

Оценка и мониторинг воздействия генетически модифицированных растений на почвенные микроорганизмы в агроэкосистемах

© 2016. И. Г. Широких^{1,3}, д. б. н., в. н. с., профессор,
 Я. И. Назарова^{2,3}, м. н. с., магистрант, А. В. Бакулина^{2,3}, м. н. с., магистрант,
¹ Институт биологии Коми НЦ УрО РАН,
 167982, Россия, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28,
² Зональный НИИСХ Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого,
 610007, Россия, г. Киров, ул. Ленина, 166 а,
³ Вятский государственный университет,
 610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, 36,
 e-mail: irgenal@mail.ru

Статистические данные 2015 г. о распространении генетически модифицированных (ГМ) сельскохозяйственных культур в производственных посевах 28 стран свидетельствуют о том, что создание и использование трансгенных растений стало международной агроэкологической проблемой. Представлен обзор зарубежной литературы по вопросу оценки экологических рисков выращивания ГМ растений для почвенной микробной системы. Обсуждаются вопросы сохранения биологического разнообразия, горизонтального переноса генов, неконтролируемого повышения конкурентоспособности отдельных видов грибов и бактерий, в том числе фитопатогенных, роли рекомбинантных бактерий в эволюционных процессах. Особое внимание уделено эффектам ГМ сортов, несущих гены устойчивости к гербициду раундап (RR-растения) и насекомым-вредителям (Bt-растения) в связи с их широким распространением, а также экскрецией ими новых трансгенных белков в ризосферу. Значительные успехи в изучении микробной экологии ГМ культур принесло использование, в дополнение к традиционным, методов, основанных на ДНК-технологиях. Генетическое профилирование ризосферных микроорганизмов в большинстве случаев показывает, что изменения, обусловленные чужеродной вставкой ДНК, нестабильны и пренебрежимо малы, по сравнению с изменчивостью, связанной с причинами естественного характера. Большинство эффектов ГМ культур для почвы являются следствием индуцируемых изменений в стратегии межорганизменных взаимодействий, а не результатом прямого влияния специфических черт ГМ растений. Тем не менее, для выявления возможных опасных последствий выращивания ГМ культур для агроэкосистем необходима система мониторинга почвенных микробных сообществ.

Ключевые слова: трансгенные растения, микроорганизмы почвы, биологическое разнообразие, горизонтальный перенос генов, рекомбинантные бактерии, экологический риск, мониторинг.

Evaluation and monitoring of the impact of genetically modified plants on soil microorganisms in agro-ecosystems

I. G. Shirokikh^{1,3}, Ya. I. Nazarova^{2,3}, A. V. Bakulina^{2,3},
¹ Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS,
 28 Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,
² N. V. Rudnitskiy Zonal North-East Agricultural Research Institute,
 166 a Lenin St., Kirov, Russia, 610007,
³ Vyatka State University,
 36 Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,
 e-mail: irgenal@mail.ru

In 2015 the statistical data on distribution of genetically modified (GM) crops in industrial crops of 28 countries show that creation and use of transgenic plants has become an international agro-ecological problem. The review of foreign literature on the environmental risk assessment of GM plants for soil microbial systems is presented. They discuss the issues of biodiversity conservation, horizontal gene transfer, uncontrolled increase of competitiveness of certain types of fungi and bacteria, including pathogenic ones, recombinant bacteria in the role of evolutionary processes. Particular attention is paid to the effects of GM cultivars carrying resistance genes to the herbicide Roundup (RR-plant) and insect (Bt-plants) due to their wide distribution, as well as excretion of new transgenic proteins in the rhizosphere. Significant advances in the study of microbial ecology of GM crops caused working out methods based on DNA technology, in addition to the traditional ones. Genetic profiling rhizosphere microorganisms in most cases indicates that the changes caused by

insertion of foreign DNA are unstable and are negligible as compared with variability caused by natural reasons. Most of the effects of GM crops on soil take place due to induced changes in strategy of interorganismal interactions, rather than result from the direct effect of specific features of GM plants. However, to identify possible dangerous consequences for agro-ecosystems in growing GM crops requires a whole system of monitoring of soil microbial communities.

Keywords: transgenic plants, soil microorganisms, biological diversity, horizontal gene transfer, recombinant bacteria, environmental risk, monitoring.

С тех пор, как в 1996 г. началось коммерческое выращивание генетически модифицированных (ГМ) культур, засеиваемые ими площади непрерывно увеличивались и составили в 2015 г. уже около 180 миллионов гектаров. Ежегодно до 18 миллионов фермерских хозяйств выращивают ГМ культуры в 28 странах, причем 90% этих хозяйств находится в развивающихся странах (табл.).

Около 90% площади, засеваемой ГМ культурами (как пищевыми, так кормовыми и

техническими), принадлежит пяти странам (США, Бразилия, Аргентина, Индия и Канада). Посевные площади, занятые под трансгенными сортами сои, кукурузы, хлопчатника, сахарной свёклы, картофеля, рапса, льна увеличиваются примерно на 10% ежегодно. Основной ГМ культурой на настоящий момент является соя, после которой по объёму выращивания следуют хлопчатник, кукуруза и рапс. От всех площадей под каждой из культур трансгенный хлопчатник занимал 75%,

Таблица

Общая площадь ГМ культур в 2015 г.: по странам (по [1])

№ п/п	Страна	Площадь (млн га)	Генетически модифицированные культуры
1	США	70,9	Кукуруза, соя, хлопок, рапс, сахарная свёкла, люцерна, папайя, тыква, картофель
2	Бразилия	44,2	Соя, кукуруза, хлопок
3	Аргентина	24,5	Соя, кукуруза, хлопок
4	Индия	11,6	Хлопок
5	Канада	11,0	Рапс, кукуруза, соя, сахарная свёкла
6	Китай	3,7	Хлопок, папайя, тополь
7	Парагвай	3,6	Соя, кукуруза, хлопок
8	Пакистан	2,9	Хлопок
9	ЮАР	2,7	Кукуруза, соя, хлопок
10	Уругвай	1,4	Соя, кукуруза
11	Боливия	1,1	Соя
12	Филиппины	0,7	Кукуруза
13	Австралия	0,7	Хлопок, рапс
14	Буркина-Фасо	0,4	Хлопок
15	Мьянма	0,3	Хлопок
16	Мексика	0,1	Хлопок, соя
17	Испания	0,1	Кукуруза
18	Колумбия	0,1	Хлопок, кукуруза
19	Судан	0,1	Хлопок
20	Гондурас	<0,1	Кукуруза
21	Чили	<0,1	Кукуруза, соя, рапс
22	Португалия	<0,1	Кукуруза
23	Вьетнам	<0,1	Кукуруза
24	Чешская Республика	<0,1	Кукуруза
25	Словакия	<0,1	Кукуруза
26	Коста-Рика	<0,1	Хлопок, соя
27	Бангладеш	<0,1	Баклажан
28	Румыния	<0,1	Кукуруза
	Всего	179,7	

кукуруза – 29%, рапс – 24%, соответственно. К числу наиболее популярных изменений генома относятся устойчивость к гербицидам и/или защита от насекомых-вредителей.

Наряду с формированием новых хозяйственно ценных свойств, генно-инженерное вмешательство создаёт для растений вероятность приобретения новых качеств, обусловленных как свойствами самой встроеной конструкции, так и её плейотропным действием, в том числе её нестабильностью и регуляторным действием на соседние гены. Из-за нарушений в эндогенных путях первичного метаболизма плейотропные эффекты могут повлечь изменения в корневой экскреции трансгенных растений и, как следствие, изменения в почвенной микробной системе [2]. В то время как медико-биологическая безопасность ГМ растений и продуктов из них стала предметом горячих дискуссий в международном сообществе, вопросам потенциальных рисков трансгенов для окружающей среды и процессов эволюции до сих пор уделялось гораздо меньшее внимание.

В связи со стократным увеличением во всём мире площадей (с 1,7 млн га в 1996 г. до 180 млн га в 2015 г.), занятых генетически модифицированными сельскохозяйственными культурами, необходима оценка экологических рисков их возможного воздействия на окружающую среду, в частности, на устойчивость почвенной микробной системы.

Почвенные микробные сообщества осуществляют важнейшие биосферные функции, играя роль связующего звена биологического и геологического круговоротов веществ на планете. В силу высокой скорости эволюции микроорганизмы наиболее оперативно реагируют на изменение окружающей среды, поэтому изучение природных микробных сообществ позволяет достаточно быстро оценить влияние изменений окружающей среды на сохранение биологического разнообразия [3]. Особый интерес представляют микроорганизмы ризосферы – той части почвы, которая примыкает непосредственно к поверхности корня растения. С ризосферными микроорганизмами связаны, помимо их участия в круговороте питательных веществ, и другие важные функции, в частности, защита растения от фитопатогенов, антагонистические взаимодействия и фиторегуляторная активность, обеспечивающие, в конечном итоге, продуктивность сельскохозяйственных культур. Из-за сложности структуры и функционирования почвенной системы связями между растительным и микробным её компонентами часто пренебрегают. Одна-

ко в связи с широкомасштабным распространением в агроэкосистемах ГМ культур такие исследования приобретают в последние годы всё большее значение.

В документах, регламентирующих безопасность производства и применения генетически модифицированных растений (ГМР) в производственных посевах, отмечается, что при оценке экологической безопасности необходимо проводить оценку риска поражения нецелевых организмов, в частности, выявлять изменения численности и видового состава ризосферных микроорганизмов [4]. Несмотря на это, влияние ГМР на почвенные и ризосферные микроорганизмы остаётся одним из наименее изученных аспектов [2, 5–8]. Исследование ризосферных микробных комплексов представляет особый интерес, поскольку они играют важную роль не только в связи с процессами роста и развития растения, но и участвуют в поддержании почвенного гомеостаза в целом, обеспечивая реализацию почвой своих экологических функций. Сегодня предпринимаются попытки к выяснению того, существуют ли специфические ответы со стороны ризосферной микрофлоры на различные категории ГМ растений, разработанных на сегодняшний день, с учётом конкретной технологии и использованной генетической конструкции [2].

Получение трансгенных сельскохозяйственных культур с устойчивостью к гербицидам представляет собой радикально новый подход к управлению засорённостью посевов сорняками. Благодаря внедрению ГМ культур стало возможным перейти от дорогостоящих комбинаций гербицидов к использованию одного из средств широкого действия, таких как глифосат и глюфосинат, традиционно считающихся наименее токсичными как для человека, так и для окружающей среды. Кроме того, выращивание устойчивых к гербицидам ГМ культур часто облегчает переход к противоэрозийным методам обработки почвы, предотвращающим деградацию почвенного покрова.

Устойчивые к гербициду раундап (Roundup Ready или сокращённо RR) растения содержат ген энолпирувиллицикатфосфатсинтетазы (EPSP-синтетазы), выделенный из почвенной бактерии *Agrobacterium* sp. CP4. Глифосат ингибирует рост растения, блокируя работу фермента EPSP-синтазы, участвующего в выработке некоторых аминокислот и других веществ. Повышенное в результате экспрессии гетерологичного гена количество

EPSP-синтазы позволяет растению противостоять действию глифосата [9]. RR соя GTS_40-3-2 получила широкое распространение в сельском хозяйстве ряда стран Южной Америки. Широкомасштабное выращивание ГМ культур и использование одного класса гербицидов обусловили пристальный интерес к их экологическим последствиям в агроэкосистемах. В то время, как трансгенные растения при обработке посевов для уничтожения сорняков устойчивы к глифосату, почвенные микроорганизмы оказались чувствительны к нему. Обнаружено [10–12], что применение глифосата задерживает образование клубеньков и азотфиксацию у RR сои, что связывают с ингибированием глифосатом роста бактерии *Bradyrhizobium japonicum*. Исследования показали, что в тканях растений разлагается лишь незначительная часть глифосата, а большая его часть транслочируется в клубеньки, корни и выделяется с корневыми экссудатами. После обработки глифосатом посевов RR сои и кукурузы в штате Миссури (США) увеличилось, по сравнению с нетрансгенными растениями, поражение корней этих растений почвенными грибами родов *Pythium* и *Fusarium* [13–15]. Предполагают, что корневая экскреция глифосата стимулирует в ризосфере прорастание спорангиев грибов.

Экосистемные эффекты трансгенного растения в данном случае можно расценивать как косвенное воздействие, поскольку изменения в микробной системе, а также в устойчивости растений к фитопатогенам, происходили в силу изменения корневой экскреции, которая обеспечивала преимущество отдельным видам фитопатогенов или, наоборот, ингибировала развитие их антагонистов.

Поскольку глифосат способен ингибировать EPSP-синтазу не только в растениях, но и в различных микроорганизмах, высказывались опасения, что его применение может привести к изменениям в составе и разнообразии ризосферных микробных сообществ почв, задействованных в сельском хозяйстве. Сравнение ризосферных сообществ трансгенной и нетрансгенной сои с помощью анализа нуклеотидных последовательностей 16S рРНК показало, что бактериальное разнообразие на корнях RR сои не только не снизилось, но даже стимулировалось после применения глифосата [8]. В посевах трансгенной (BRS245) и нетрансгенной (BRS133) сои в Бразилии на протяжении двух вегетационных периодов (2011–2012 гг.) сравнивали базальное дыхание почвы, содержание углерода микробной

биомассы почвы, количество спор эндомикоризных и прочих грибов, и оценивали бактериальную биомассу в почве с использованием эпифлуоресцентной микроскопии. В почве, где выращивалась трансгенная соя с устойчивостью к имидазолиновому гербициду, было установлено более высокое содержание бактериальной биомассы по сравнению с контролем [16].

В целом, сверхэкспрессия в растениях гена EPSP-синтазы, по данным исследований, проведённых в крупнейших странах-производителях RR сои (Аргентина, Бразилия, Европейский Союз), существенно не влияла на почвенные микроорганизмы и биологическую фиксацию азота. Фактором, достоверно определяющим варьирование этих показателей в почвах, являлось применение глифосата в посевах трансгенных культур [17].

При сравнении данных, полученных в двадцати полевых опытах, заложенных в шести штатах и федеральном округе Бразилии, было сделано заключение, что выращивание трансгенной сои с устойчивостью к гербицидам не оказало никакого влияния на микробную биомассу и 16S РНК-ДГГЭ-профили [18]. Ранее эти же авторы сообщали, что микробные сообщества, связанные с ризосферой трансгенных растений, отличаются от сообществ нетрансформированных растений, но эти изменения были кратковременными [19]. Аналогичные выводы были сделаны в отношении устойчивой к гербициду глюфосинату кукурузы, в ризосфере которой бактериальные сообщества сравнивали с помощью секвенирования гена 16S рРНК [20].

Существует ещё ряд работ, посвящённых изучению влияния устойчивых к гербицидам культур на состав и свойства ризосферных микроорганизмов, в которых эффекты ГМ культур часто проявлялись, но обычно они не перекрывали варьирование, обусловленное «нормальными» источниками вариации [21–23].

Другой группой трансгенных культур, получивших широкое распространение в аграрном производстве многих стран, стали растения Bt-защищённые от насекомых-вредителей. Инсектицидные растения были созданы введением в них гена дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* (Bt). Кроме преимуществ экологического характера, связанных со снижением побочных токсических эффектов и загрязнения пестицидами водных ресурсов, к числу преимуществ Bt-культур относят улучшение состояния здоровья фермеров

в развивающихся странах, обусловленное отказом от распыления на хлопковых полях химических инсектицидов. Однако есть мнение, что устойчивые к насекомым-вредителям ГМ культуры, экспрессирующие Cry-белки, изначально принадлежащие бактериям, могут нанести ущерб каким-либо безвредным или даже полезным почвенным организмам. Vt-токсин попадает в почву преимущественно через корневые выделения и растительные остатки [24, 25], которые утилизируются микроорганизмами в качестве ростового субстрата [26]. Это доказано и иммунологически, и тестированием токсического действия эксудатов на личинках чувствительных насекомых. Скорость деградации и инактивации Vt-токсина зависит от почвенно-климатических условий. Процесс деградации происходит достаточно быстро, но небольшое количество токсина (менее 2%) может сохраняться в почве по окончании вегетационного периода. Vt-токсин связывается с органоминеральными коллоидами и илистыми частицами почвы, что защищает его от биodeградации. Однако при прошествии нескольких лет выращивания Vt-культур аккумуляции токсинов в почве не происходит благодаря активной микробной деградации [27].

Ни лабораторные, ни полевые испытания не выявили летальных или сублетальных эффектов Vt-токсина в отношении почвенной мезофауны: дождевых червей, ногохвосток, клещей, мокриц и нематод. Отмечены, однако, некоторые изменения в общем количестве и популяционной структуре почвенных микроорганизмов [28]. Сообщалось о влиянии Vt-хлопчатника на количественные показатели и разнообразие аборигенных популяций бактерий и микроскопических грибов в почве [29]. В то же время, Vt-защищенные растения кукурузы [30] и риса [31] не оказывали негативного воздействия на бактериальные и грибные сообщества почвы. В микробных комплексах ризосферы Vt-риса были обнаружены отличия от ризосферных сообществ изогенного нетрансгенного риса [32]. Исследования микрoфлоры почвы посредством физиологического профилирования бактериальных и грибных сообществ (community level physiological profiling – CLPP) под Vt-кукурузой выявили значимые различия между трансгенными и нетрансгенными растениями [33].

Vt-защита растений может приводить к побочным биохимическим эффектам у растения-трансформанта, в частности, вызывать увеличение содержания в его органах

гликоалкалоидов и повышать синтез лигнина (на 33–97%) у кукурузы, в результате чего интенсивность микробной биodeградации растительных остатков в почве будет затруднена, а общая метаболическая активность почвы существенно снизится [4]. Кроме того, длительное присутствие в почве неразлагаемых остатков Vt-защищенной кукурузы будет способствовать селекции устойчивых к Vt-токсину форм нецелевых организмов [34]. Поэтому оценка функциональных характеристик почвы, определяющих её плодородие, представляет ещё одну важную задачу при определении регламента выпуска трансгенных растений в агросферу.

В ряде регионов Китая в течение многих лет широко применяется устойчивый к насекомым-вредителям трансгенный хлопчатник SGK321, несущий гены Cry1Ac и CPТI. В двухлетних полевых исследованиях на севере Китая изучали его воздействие на дегидрогеназную, уреазную и фосфатазную активность в ризосферной почве. Показано, что в разные фазы развития растений имелись существенные различия в активности ферментов. Однако метод главных компонент не выявил значимых различий между исходным сортом и трансгенной формой SGK321. Таким образом, по сравнению с межфазной изменчивостью активности дегидрогеназы, уреазы и фосфатазы, трансгенный хлопчатник не оказал заметного влияния на изменение активности этих ферментов в ризосфере [35].

Структуру микробных сообществ в ризосфере Vt-хлопчатника Монсанта NC 33B исследовали в полевых условиях с помощью метода PCR-DGGE. Результаты трёхлетних полевых наблюдений показали, что на количество и таксономическую структуру эубактерий, актиномицетов и грибов в ризосферной почве заметно влияют естественные изменения в окружающей среде, связанные с фазами развития хлопчатника. В то же время, не было обнаружено никаких существенных различий между линией NC 33B и его изогенной нетрансгенной формой [36].

Для сравнения генетической изменчивости в популяциях бактерий, изолированных из ризосферы генетически модифицированной кукурузы MON810, несущей ген cry1Ab, и контрольными растениями проведены исследования образцов ризосферы, собранных в Словакии в течение двух лет. Различий в количестве терминальных рестрикционных фрагментов между контролем и ГМ гибридами кукурузы не обнаружено [37].

Генетическая модификация баклажана, в связи с масштабным поражением этой культуры многими вредными насекомыми, особенно *Leucinoides orbonalis*, не оказала значительного влияния на грибные сообщества ризосферы Bt-защищённых растений, несмотря на имеющиеся различия в численности и характере распределения микромицетов. Изменчивость, связанная с ростом и развитием растений, оказалась более значимой по сравнению с изменчивостью, обусловленной генетической модификацией [38].

Таким образом, многочисленными исследованиями Bt-защищённых культур показано, что корневая экскреция трансгенного белка CryIAc хотя и вызывает определённые сдвиги в количественном и качественном составе, физиологической активности почвенной и ризосферной микрофлоры, но эти изменения нестабильны и пренебрежимо малы по сравнению с изменчивостью, не связанной с наличием в растительном геноме гетерологичной вставки. Размер и структура популяций почвенных микроорганизмов сильно подвержены как сезонным изменениям, так и колебаниям, связанным с типом почвы, фазами развития и генотипами растений. Согласно исследованиям, эффекты генетической модификации растений на почвенные микробные сообщества нестабильны. В разных частях одного и того же поля ризосферные микробные сообщества могут изменяться по-разному и в разной степени, также эти изменения неодинаковы в разные сезоны [39].

Создание растений с повышенной защитой от фитопатогенов стало новой актуальной задачей генной инженерии. При этом предполагается получение устойчивых сортов с изменённой экспрессией собственных защитных генов или же перенесение чужеродных генов из растений и даже фагов [40]. Так, были получены трансгенные растения картофеля, экспрессирующие ген лизоцима фага T4, который обеспечивал устойчивость растений к фитопатогенным энтеробактериям, в частности, *Erwinia carotovora*. Методом флуоресцентной микроскопии было показано, что лизоцим высвобождается из клеток эпидермы и активно участвует в создании жидкой плёнки на поверхности корней ГМ картофеля [41]. Трансгенный картофель, синтезирующий лизоцим бактериофага T4, тщательно проверяли в двух независимых лабораторных и полевых исследованиях на способность поражать ризосферные бактерии *Pseudomonas putida* QC14-3-8 и *Serratia grimesii* L16-3-3.

Разницы в составе и численности популяций ризобактерий трансгенных и контрольных растений не выявлено [42].

Сверхэкспрессия гена MСM6, придающего растениям табака солеустойчивость, не сопровождалась изменениями в микробных популяциях почвы, её ферментативной активности (дегидрогеназ и кислых фосфатаз) или функциональном разнообразии микробного сообщества ризосферной почвы, как при солевом стрессе, так и в обычных условиях [43].

Иногда по поводу ГМ культур высказывают опасения, что они могут оказывать на почвенную микрофлору давление, благодаря продукции в ризосферу специфических соединений, которые создадут селективное преимущество микроорганизмам, способным их утилизировать. Действительно, лядвенец рогатый, продуцирующий низкомолекулярные опины, синтез которых кодируется Ti-плазмидами *Agrobacterium tumefaciens*, оказывал существенное влияние на конкурентные отношения двух ризосферных штаммов *Pseudomonas fluorescens*. Способный катаболизировать опины штамм вытеснял из ризосферы штамм, к этому не способный. Это указывает на то, что трансгенное растение (ТР) может обеспечивать селективное преимущество тем микроорганизмам, которые способны утилизировать продукты, синтез которых вызван трансгенами [44, 45].

Иногда неожиданные эффекты ГМ культур бывают обусловлены явлением плейотропии. Вставка чужеродных генов в геномный контекст может приводить, например, к увеличению или уменьшению содержания продуктов вторичного метаболизма в растении, изменению его химического состава, не связанных напрямую с конкретным введённым геном, но которые могут повлиять, прямо или косвенно, на микробиоту почвы [46, 47].

Итак, за редким исключением, результаты приведённых работ показывают, что трансгенные растения не вызывают изменений ни в микробном разнообразии почвы, ни в физиологической активности микробного сообщества. По этой причине оценка экологических рисков ГМ культур далее сосредоточилась в основном на возможности горизонтального переноса генов (horizontal gene transfer-HGT) [48]. Было высказано предположение, что ризосфера генетически трансформированных растений может изменяться благодаря дрейфу генов от ГМ растений к аборигенным почвенным микроорганизмам [49]. В связи с этим особую озабоченность Всемирной

организации здравоохранения вызывает возможность утечки в окружающую среду генов устойчивости к антибиотикам [50]. Попав в ризосферу растений, они могут передаваться от ризобактерий патогенным видам бактерий, что повлечёт повышение резистентности к антибиотикам возбудителей инфекций человека и животных [51].

Перенос генов от бактерий растениям хорошо известен, многократно описан и используется на практике для получения ТР путём их трансформации Ti-плазмидами *Agrobacterium tumefaciens*. Осуществить обратный перенос ДНК из растений в геном бактерий пока экспериментально не удалось, хотя в природных условиях этот процесс, по-видимому, происходит. Теоретически это возможно, если ДНК, высвободившаяся в почве из остатков ТР, будет способна к трансформации почвенных бактерий, и если бактерии в почве будут, в свою очередь, пребывать в компетентном для трансформации состоянии. Во многих работах показано, что ДНК может находиться в почве в стабильном, способном к трансформации состоянии. Например, при мониторинге физической и биологической деградации ДНК внутри тканей разлагающихся растений ГМ табака прямая визуализация ДНК на агарозном геле указывала на то, что большая часть ДНК остаётся внутри растительных клеток. Вместе с тем, некоторая доля сохранившейся ДНК ГМ растений поступала в почву и, следовательно, была способна к трансформации находящихся в ней бактерий [52]. Изучена стабильность ДНК в листовом опаде трансгенных растений сахарной свёклы, устойчивых к ризомании, и возможность горизонтального переноса ДНК от растений к бактериям. Трансгенные растения несли NPTII и bar гены. Показана длительная сохранность растительной ДНК в почве [4]. В реальных природных условиях почвенные бактерии могут находиться в состоянии компетенции к поглощению чужеродной ДНК в довольно редких случаях. Исследована возможность переноса генов от RR сои к *Bradyrhizobium japonicum* в моделируемых условиях, воспроизводящих реальные условия фермерского хозяйства. Как и следовало ожидать, присутствие трансгенной EPSP-синтазы было обнаружено в тканях клубеньков, тогда как в бактериоидах, которые были выделены из клубеньков, а затем культивировались в течение нескольких пассажей в присутствии высоких концентраций глифосата, ген EPSP-синтазы не был обнаружен. Сделан вывод об отсутствии стабиль-

ной передачи гена EPSP-синтазы в полевых условиях [53].

В другой работе [54] была определена частота возможной трансформации почвенной бактерии *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 ДНК трансгенных растений с геном *nptII*. Бактериальные трансформанты при использовании ДНК трансгенных растений не обнаружены, что предполагает частоту трансформации ниже 10^{-13} трансформантов на реципиент в оптимальных условиях. В условиях почвы, при снижении концентрации ДНК, доступной бактериям, эта частота может снизиться до 10^{-16} . Учитывая данные об ограниченном времени сохранения хромосомной ДНК и невозможности определения детектируемой компетентности клеток *A. calcoaceticus* в почвенных условиях, авторы делают вывод о неопределяемой частоте возможного поглощения растительной ДНК этим почвенным микроорганизмом в естественных условиях [54]. Авторы отмечают, что особый интерес в отношении горизонтального переноса генов представляют бактерии из семейства Rhizobiaceae, потому что природная трансформация растений происходит благодаря Ti-плазмидам из *Agrobacterium* sp., и они могут перемещаться обратно, используя механизмы гомологичной рекомбинации.

Таким образом, в настоящее время прогнозировать вероятность передачи генов от растения в бактериальный геном не представляется возможным, но можно предполагать, что она очень мала [49]. Несмотря на это, масштабы промышленного производства ГМ культур уже делают подобные риски правдоподобными. Переносу генов в условиях природной среды способствует много различных видов векторов, включая вирусы. Разнообразие путей передачи и векторов, а также большое число геномов, которые могли бы служить в качестве временного или постоянного места локализации для трансгенов (или их части), дают основание полагать, что приведённые здесь умозрительные расчёты малой вероятности горизонтального переноса генов весьма консервативны [55]. Известно, что очень редкие события могут иметь самые тяжкие последствия. В данном случае в результате захвата бактериями функциональных трансгенов ТР может произойти повышение конкурентоспособности бактериальных трансформантов и благодаря реализации нового свойства появиться способность к колонизации новых экологических ниш, возникнуть негативные экологические последствия в результате взаимодействия генно-

модифицированных бактерий с организмами-консортиями [4]. Попадание чужеродных генетических конструкций в природные микробные сообщества – так называемый горизонтальный перенос генов – неминуемо приведёт к существенному ускорению эволюции микроорганизмов, появлению новых форм с новыми генетическими признаками.

В связи с этим необходимо разрабатывать новые и совершенствовать имеющиеся подходы и методы для применения в области мониторинга окружающей среды с целью определения масштаба распространения трансгенных организмов. В дополнение к традиционным методам количественного определения микробной биомассы и ферментативной активности почвы, методы, основанные на ДНК-технологиях, принесли значительные успехи в изучении микробной экологии. Среди этих методов важное значение имеет оценка микробного сообщества по данным денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) после профилирования амплифицированных рибосомальных генов при выделении тотальной почвенной ДНК. 16S рРНК-ДГГЭ является эффективным способом диагностирования изменений в ризосфере и может быть применён в исследованиях и мониторинге экологических рисков, связанных с распространением трансгенных культур [56].

Большинство эффектов ГМ культур в агроэкосистемах носят косвенный характер и являются результатом индуцируемых изменений в стратегии межорганизменных взаимодействий, а не следствием прямого влияния специфических черт ГМ растений. Вместе с тем, нельзя сбрасывать со счетов возможность негативного влияния на почвенные микробные сообщества последствий плейотропных эффектов генно-инженерных манипуляций с растительным геномом.

Противоречивые результаты, касающиеся урожайности сельскохозяйственных культур и их воздействия на почвенные микроорганизмы, отчасти связаны с тем, что в исследованиях используются методы с разной разрешающей способностью или, наоборот, одни и те же методы, но в различных экологических контекстах. В целом, существует мало доказательств того, что применение ГМ культур оказывает на агроэкосистемы более сильное влияние, чем сорта, созданные с помощью обычных методов [57].

Имеющиеся на сегодня экспериментальные данные относительно влияния трансгенных растений на различные компоненты

почвенной микробной системы, как правило, упускают из виду естественную изменчивость микробных комплексов, которая возникает среди различных видов и сортов культурных растений. Трансгенное растение, как правило, сравнивается с нетрансгенным, поскольку это находится в соответствии с главным требованием при государственной регистрации ГМ культур – максимальное сходство с исходной изогенной формой, относительно которой существует полная уверенность, что она безопасна [4]. При этом остаётся открытым вопрос о том, превосходят ли выявленные различия тот диапазон, который имеется между обычными сортами?

Для достижения лучшего понимания реального воздействия трансгенных культур на почвенные микроорганизмы как обязательного компонента оценки экологического риска в будущем должна быть разработана эффективная методология его оценки. Новые данные должны быть получены с использованием надлежащим образом разработанных и стандартизированных тестов, методов отбора проб и статистического анализа. Исследования не должны ограничиваться кратковременными лабораторными или вегетационными экспериментами. Необходимы долгосрочные и систематические полевые испытания и наблюдения. Особое внимание следует уделять мониторингу чувствительности ключевых функциональных групп микроорганизмов, имеющих фундаментальное значение для сохранения плодородия почвы, питания растений и реализации почвой своих экосферных функций.

Работа выполнена в рамках НИР «Оценка последствий антропогенного воздействия на природные и трансформированные экосистемы подзоны южной тайги» (номер государственной регистрации 115020310080), включенных в государственное задание ИБ Коми НЦ УрО РАН на 2016 г.

References

1. Clive J. Executive summary brief 51 20 th Anniversary of the Global Commercialization of Biotech Crops (1996 to 2015) and Biotech Crop Highlights in 2015. [Electronic resource] [http:// www.isaaa.org/resources/publications/51/executivesummary/pdf/B51-ExecSum-English.pdf](http://www.isaaa.org/resources/publications/51/executivesummary/pdf/B51-ExecSum-English.pdf)
2. Turrini A., Sbrana C., Giovannetti M. Belowground environmental effects of transgenic crops: a soil microbial perspective // Research in microbiology. 2015. V. 166 (3). P. 121–131.

3. The role of soil in formation and preservation of biological diversity / Eds. G.V. Dobrovolskiy, I.Yu. Chernov. M.: Tovarishestvo nauchnykh issledovaniy KMK, 2011. 275 p. (in Russian). [Роль почвы в формировании и сохранении биологического разнообразия / Под ред. Г.В. Добровольского, И.Ю. Чернова. М.: Товарищество научных исследований КМК, 2011. 275 с.].
4. Velkov V.V., Sokolov M.S., Medvinskiy A.B. Problems of state regulation of production of transgenic plants // Vestnik zashchity rasteniy. 2003. № 3. P. 3–16 (in Russian). [Вельков В.В., Соколов М.С., Медвинский А.Б. Проблемы государственного регулирования производства трансгенных растений // Вестник защиты растений. 2003. № 3. С. 3–16].
5. Bruinsma M., Kowalchuk G.A., van Veen J.A. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil // Biol Fertil Soils. 2003. V. 37. P. 329–337.
6. Filion M. Do transgenic plants affect rhizobacteria populations? // Microb. Biotechnol. 2008. V. 1. P. 463.
7. Ki-Jong Lee, Sung-Dug Oh, Soo-In Sohn, Tae-Hun Ryu, Jong-Sug Park, Jang-Yong Lee, Hyun-Suk Cho Byung-Ohg Ahn The Effects of Genetically Modified Crops on Soil Microbial Community // Korean J Environ Agric. 2012. V. 31. № 2. P. 192–199.
8. Arango L., Buddrus-Schiemann K., Opelt K., Lueders T., Haesler F., Schmid M, Ernst D., Hartmann A. Effects of glyphosate on the bacterial community associated with roots of transgenic Roundup Ready® soybean // European Journal of Soil Biology. 2014. [Electronic resource] <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.05/005>
9. Funke T., Han H., Healy-Fried M.L., Fischer M., Schonbrunn E., Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006. V. 103. P. 13010–13015.
10. King A.C., Purcell L.C., Vories E.D. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to glyphosate applications // Agron. J. 2001. V. 93. P. 179–186.
11. Zablotowicz R.M., Reddy K.N. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview // Journal Environmental Quality. Madison. 2004. V. 33. P. 825–831.
12. Zablotowicz R.M.; Reddy K.N. Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean // Crop Protection. 2007. V. 26. P. 370–376.
13. Meriles J. M., Vargas Gil, S., Haro R. J., March G. J., Guzman C. A. Glyphosate and previous crop residue effect on deleterious and beneficial soil-borne fungi from a peanut–corn–soybean rotations // Journal of phytopathology. 2006. V. 154 (5). P. 309–316.
14. Kremer R.J., Means N.E. Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms // Europ. J. Agron. 2009. V. 31. P. 153–161.
15. Sanogo S., Yang X.B., Scherm H. Effects of herbicides on *Fusarium solani* f. sp. glycines and development of sudden death syndrome in glyphosate-tolerant soybean // Phytopathology. 2000. V. 90. P. 57–66.
16. Vilvert R. M., Aguiar D., Gimenes R. M. T., Alberton O. Residual effect of transgenic soybean in soil microbiota // African Journal of Agricultural Research. 2014. V. 9 (30). P. 2369–2376.
17. Bohm G.M.B., Rombaldi C.V. Transformação genética e aplicação de glifosato na microbiota solo, fixação biológica de nitrogênio, qualidade e segurança d gerãos de soja geneticamente modificada // Ciência Rural. 2010. V. 40. P. 213–221.
18. Dunfield K.E., Germida J.J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities // J. Environ Qual. 2004. V. 38. P. 806–815.
19. Dunfield K.E., Germida J.J. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with eldgrown genetically modified canola (*Brassica napus*) // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 7310–7318.
20. Kowalchuk G.A., Bruinsma M., van Veen J.A. Assessing responses of soil microorganisms to GM plants // Trends Ecol Evol. 2003. V. 18. P. 403–410.
21. Gyamfi S., Pfeifer U., Stierschneider M., Sessitsch A. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere // FEMS Microbiol Ecol. 2002. V. 41. P. 181–190.
22. Bruinsma M., Kowalchuk G.A., van Veen J.A. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil // Biol Fertil Soils. 2003. V. 37. P. 329–337.
23. Yong-Eok Lee, Sun Hwa Lee, Gil-Do Ryu, Hong-Gyu Kang, Yong-Ik Kwon, Hyeon-Jin Sun, Kee Woong Park, Bumkyu Lee, In-Ja Song, Pyung-Ok Lim, Hyo-Yeon Lee. Investigation into effects of transgenic glufosinate-resistant *Zoysia grasses* with herbicide application on bacterial communities under field conditions // Journal of Plant Biology. 2015. V. 58. № 5. P. 303.
24. Saxena D., Flores S., Stotzky G. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn // Nature. 1999. V. 402. P. 480.
25. Saxena D., Stotzky G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ // FEMS Microbiol Ecol. 2000. V. 33. P. 35.
26. Baumgarte S., Tebbe C. C. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere // Molecular Ecology. 2005. V. 14. P. 2539–2551.
27. Valldor P., Miethling-Graff R., Martens R., Tebbe C.C. Fate of the insecticidal Cry1Ab protein of GM crops in two agricultural soils as revealed by 14C-tracer studies // Applied Microbiology and Biotechnology. 2015. V. 99. Is. 17. P. 7333–7341.
28. Saxena D., Stotzky G. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil // Soil Biol. Biochem. 2001. V. 33. P. 1225–1230.
29. Donegan K.K., Palm C.J., Fieland V.J., Porteous L.A., Ganis L.M., Scheller, D.L., Seidler R.J. Changes in levels, species, and DNA fingerprints of soil micro-organisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* is var. Kurstaki endotoxin // Appl. Soil Ecol. 1995. № 2. P. 111–124.

30. Wei L., Hao H.L., Weixiang W., Qi K.W., Ying X.C., Janice E.T., Devare M.H., Jones C.M., Thies J.E. Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community: biomass, activity and diversity // *J. Environ Qual.* 2004. V. 33. P. 837–843.
31. Liu W., Lu H.H., Wu W.X., Wei Q.K., Chen Y.X., Thies J.E. Transgenic Bt rice does not affect enzyme activities and microbial composition in the rhizosphere during crop development // *Soil Biol. Biochem.* 2008. V. 40. P. 475–486.
32. Wu W.X., Ye Q.F., Min H. Effect of straws from Bt-transgenic rice on selected biological activities in water-flooded soil // *Eur. J. Soil Biol.* 2004. V. 40. P. 15–22.
33. Blackwood C.B., Buyer J.S. Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils // *J. Environ. Qual.* 2004. V. 33. P. 832–836.
34. Saxena D., Stotzky G. Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn // *American Journal of Botany.* 2001. V. 88. P. 1704–1706.
35. Zhang Y.J., Xie M., Li C.Y., Wu G., Peng D.L. Impacts of the transgenic CryIAC and CpTI insect-resistant cotton SGK321 on selected soil enzyme activities in the rhizosphere // *Plant Soil Environ.* 2014. V. 60. № 9. P. 401–406.
36. Zhang Y.J., Xie M., Wu G., Peng D.L., Yu W.-B. A 3-year field investigation of impacts of Monsanto's transgenic Bt-cotton NC 33B on rhizosphere microbial communities in northern China // *Applied Soil Ecology.* 2015. V. 89. P. 18–24.
37. Ondřejčková R., Daniel Mihálik D., Andrej Ficek A., Martina Hudcovicová M., Kraic J., Drahovská H. Impact of genetically modified maize on the genetic diversity of rhizosphere bacteria: a two-year study in Slovakia // *Polish Journal of Ecology.* 2014. V. 62. Is. 1. P. 67–76.
38. Singh A.K., Singh M., Dubey, S.K. Rhizospheric fungal community structure of a *Bt* brinjal and a near isogenic variety // *Journal of Applied Microbiology.* 2014. V. 117. P. 750–765.
39. Conner A.J., Glare T.R., Nap J. The release of genetically modified crops into the environment // *The Plant J.* 2003. V. 33. Part 1. P. 19–46.
40. Clausen M., Kräuten R., Schachermayr G., Potrykus I., Sautter C. Antifungal activity of a virally encoded gene in transgenic wheat // *Nature Biotech.* 2000. V. 18. P. 446–449.
41. Heuer H., Kroppenstedt R. M., Lottmann J., Berg G., Smalla K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors // *Applied and Environmental Microbiology.* 2002. V. 68 (3). P. 1325–1335.
42. Lottmann J., Heuer H., Vries J., Mahn A., Düring K., Wackernagel W., Smalla K., Berg G. Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community // *FEMS Microbiology Ecology.* 2000. V. 33. P. 41–49.
43. Chaudhry V., Dang H.Q., Tran N.Q., Mishra A., Chauhan P.S., Gill S.S., Nautiyal C.S., Tuteja N. Impact of salinity-tolerant MCM6 transgenic tobacco on soil enzymatic activities and the functional diversity of rhizosphere microbial communities // *Res. Microbiol.* 2012. V. 163. P. 511–517.
44. Oger P., Mansouri H., Dessaux Y. Effect of crop rotation and soil cover on the alteration of the soil microflora generated by the culture of transgenic plants producing opines // *Mol. Ecol.* 2000. V. 9. P. 881–890.
45. Mondy S., Lenglet A., Beury-Cirou A., Libanga C., Ratet P., Faure D., Dessaux Y. An increasing opine carbon bias in artificial exudation systems and genetically modified plant rhizospheres leads to an increasing reshaping of bacterial populations // *Molecular Ecology.* 2014. P. 4846–4861.
46. Finn R.D., Jones C.G. Secondary metabolism and the risks of GMOs // *Nature.* 1999. V. 400. P. 14–50.
47. Poerschmann J., Gathmann A., Augustin J., Langer U., Gorecki T. Molecular composition of leaves and stems of genetically modified Bt and near-isogenic non-Bt Maize – characterization of lignin patterns // *J. Environ Qual.* 2005. V. 34. P. 1508–1518.
48. Nielsen K.M., van Elsas J.D., Smalla K. Dynamics, horizontal transfer and selection of novel DNA in bacterial populations in the phytosphere of transgenic plants // *Annals of Microbiology.* 2001. V. 51. P. 79–94.
49. Lynch J.M., Benedetti A., Insam H., Nuti M.P., Smalla K., Torsvik V., Nannipieri P. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms // *Biol. Fert. Soils.* 2004. V. 40. P. 363–385.
50. WHO. Health aspects of markers genes in genetically modified plants. Workshop Report. Copenhagen, Denmark: WHO; 21–24 September 1993.
51. Cytryn E. The soil resistome: the anthropogenic, the native, and the unknown // *Soil Biol. Biochem.* 2013. V. 63. P. 18–23.
52. Ceccherini M.T., Poté J., Kay E., Van V.T., Maréchal J., Pietramellara G., Nannipieri P., Vogel T.M., Simonet P. Degradation and transformability of DNA from transgenic leaves // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69 P. 673–678.
53. Wagner T., Arango Isaza L.M., Grundmann S., Dörfler U., Schroll R., Schloter M., Hartmann A., Sander mann H., Ernst D. The probability of a horizontal gene transfer from roundup Ready® soybean to root symbiotic bacteria: a risk assessment study on the GSF lysimeter station // *Water Air Soil Pollut: Focus.* 2008. V. 8. P. 155.
54. de Vries J., Wackernagel W. Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 2002. V. 99. P. 2094–2099.
55. Heinemann J.A., Traavik T. Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants // *Nature Biotechnology.* 2004. V. 22. P. 1105–1109.
56. Ki-Jong Lee, Sung-Dug Oh, Soo-In Sohn, Tae-Hun Ryu, Jong-Sug Park, Jang-Yong Lee, Hyun-Suk Cho Byung-Ohg Ahn The Effects of Genetically Modified Crops on Soil Microbial Community // *Korean J. Environ. Agric.* 2012. V. 31. № 2. P. 192–199.
57. Kolseth A.K., D'Hertefeldt T., Emmerich M., Forabosco F., Marklund S., Cheeke T. E., Hallin S., Weih M. Influence of genetically modified organisms on agro-ecosystem processes // *Agriculture, Ecosystems & Environment.* 2015. V. 214. P. 96–106.