у біоплівці *Bacillus spp.*, яка сформувалася під впливом N-(фосфометил)гліцину

Примітка:

* - статистично достовірна різниця в порівнянні між двома досліджуваними видами.

Це може свідчити про домінування іншої адаптивної відповіді — інтенсивного спороутворення, що забезпечує тривалий захист клітин за умов дії як хімічного, так і температурного стресу.

Біоплівки – складні мікробні спільноти, вбудовані в матрикс екзополісахаридів, який відіграє роль фізичного бар'єру для токсичних речовин, а також формує мікрооточення зі специфічними градієнтами рН, кисню та іонів [56]. У таких умовах може підвищуватися експресія генів, пов'язаних із стійкістю, включно з ферментами, що здійснюють біодеградацію ксенобіотиків [57]. Ці особливості дозволяють розглядати біоплівку як форму

колективного виживання, що значно перевершує ефективність індивідуальних клітин у планктонному стані.

Як показано у фундаментальному огляді Холла-Студлі і його колег, біоплівкові популяції мають у десятки, а іноді й у сотні разів вищу стійкість до антимікробних агентів, ніж планктонні форми. У контексті отриманих результатів це підтверджується спостереженнями щодо збереження високої життєздатності обох видів *Bacillus spp.* у біоплівках навіть при максимальному досліджуваному рівні гербіцидного навантаження [58].

Таким чином, отримані дані свідчать про два провідні захисні сценарії у досліджених видів: *Bacillus subtilis* активно формує біоплівки як первинну форму адаптації, тоді як *Bacillus megaterium* робить акцент на спороутворення, демонструючи вищу частку термостабільних клітин. Обидва підходи забезпечують ефективне збереження життєздатності за дії гліфосату, однак саме комбіноване використання цих механізмів – біоплівкоутворення та споруляції – виявляється найефективнішою моделлю мікробної стійкості.

Ці особливості варто враховувати при створенні біопрепаратів на основі *Bacillus spp.* для екологічної реабілітації агроecosystem, забруднених гербіцидами.

3.2. Вплив гербіцидного навантаження на засвоєння неорганічного фосфору *B.subtilis* і *B.megaterium*

Гліфосат (N-(фосфометил)гліцин) є органічною сполукою, що містить фосфонатну групу, і в екосистемах може виступати не лише як гербіцид, а й як потенційне джерело фосфору. Проте попри хімічну присутність фосфору в його складі, для більшості мікроорганізмів гліфосат не є безпосередньо доступним як фосфатне джерело. Це пояснюється тим, що атом фосфору в гліфосаті зв'язаний в стійкому C–P-зв'язку, розщеплення якого потребує спеціалізованих ферментів – таких як C–P ліази [59].

За умов низької концентрації гліфосату спостерігалось ефективне засвоєння доступного неорганічного фосфору обома досліджуваними штамми. *B.subtilis* утилізував близько 74% від загальної кількості фосфору в середовищі, тоді як *B.megaterium* – 62%. Це може свідчити про достатньо активний фосфатний обмін за відсутності значного гербіцидного стресу.

Із підвищенням концентрації гліфосату до 75 мг/л засвоєння фосфору, посилилось: *B. subtilis* засвоїв 81%, а *B. megaterium* – 92% від контрольного значення. Така динаміка може бути наслідком адаптаційних механізмів, які активуються у відповідь на помірний рівень гербіцидного навантаження. Не виключено, що саме в цьому діапазоні відбувається стимуляція ферментативної активності, пов'язаної з мобілізацією фосфатів, можливо завдяки змінам у мембранному транспорті або експресії фосфатаз.

При максимальній концентрації гліфосату обидва види демонструють суттєве пригнічення фосфатного метаболізму (рис. 3.2.1.). Засвоєння фосфору знижується до 25% у *B. subtilis* та 34% у *B. megaterium*. Ймовірно, на цьому рівні концентрації гербіцид проявляє токсичну дію, яка порушує клітинні функції, зокрема ферментативні процеси, пов'язані з фосфором.

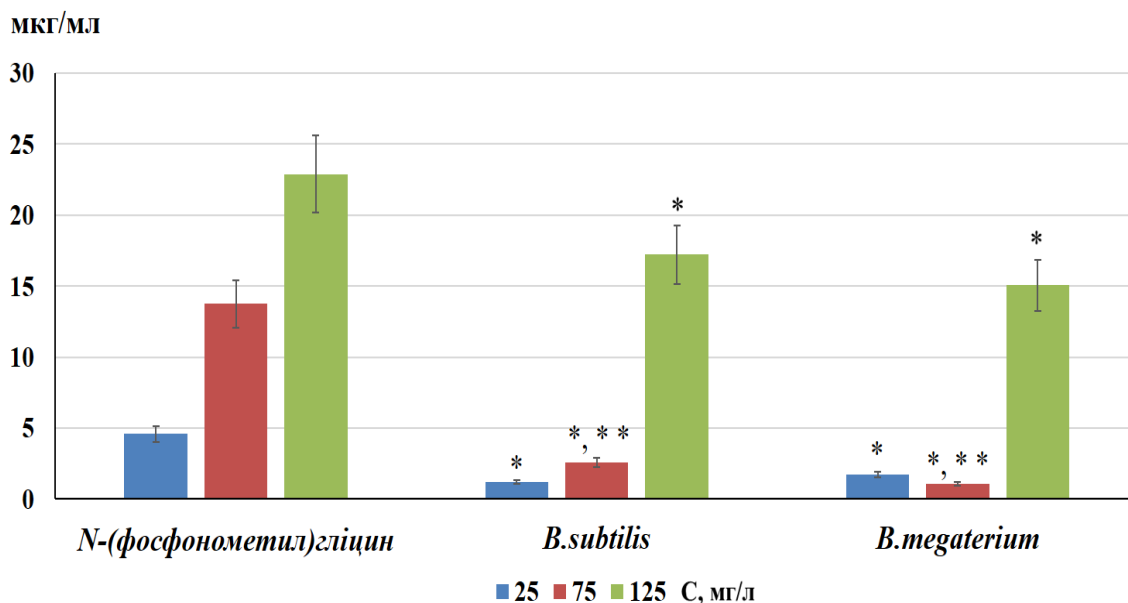


Рис. 3.2.1. Вміст залишкового фосфору у культуральному середовищі *Bacillus spp.* за наявності N-(фосфометил)гліцину після 14-денної експозиції

Примітка:

* - статистично достовірна різниця в порівнянні з контрольним значенням

* *- статистично достовірна різниця між двома досліджуваними видами

Здатність бактерій засвоювати фосфор в умовах дії гліфосату пов'язана не лише з його наявністю у середовищі, а й зі здатністю бактерій мобілізувати фосфор із орґанофосфатів, до яких належить і сам гліфосат. Відомо, що деякі види, зокрема *Bacillus spp.*, мають С–Р ліази – ферменти, які можуть розщеплювати зв'язок С–Р і таким чином використовувати гліфосат як альтернативне джерело фосфору [59].

Важливо зазначити, що ефективність засвоєння фосфору також може бути частково пов'язана з формуванням біоплівки: бактерії в біоплівці мають локальне середовище зі зміненими градієнтами рН та концентрацій іонів, що сприяє утриманню фосфатів і підвищує ефективність їх транспорту [60].

Отже, результати свідчать про високий метаболічний потенціал *B. subtilis* та *B. megaterium* у засвоєнні фосфору за умов низького гербіцидного навантаження. У подальшому *B. megaterium* зберігає вищу фосфатну активність, що корелює з його загальною стійкістю до гліфосату та потенційною здатністю до біодеградації фосфорвмісних ксенобіотиків.

3.3. Визначення вмісту екзополісахаридів та протеаз у *Bacillus subtilis* і *Bacillus megaterium* за тривалої дії N-(фосфонометил)гліцину

Екзополісахаридний матрикс біоплівки відіграє ключову роль у формуванні адаптивної відповіді бактерій на дію несприятливих факторів, зокрема хімічного походження. Він забезпечує структурну цілісність біоплівки, створює захисний бар'єр для клітин, утримує воду, адсорбує іони, буферує рН та ізолює популяцію від токсичних сполук [61].

У разі дії гербіцидів, таких як гліфосат, цей матрикс виконує функцію першої лінії оборони, знижуючи біодоступність токсиканта та створюючи сприятливі умови для підтримки метаболічної активності мікроорганізмів.

Кількісне визначення екзополісахаридів у складі біоплівки є доцільним підходом для оцінки здатності бактерій до біозахисту. Це дозволяє не лише зафіксувати факт формування біоплівки, а й оцінити інтенсивність метаболічної відповіді та потенціал виживання популяцій в умовах токсичного навантаження. Особливо це важливо в умовах хронічного впливу гербіцидів у агроecosистемах.

На 14-ту добу культивування встановлено, що в присутності гліфосату значна частина *Bacillus subtilis* та *Bacillus megaterium* може переходити у прикріплений спосіб існування, формуючи біоплівки з активним синтезом екзополісахаридного матриксу. Біоплівки були відсутні у контрольному середовищі, що свідчить про індукування цього процесу саме гербіцидним стресом. У всіх варіантах із гліфосатом спостерігалось накопичення екзополісахаридів, яке зростало зі збільшенням концентрації токсиканта.

Здатність бактерій до посиленого біоплівкоутворення у відповідь на дію гліфосату підтверджує уявлення про біоплівки як універсальний механізм екологічної резистентності [62,63].

Відомо, що у таких структурах активується експресія генів, відповідальних за стійкість до токсикантів, детоксикацію та горизонтальний перенос генетичної інформації [64], що підвищує шанси популяції на виживання навіть в умовах, летальних для планктонних форм.

У реакції *B. subtilis* спостерігався більш виражений синтез екзополісахаридів, що, ймовірно, відображає реалізацію стратегії швидкої метаболічної адаптації на фоні вищої чутливості до гліфосату (рис. 3.3.1.).

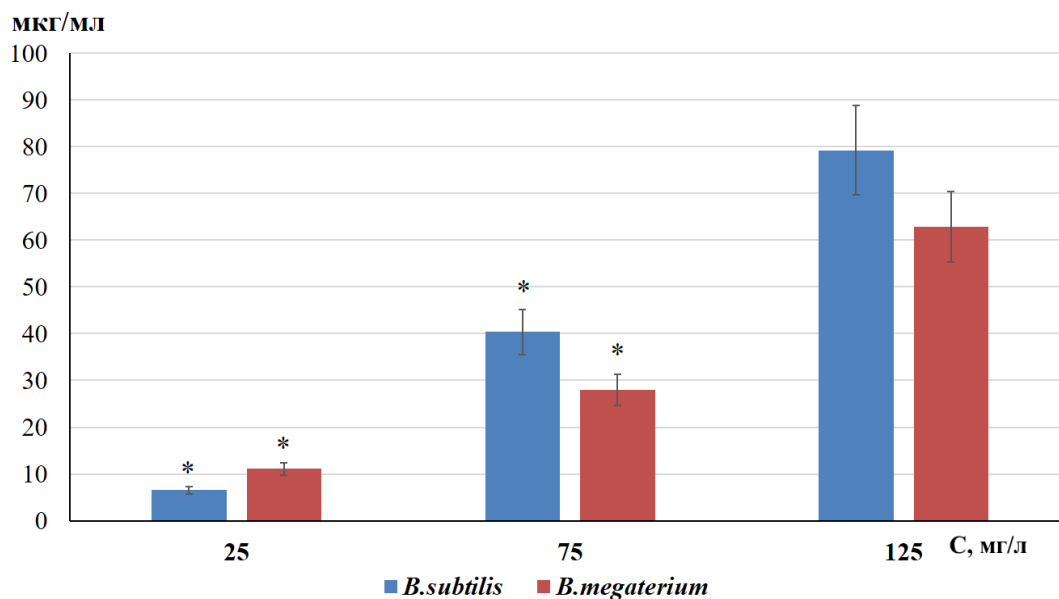


Рис. 3.3.1. Вміст екзополісахаридів у *Bacillus spp.* за умов дії N-(фосфометил)гліцину

Примітка:

* - статистично достовірна різниця між двома досліджуваними видами

Така відповідь узгоджується з механізмами, характерними для грампозитивних бактерій, де стрес запускає сигнальні каскади через транскрипційний регулятор Spo0A [65].

B. megaterium, натомість, демонстрував стабільнішу, але менш динамічну відповідь, що може свідчити про ефективну реалізацію повільнішої, але енергетично ощадної захисної стратегії.

Отримані результати підтверджують, що екзополісахаридний матрикс є не просто структурним елементом біоплівки, а динамічним механізмом адаптації. Його синтез є чутливим маркером бактеріальної відповіді на гербіцидне навантаження та відіграє ключову роль у забезпеченні виживання популяцій *Bacillus spp.* у зміненому середовищі.

Протеази виконують важливі функції в бактеріальному метаболізмі: вони беруть участь у деградації білкових субстратів, регенерації білків, руйнуванні пошкоджених молекул, мобілізації джерел азоту та формуванні умов для виживання клітин у несприятливому середовищі [65].

Результати дослідження показали, що вже при низькій концентрації гліфосату відбувається активація протеазної секреції в обох видів *Bacillus spp.* (рис. 3.3.2).

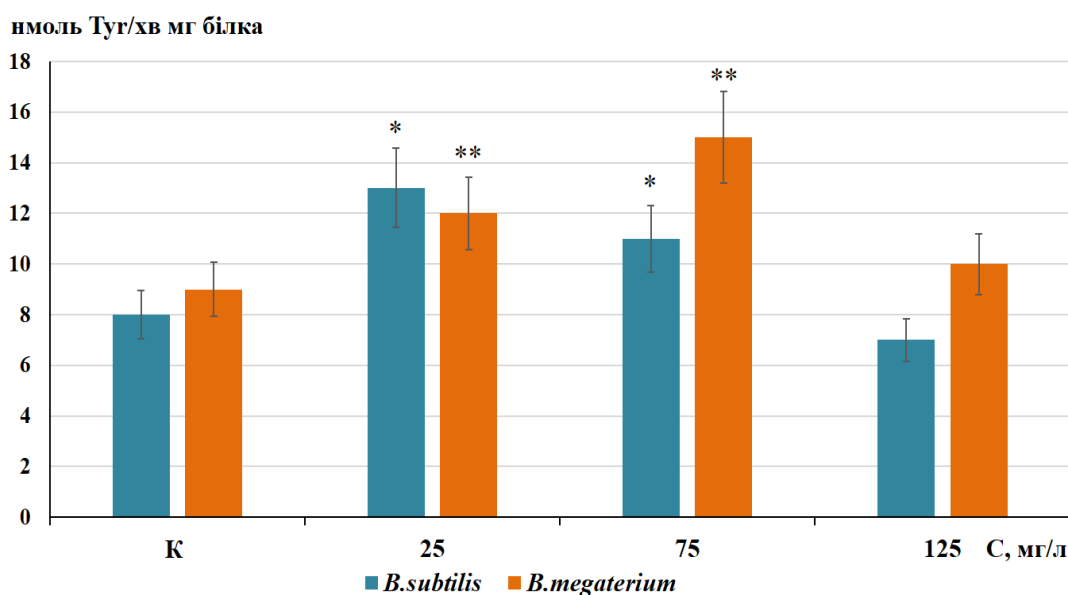


Рис. 3.3.2. . Загальна протеолітична активність (рН 7,4) *Bacillus spp.* за умов внесення в культуральне середовище N-(фосфометил)гліцину

Примітка:

* - статистично достовірна різниця в порівнянні з контрольним значенням для *B. subtilis*

* *- статистично достовірна різниця в порівнянні з контрольним значенням для *B. megaterium*

Така реакція вказує на раннє розпізнавання стресового сигналу й мобілізацію ферментативної системи для стабілізації внутрішньоклітинного середовища. Зростання ферментативної активності можна розглядати як реакцію на оксидативний та метаболічний стрес, за якого бактерії посилюють

розщеплення білкових компонентів, що зазнали пошкодження, і спрямовують амінокислоти на відновлення клітинних структур [66].

Максимальна активність протеаз була зафіксована за дії гліфосату в концентрації 75 мг/л, особливо у *Bacillus megaterium*. Це може свідчити про здатність цього виду підтримувати високий рівень позаклітинного метаболізму навіть за умов посиленого токсичного навантаження. У таких умовах секреція протеаз може бути пов'язана як із процесами аутолізу пошкоджених клітин, так і з адаптаційною перебудовою білкових профілів [67].

У *Bacillus subtilis* при тій самій концентрації спостерігалася лише помірна активація, що може вказувати на нижчий поріг стійкості до гліфосату або менш активне залучення ферментативної відповіді.

За максимальної концентрації полютанту в обох видів відзначається зниження протеазної активності, особливо помітне у *B. subtilis*. Це, ймовірно, є наслідком загального пригнічення метаболізму та зниження кількості життєздатних клітин, здатних до ферментативної секреції. Натомість *B. megaterium* демонстрував відносно вищу ферментативну активність, що підтверджує його більшу екологічну пластичність і стійкість до хімічного стресу.

Отже, проведене дослідження показало, що N-(фосфометил)гліцин чинить переважно інгібуючий вплив на культури *Bacillus*, знижуючи кількість колонієутворюючих одиниць та здатність до засвоєння неорганічного фосфору, при цьому стимулюючи синтез екзополісахаридів і протеаз. Ступінь цього впливу є дозозалежним і значною мірою визначається тривалістю експозиції, що свідчить про потенційну загрозу гліфосату, при його надмірному або тривалому застосуванні.

ВИСНОВКИ

1. N-(фосфометил)гліцин чинить концентраційно-залежний вплив на ріст *Bacillus spp*, Нижчі концентрації стимулюють нагромадження біомаси та збільшення кількості планктонних колонієутворюючих одиниць, а вищі – виявляють інгібуючий ефект.

2. Довготривалий вплив N-(фосфометил)гліцину в усіх досліджуваних концентраціях сприяє формуванню біоплівки *Bacillus spp*, у якій, залежно від концентрації, змінюється кількість КУО та екзополісахаридів.

3. Зростання гербіцидного навантаження призводить до зниження загальної протеолітичної активності та інтенсивності засвоєння неорганічного фосфору у культуральному середовищі, як у *B.subtilis* так і в *B.megaterium*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), 319–325. <https://doi.org/10.1002/ps.1518>
2. Zabalza, A., Orcaray, L., Fernández-Escalada, M., Zulet, A., & Royuela, M. (2016). The pattern of shikimate pathway and phenylpropanoids after inhibition by glyphosate or quinate feeding in pea roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.12.005>
3. Patocka, J. (2018). Is glyphosate really hazardous for human health? *Military Medical Science Letters*, 87, 169–183. <https://doi.org/10.31482/mmsl.2018.030>
4. Mendes, K., de Sousa, R., & Souza Laube, A. F. (2020). Current approaches to pesticide use and glyphosate-resistant weeds in Brazilian agriculture. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91872>
5. Borggaard, O. K., & Gimsing, A. L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: A review. *Pest Management Science*, 64, 441–456. <https://doi.org/10.1002/ps.1512>
6. Overbeek, W., Lucotte, M., D'Astous-Pagé, J., Jeanne, T., Pin, C., Moingt, M., & Hogue, R. (2024). Impacts of cropping systems on glyphosate and aminomethylphosphonic acid contents and microbial community in field crop soils in Quebec (Canada). *Agronomy*, 14(4), 686. <https://doi.org/10.3390/agronomy14040686>
7. Muñoz, J. P., Silva-Pavez, E., Carrillo-Beltrán, D., & Calaf, G. M. (2023). Occurrence and exposure assessment of glyphosate in the environment and its impact on human beings. *Environmental Research*, 231(Pt 3), 116201. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116201>
8. Dennis, P. G., Kukulies, T., Forstner, C., et al. (2018). The effects of glyphosate, glufosinate, paraquat and paraquat-diquat on soil microbial activity and bacterial, archaeal and nematode diversity. *Scientific Reports*, 8, 2119. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20589-6>

9. Walsh, L., Hill, C., & Ross, R. P. (2023). Impact of glyphosate (Roundup™) on the composition and functionality of the gut microbiome. *Gut Microbes*, 15(2), 2263935. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2263935>
10. Mayer, Z., Sasvári, Z., Szentpéteri, V., Pethőné Rétháti, B., Vajna, B., & Posta, K. (2019). Effect of long-term cropping systems on the diversity of the soil bacterial communities. *Agronomy*, 9(12), 878. <https://doi.org/10.3390/agronomy9120878>
11. Kubis, G. C., Marques, R. Z., Kitamura, R. S. A., Barroso, A. A. M., Juneau, P., & Gomes, M. P. (2023). Antioxidant enzyme and cytochrome P450 activities are involved in horseweed (*Conyza sumatrensis*) resistance to glyphosate. *Stresses*, 3(1), 47–57. <https://doi.org/10.3390/stresses3010005>
12. Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., & van Elsas, J. D. (2015). Ecology of Bacillaceae. *Microbiology Spectrum*, 3(2), TBS-0017-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0017-2013>
13. Wróbel, M., Śliwakowski, W., Kowalczyk, P., Kramkowski, K., & Dobrzyński, J. (2023). Bioremediation of heavy metals by the genus *Bacillus*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(6), 4964. <https://doi.org/10.3390/ijerph20064964>
14. Sagatys, D., Dahlgren, C., Smith, G., Bott, R., & Willis, A. (2000). Metal complexes with N-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate): The preparation and characterization of the group 2 metal complexes with glyphosate and the crystal structure of barium glyphosate dihydrate. *Australian Journal of Chemistry*, 53, 77–81. <https://doi.org/10.1071/CH99160>
15. Ibáñez, M., Pozo, O. J., Sancho, J. V., López, F. J., & Hernández, F. (2005). Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1081(2), 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.041>

16. National Center for Biotechnology Information. (2025). PubChem Compound Summary for CID 3496, Glyphosate. Retrieved May 23, 2025, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>
17. Sihtmäe, M., Blinova, I., Künnis-Beres, K., Kanarbik, L., Heinlaan, M., & Kahru, A. (2013). Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. *Applied Soil Ecology*, 72, 215–224.
18. Khaleel Mousa, N., Ali, A. J., & Hussein, M. (2022). *Bacillus megaterium* biodegradation glyphosate. In *Biodegradation technology of organic and inorganic pollutants* [Internet]. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96919>
19. Ruffolo, F., Dinhof, T., Murray, L., Zangelmi, E., Chin, J. P., Pallitsch, K., & Peracchi, A. (2023). The microbial degradation of natural and anthropogenic phosphonates. *Molecules*, 28, 6863. <https://doi.org/10.3390/molecules28196863>
20. Ojelade, B. S., Durowoju, O. S., Adesoye, P. O., Gibb, S. W., & Ekosse, G.-I. (2022). Review of glyphosate-based herbicide and aminomethylphosphonic acid (AMPA): Environmental and health impacts. *Applied Sciences*, 12, 8789. <https://doi.org/10.3390/app12178789>
21. Muñoz, J. P., Silva-Pavez, E., Carrillo-Beltrán, D., & Calaf, G. M. (2023). Occurrence and exposure assessment of glyphosate in the environment and its impact on human beings. *Environmental Research*, 231(Pt 3), 116201. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116201>
22. Ames, J., Miragem, A. A., Cordeiro, M. F., Cerezer, F. O., & Loro, V. L. (2022). Effects of glyphosate on zebrafish: A systematic review and meta-analysis. *Ecotoxicology*, 31(8), 1189–1204. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02581-z>
23. Liu, Y., Li, Y., Hua, X., Müller, K., Wang, H., Yang, T., Wang, Q., Peng, X., Wang, M., Pang, Y., Qi, J., & Yang, Y. (2018). Glyphosate application increased catabolic activity of gram-negative bacteria but impaired soil fungal community. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(15), 14762–14772. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1676-0>

24. Yu, X. M., Yu, T., Yin, G. H., Dong, Q. L., An, M., Wang, H. R., & Ai, C. X. (2015). Glyphosate biodegradation and potential soil bioremediation by *Bacillus subtilis* strain Bs-15. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 14717–14730. <https://doi.org/10.4238/2015.November.18.37>
25. Pu, Y., Yang, J., Chang, L., Qu, Y., Wang, S., Zhang, K., Xiong, Z., Zhang, J., Tan, Y., Wang, X., Fujita, Y., Ishima, T., Wang, D., Hwang, S. H., Hammock, B. D., & Hashimoto, K. (2020). Maternal glyphosate exposure causes autism-like behaviors in offspring through increased expression of soluble epoxide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(21), 11753–11759. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922287117>
26. Evalen, P. S., Barnhardt, E. N., Ryu, J., & Stahlschmidt, Z. R. (2024). Toxicity of glyphosate to animals: A meta-analytical approach. *Environmental Pollution*, 347, 123669. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123669>
27. Tizhe, E. V., Ibrahim, N. D., Fatihu, M. Y., Ambali, S. F., Igbokwe, I. O., & Tizhe, U. D. (2020). Effect of zinc supplementation on chronic hepatorenal toxicity following oral exposure to glyphosate-based herbicide (Bushfire®) in rats. *Journal of International Medical Research*, 48(8), 300060520925343. <https://doi.org/10.1177/0300060520925343>
28. Spinaci, M., Nerozzi, C., Tamanini, C. L., Bucci, D., & Galeati, G. (2020). Glyphosate and its formulation Roundup impair pig oocyte maturation. *Scientific Reports*, 10(1), 12007. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68813-6>
29. Zabalza, A., Orcaray, L., Fernández-Escalada, M., Zulet, A., & Royuela, M. (2016). The pattern of shikimate pathway and phenylpropanoids after inhibition by glyphosate or quinate feeding in pea roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.12.005>
30. 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. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(20), 7519. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207519>

31. Ojelade, B.S.; Durowoju, O.S.; Adesoye, P.O.; Gibb, S.W.; Ekosse, G.-I. Review of Glyphosate-Based Herbicide and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA): Environmental and Health Impacts. *Appl. Sci.* 2022, 12, 8789. <https://doi.org/10.3390/app12178789>
32. Ge, X., d'Avignon, D. A., Ackerman, J. J., & Sammons, R. D. (2014). In vivo ³¹P-nuclear magnetic resonance studies of glyphosate uptake, vacuolar sequestration, and tonoplast pump activity in glyphosate-resistant horseweed. *Plant physiology*, 166(3), 1255–1268. <https://doi.org/10.1104/pp.114.247197>
33. Cho, A. Y., Oh, J. H., Oh, S. S., Lee, K. Y., & Sun, I. O. (2023). Clinical characteristics of acute kidney injury in patients with glyphosate surfactant herbicide poisoning. *Kidney research and clinical practice*, 42(3), 349–357. <https://doi.org/10.23876/j.krcp.22.051>
34. Chávez-Reyes, J., Saráchaga-Terrazas, F., Colis-Arenas, O. A., López-Lariz, C. H., Villalón, C. M., & Marichal-Cancino, B. A. (2024). Aminomethylphosphonic Acid (AMPA), a Glyphosate Metabolite, Decreases Plasma Cholinesterase Activity in Rats. *Journal of xenobiotics*, 14(2), 604–612. <https://doi.org/10.3390/jox14020035>
35. Sun L, Kong D, Gu W, Guo X, Tao W, Shan Z, Wang Y, Wang N. Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2017 Jun 16;1502:8-13. doi: 10.1016/j.chroma.2017.04.018. Epub 2017 Apr 12. PMID: 28476318.
36. Wang S, Liu B, Yuan D, Ma J. A simple method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in seawater matrix with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Talanta*. 2016 Dec 1;161:700-706. doi: 10.1016/j.talanta.2016.09.023. Epub 2016 Sep 13. PMID: 27769468.
37. Corbera, Marta & Hidalgo, Manuela & Salvado, Victoria. (2006). Extraction and Preconcentration of the Herbicide Glyphosate and its Metabolite AMPA Using Anion-Exchange Solid Phases. *Microchim. Acta*. 153. 203-209. [10.1007/s00604-005-0462-0](https://doi.org/10.1007/s00604-005-0462-0).

38. Harirchi, S., Sar, T., Ramezani, M., Aliyu, H., Etemadifar, Z., Nojoumi, S. A., Yazdian, F., Awasthi, M. K., & Taherzadeh, M. J. (2022). Bacillales: From Taxonomy to Biotechnological and Industrial Perspectives. *Microorganisms*, 10(12), 2355. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122355>
39. Nicholson, W.L. (2002) Roles of Bacillus Endospores in the Environment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 410-416. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8433-7>
40. Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). Bacillus subtilis: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>
41. Earl, A. M., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of Bacillus subtilis. *Trends in Microbiology*, 16(6), 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>
42. Ren, W., Li, P., Wang, X., Che, Y., Long, H., Zhang, X., Cai, X., Huang, A., Zeng, Y., & Xie, Z. (2022). Cross-habitat distribution pattern of Bacillus communities and their capacities of producing industrial hydrolytic enzymes in Paracel Islands: Habitat-dependent differential contributions of the environment. *Journal of Environmental Management*, 323, 116252. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116252>
43. Hamiot, A., Lemy, C., Krzewinski, F., Faille, C., & Dubois, T. (2023). Sporulation conditions influence the surface and adhesion properties of Bacillus subtilis spores. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1219581. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1219581>
44. Akinsemolu, A. A., Onyeaka, H., Odion, S., & Adebajo, I. (2024). Exploring Bacillus subtilis: Ecology, biotechnological applications, and future prospects. *Journal of Basic Microbiology*, 64(6), e2300614. <https://doi.org/10.1002/jobm.202300614>
45. Wushensky, J. A., Youngster, T., Mendonca, C. M., & Aristilde, L. (2018). Flux connections between gluconate pathway, glycolysis, and pentose-phosphate pathway during carbohydrate metabolism in Bacillus megaterium QM

B1551. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2789.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02789>

46. Iqbal, S., Begum, F., Rabaan, A. A., Aljeldah, M., Al Shammari, B. R., Alawfi, A., Alshengeti, A., Sulaiman, T., & Khan, A. (2023). Classification and multifaceted potential of secondary metabolites produced by *Bacillus subtilis* group: A comprehensive review. *Molecules*, 28(3), 927.
<https://doi.org/10.3390/molecules28030927>

47. Špacapan, M., Danevčič, T., Štefanič, P., Porter, M., Stanley-Wall, N. R., & Mandić-Mulec, I. (2020). The ComX quorum sensing peptide of *Bacillus subtilis* affects biofilm formation negatively and sporulation positively. *Microorganisms*, 8(8), 1131. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081131>

48. Zhou, L., Zhang, Y., Ge, Y., Zhu, X., & Pan, J. (2020). Regulatory mechanisms and promising applications of quorum sensing-inhibiting agents in control of bacterial biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 589640. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589640>

49. Marchand, N., & Collins, C. H. (2016). Synthetic quorum sensing and cell-cell communication in gram-positive *Bacillus megaterium*. *ACS Synthetic Biology*, 5(7), 597–606. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00099>

50. Іванченко, А. В., Єлатонцев, Д. О., & Хавікова, К. Є. (2019). Методичні вказівки виконання лабораторних робіт з дисципліни «Технологія питної і технічної води» для студентів спеціальностей 161 «Хімічні технології та інженерія», 101 «Екологія» всіх форм навчання. Кам'янське: ДДТУ.

51. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.

52. Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, 22(1), 79–89. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>

53. Duke, S. O., Belz, R. G., Carbonari, C. A., & Velini, E. D. (2025). Understanding herbicide hormesis: Evaluating its positive and negative aspects with emphasis on glyphosate. *Advances in Weed Science*, 43, e020250104.
54. Vilchez, J. I., Tang, Q., Kaushal, R., Wang, W., Lv, S., He, D., Chu, Z., Zhang, H., Liu, R., & Zhang, H. (2018). Genome sequence of *Bacillus megaterium* strain YC4-R4, a plant growth-promoting rhizobacterium isolated from a high-salinity environment. *Genome Announcements*, 6, e00527–18. <https://doi.org/10.1128/genomea.00527-18>
55. Caro-Astorga, J., Frenzel, E., Perkins, J. R., Álvarez-Mena, A., de Vicente, A., Ranea, J. A. G., Kuipers, O. P., & Romero, D. (2020). Biofilm formation displays intrinsic offensive and defensive features of *Bacillus cereus*. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 6, 3. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0112-7>
56. Ткачук, Н. В. (2023). Біоплівки та біообростання: Збірник лекцій для студентів та аспірантів природничих спеціальностей закладів вищої освіти. Чернігів: Десна Поліграф.
57. Kumar, S., et al. (2021). Glyphosate: Environmental contamination, toxicity and microbial remediation. *Environmental Chemistry Letters*, 19(3), 2773–2790.
58. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
59. Stosiek, N., Talma, M., & Klimek-Ochab, M. (2020). Carbon-phosphorus lyase—the state of the art. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190(4), 1525–1552. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03161-4>
60. Hove-Jensen, B., Zechel, D. L., & Jochimsen, B. (2014). Utilization of glyphosate as phosphate source: Biochemistry and genetics of bacterial carbon-phosphorus lyase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(1), 176–197. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-13>
61. Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633.

62. López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7), a000398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398>
63. Liu, H. Y., Prentice, E. L., & Webber, M. A. (2024). Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. *NPJ Antimicrobials and Resistance*, 2(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00046-3>
64. Oliveira, N. M., Martinez-Garcia, E., Xavier, J., Durham, W. M., Kolter, R., Kim, W., & Foster, K. R. (2015). Biofilm formation as a response to ecological competition. *PLoS Biology*, 13(7), e1002191. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002191>
65. Gupta, R., Beg, Q. K., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 15–32. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0975-y>
66. Goswami, G., Panda, D., Samanta, R., Boro, R. C., Modi, M. K., Bujarbaruah, K. M., & Barooah, M. (2018). *Bacillus megaterium* adapts to acid stress condition through a network of genes: Insight from a genome-wide transcriptome analysis. *Scientific Reports*, 8(1), 16105. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34221-0>
67. Öktem, A., Pranoto, D. A., & van Dijl, J. M. (2024). Post-translational secretion stress regulation in *Bacillus subtilis* is controlled by intra- and extracellular proteases. *New Biotechnology*, 79, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2023.12.009>

ДОДАТКИ

Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях

Дозволяється працювати лише на заземлених об'єктах.

Приміщення хімічних лабораторій обладнуються вентиляцією, а місця можливого накопичення шкідливих хімічних речовин – відсмоктувачами.

Підлоги лабораторій повинні мати рівну, неслизьку, зручну для очищення поверхню, бути стійкими до дії механічних навантажень, вологи і агресивних середовищ.

Кожен працівник у лабораторії повинен мати закріплене за ним робоче місце.

Перед початком роботи слід одягти спецодяг (халат).

У спецодязі забороняється знаходитись за межами лабораторії.

При можливості скляний посуд і скляні частини заміняють пластиковими.

Нагріваючи рідину в пробірці або інших посудинах, їх тримають спеціальними утримувачами так, щоб отвір був спрямований від себе і працюючих поруч.

При перенесенні посудин із гарячою рідиною користуються рушником, посудину при цьому тримають обома руками: однією за дно, а другою за горловину.

При переливанні рідин (крім тих, що містять біологічний матеріал) користуються лійкою.

При розведенні речовин, що супроводжуються виділенням тепла, користуються термостійким хімічним посудом.

При роботі з кислотами та лугами виконують такі заходи безпеки:

- усю роботу з концентрованими кислотами та лугами проводять у витяжній шафі, користуючись при цьому окулярами, гумовими рукавичками та фартухом;

- концентровану кислоту відбирають із посудини тільки за допомогою спеціальної піпетки з грушею або сифоном;
- при приготуванні розчинів кислот спочатку в посудину наливають необхідну кількість води, а потім додають кислоту. Забороняється додавати воду в кислоту;
- при приготуванні розчинів лугів наважку лугу опускають у велику широкогорлу посудину, заливають необхідною кількістю води і старанно перемішують. Шматки лугу варто брати тільки щипцями;
- концентровані кислоти і луги виливають у раковину після попередньої їх нейтралізації.

При роботі з легкозаймистими речовинами (ефір, бензин, бензол, ацетон, спирт та ін.) дотримуються такої вимоги:

- усі роботи проводяться у витяжній шафі при ввімкненій вентиляції, вимкнених газових пальниках і нагрівальних електроприладах.

Категорично забороняється:

- доручати проведення робіт із вогнебезпечними речовинами недосвідченому співробітнику;
- під час роботи в приміщенні запалювати сірники, палити, включати прилади, при роботі яких може виникнути іскра.

Після закінчення роботи із шкідливими речовинами необхідно:

- привести в порядок робоче місце;
- залишки шкідливих речовин здати на зберігання;
- старанно вимити руки з милом.

Забороняється використовувати речовини без етикеток та із закінченим терміном зберігання;

Після закінчення роботи необхідно вимити та висушити посуд, прибрати робоче місце, провітрити приміщення, відключити всі нагрівальні та освітлювальні прилади, закрутити водопровідні та газові крани.

Категорично забороняється працювати в лабораторії одному.

Виходячи з лабораторії, обов'язково перевірити, чи вимкнені газ, вода, електроенергія.

Надання першої допомоги

При виникненні пожежі в лабораторії необхідно негайно вимкнути газ та нагрівальні прилади, прибрати легкозаймисті рідини, вогонь засипати піском. Великий вогонь гасять за допомогою вогнегасника. Не можна задувати палаючу рідину або заливати її водою. Якщо на людині палає одяг, її треба швидко закутати в ковдру, халат або покласти на підлогу і, перекочуючи, збивати полум'я.

У всіх лабораторіях у доступному постійному місці має бути аптечка з набором необхідних матеріалів і медикаментів.

При теплових опіках роблять примочку з розчином 2 %-го KMnO_4 , а потім наносять мазь від опіків.

При хімічних опіках шкіри необхідно насамперед видалити речовину, що викликала опік, відповідним розчинником, а потім уражену ділянку обробити етиловим спиртом і змастити маззю від опіків.

При опіках кислотами ушкоджене місце обмивають водою з крану, а потім 3 %-вим розчином натрій гідрогенкарбонату (питної соди); при опіках їдкими лугами – водою, а потім 2 %-вим розчином оцтової або борної кислоти і знову водою.

При опіках очей кислотою необхідно промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у розчині питної соди, і знову змити водою; при опіках очей лугом – промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 2 %-му розчині борної кислоти, і знову промити водою. Після цього необхідно звернутись до лікаря.

При порізах склом у першу чергу необхідно пінцетом, попередньо промитим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, рану промити дистильованою водою або протерти тампоном, змоченим в етиловому спирті, а далі змастити 5 %-вим розчином йоду та забинтувати. Невеликі порізи можна заклеїти антисептичним пластиром.

При ураженні електрострумом насамперед необхідно відключити електроенергію, а потім, якщо необхідно, зробити штучне дихання та викликати швидку допомогу.

При інгаляційних ураженнях потрібно негайно вийти на свіже повітря.

Публікації за результатами дослідження