

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**СЕЛЕКЦИЯ И ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ-
ДЕСТРУКТОРОВ ГЕРБИЦИДА ИМАЗЕТАПИРА ИЗ РИЗОСФЕРЫ
СОИ (*Glycine max* (L.) Merr)**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Харьковой Валентины Анатольевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

дата, подпись

Е. С. Тучина

Научный консультант:

вед. н. с. ИБФРМ РАН,

док. биол. наук

дата, подпись

А. Ю. Муратова

Заведующий кафедрой:

профессор, док. биол. наук

дата, подпись

С. А. Степанов

Саратов 2021

Введение. Современное сельское хозяйство невозможно без применения пестицидов, от которых напрямую зависит качество, объемы и цена сельхозпродукции. Поток абиогенных соединений в окружающую среду с каждым годом возрастает [1]. Пестицидные загрязнения – это значительный риск для всех биологических объектов окружающей среды, начиная с почвенных микроорганизмов, насекомых, растений, рыб, заканчивая птицами и млекопитающими, вследствие накопления остаточных количеств в сельскохозяйственных продуктах и питьевой воде.

В этой связи выделение и изучение микроорганизмов – деструкторов поллютантов и разработка на их основе приемов снижения остаточного загрязнения окружающей среды всевозможными пестицидами является актуальной задачей современности.

Целью работы являлось выделение стимулирующих рост растений штаммов микроорганизмов-деструкторов имазетапира – гербицида группы имидазолинонов.

Для достижения указанной цели были определены следующие задачи:

1. Выделение из образцов почвы ризосферы сои (*Glycine max* (L.) Merr), загрязненной имазетапиром, чистых культур микроорганизмов, способных расти в присутствии гербицида.
2. Проверка способности к деградации имазетапира у выделенных штаммов.
3. Анализ выделенных штаммов – деструкторов на наличие свойств стимулирующих рост растений ризобактерий.
4. Исследование способности микроорганизма-деструктора имазетапира к деградации субстратов близких по структуре гербициду.
5. Идентификация штамма-деструктора имазетапира.

Исследования проводились в 2020-2021 году в лаборатории экологической биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и

микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН) под руководством в.н.с. д.б.н. А. Ю. Муратовой.

Для эксперимента была подготовлена в лабораторных условиях почва, загрязненная имазетапиром. В работе использовали препарат «Виадук» в концентрации (10%) – на основе гербицида имазетапира. Из препарата «Виадук» приготовили водный раствор, который внесли в почву. Затем в загрязненную почву высевали семена сои. Растение выращивали при естественном освещении при температуре 25°C. Рост сои поддерживали периодическим поливом отстоянной водопроводной водой в течение полугода.

Для выделения микроорганизмов-деструкторов были отобраны почвенные образцы (1г), из которых готовили водные суспензии. Десятикратные разведения образцов почвы высевали на поверхность плотной минеральной среды MSM, содержащей имазетапир (50 мг/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. Отдельные колонии, отличающиеся друг от друга по морфологическим признакам, принимали за колонии различных микроорганизмов и отсевали в чистые культуры на плотную среду MSM с имазетапиром.

Для исследования способности к деградации имазетапира у выделенных штаммов культивировали микроорганизмы в жидкой минеральной среде MSM, содержащей в качестве единственного источника углерода чистое вещество имазетапир. Посев микроорганизмов в среду проводили до получения начальной плотности микробной суспензии 0,07 ед. опт.пл., измеренной при 440 нм. В качестве контроля использовали среду с имазетапиром без бактерий. Культивирование проводили 14 сут. при 30 °С.

По окончании эксперимента оценивали рост штаммов, измеряя оптическую плотность микробной суспензии. Содержание имазетапира в жидкой среде после культивирования микроорганизмов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Для изучения возможности деградации соединений близких по химической структуре исследуемому гербициду и, возможно, являющимися промежуточными микробными метаболитами этого вещества, оценивали способность штамма IMZT 9 к росту на субстратах, содержащих пиридиновое кольцо. В качестве контролей использовали вариант среды MSM, содержащей глюкозу и сукцинат натрия. По окончании эксперимента оценивали рост штамма IMZT 9.

Способность штамма IMZT 9 подвергать деградации пиридинсодержащие гомологи имазетапира исследовали в жидкой среде MSM, содержащей различные концентрации исследуемых соединений. В эксперименте исследовали микробную деградацию никотиновой, гидроксиникотиновой и пиридиндикарбоновой кислот используемых в концентрациях 0,05; 0,1 и 0,2 г/л. В качестве контроля использовали среду с этими субстратами без бактерий. Культивирование проводили 14 сут. при 30 °С.

По окончании культивирования оценивали рост штамма IMZT 9, измеряя оптическую плотность микробной суспензии. Содержание пиридинсодержащих соединений в жидкой среде после культивирования микроорганизма определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Потенциал к стимуляции роста растений у выделенных штаммов-деструкторов имазетапира оценивали по проявлению таких свойств как фиксация атмосферного азота, растворение фосфатов кальция, синтез сидерофоров и фитогормона индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). Для выявления способности к *фиксации атмосферного азота* использовали безазотистую среду Федорова [58]. Способность к *растворению фосфатов* изучали по образованию зон растворения фосфатов кальция вокруг колоний на среде Муромцева [59]. *Синтез сидерофоров* определяли по образованию окрашенных зон вокруг колоний на агаре, содержащий краситель хром азурол S [60, 61]. Для изучения *синтеза ИУК* использовали среду SMN [62].

По окончании культивирования в среде определяли концентрацию ИУК методом ВЭЖХ.

Таксономическую принадлежность выделенного штамма IMZT 9 определяли на основании изучения его культурально - морфологических и физиолого-биохимических признаков с использованием различных тестов [63]. Описание культурально - морфологических признаков, определение грам - принадлежности, кислотоустойчивости, образования спор проводили, как описано в [64]. Были проведены тесты для определения следующих физиолого-биохимических свойств микроорганизма.

Все эксперименты ставили не менее чем в трехкратной повторности. Статистическую обработку полученных данных проводили, вычисляя средние значения, для которых рассчитывали стандартные отклонения (\pm SD) при $P \leq 0,05$. Для расчётов использовали программное обеспечение Microsoft Excel 2019.

Бакалаврская работа состоит из введения, 3 глав основной части (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы написан на основе анализа 65 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: химическая структура и физические свойства имидазолинонов, биохимическое действие имидазолинонов, токсикология имидазолинонов, микробная деградация имазетапира и других имидазолинонов, селекция микроорганизмов – деструкторов.

Основное содержание работы. Как показали полученные результаты, среди изученных изолятов штаммы IMZT 9, IMZT 17, IMZT 21 и IMZT 23 характеризовались наиболее заметным ростом в среде при культивировании с имазетапиром в качестве единственного источника углерода и энергии.

В таблице 1 представлены результаты анализа деструктивной активности выделенных штаммов по отношению к имазетапиру, присутствующего в среде в двух концентрациях – 20 и 50 мг/л.

Таблица 1 – Деграция имазетапира выделенными штаммами микроорганизмов за 14 сут. культивирования в жидкой минеральной среде

Шифр штамма	Концентрация имазетапира в среде	
	20 мг/л	50 мг/л
IMZT 1	0	0
IMZT 2	0	0
IMZT 3	51,1 ± 3,3	0
IMZT 4	5,6 ± 2,5	9,6 ± 2,7
IMZT 5	6,7 ± 4,5	3,0 ± 0,9
IMZT 6	0	0
IMZT 7	0	0
IMZT 8	18,0 ± 7,8	14,3 ± 7,8
IMZT 9	2,0 ± 1,8	17,0 ± 3,3
IMZT 10	0	0
IMZT 11	21,0 ± 2,7	0
IMZT 12	0	0
IMZT 13	2,7 ± 2,2	20,4 ± 4,7
IMZT 14	0	0
IMZT 15	21,6 ± 5,7	0
IMZT 16	9,1 ± 6,2	54,9 ± 3,1
IMZT 17	0	4,8 ± 2,5
IMZT 18	8,4 ± 4,6	12,4 ± 2,1
IMZT 19	0	0
IMZT 20	0	0
IMZT 21	17,1 ± 1,8	6,9 ± 0,62
IMZT 22	0	0
IMZT 23	5,8 ± 0,8	0

Примечание. В таблице приведены средние значения деструктивной активности исследованных штаммов ($n \geq 3$), погрешность которых оценивали с помощью стандартного отклонения ($\pm SD$), рассчитанного при $P \leq 0,05$.

Из представленных данных видно, что штаммы IMZT 3, IMZT 15, IMZT 8, IMZT 21, и IMZT 11 успешно разрушали имазетапир в концентрации 20 мг/л на 51,1; 21,6; 18,0; 17,1 и 21,0% соответственно. Максимальная деструктивная активность отмечалась для штаммов IMZT 3 и IMZT 15 (51,1 и 21,6%). При более высокой концентрации в среде гербицид либо не разрушался этими микроорганизмами (IMZT 3, IMZT 15, IMZT 11), либо

деградировал менее активно (IMZT 21). Вероятно, для указанных штаммов более высокая концентрация гербицида была токсична.

Напротив, деструктивная активность штаммов IMZT 8, IMZT 9, IMZT 13, IMZT 16 и IMZT 18 увеличивалась с увеличением концентрации пестицида в среде, достигая 14,3; 17,0; 20,4; 54,9 и 12,4%. Максимальная активность по отношению к имазетапиру в концентрации 50 мг/л отмечалась для штаммов IMZT 13 и IMZT 16 (20,4 и 54,9%). В целом, наилучшую деструктивную активность в отношении имазетапира, присутствующего в двух концентрациях, проявляли штаммы IMZT 8, IMZT 16 и IMZT 18 (12,4-54,9%).

Все эксперименты ставили не менее чем в трехкратной повторности. Статистическую обработку полученных данных проводили, вычисляя средние значения, для которых рассчитывали стандартные отклонения (\pm SD) при $P \leq 0,05$. Для расчётов использовали программное обеспечение Microsoft Excel 2019.

Результаты исследования стимулирующего рост растений потенциала у выделенных микроорганизмов представлены в таблице 2.

В результате анализа было установлено, что к продукции ИУК способны только штаммы IMZT 18 и IMZT 21. Способность к фиксации азота на безазотистой среде проявляли штаммы IMZT 3, IMZT 10, IMZT 12, IMZT 15 и IMZT 19. К растворению фосфатов проявляли штаммы IMZT 3 и IMZT 16. Способность к синтезу сидерофоров проявляли штаммы IMZT 1, IMZT 2, IMZT 4, IMZT 6, IMZT 9, IMZT 11, IMZT 18, IMZT 19, IMZT 21 и IMZT 22.

Таблица 2 – Стимулирующий рост растений потенциал у выделенных штаммов-деструкторов имазетапира

Шифр штамма	Азотфиксация	Солубилизация фосфатов	Синтез сидерофоров	Продукция ИУК (мкг/мл)
IMZT 1	–	–	+	0
IMZT 2	–	–	+	0
IMZT 3	+	+	–	0
IMZT 4	–	–	+	0
IMZT 5	–	–	–	0
IMZT 6	–	–	+	0
IMZT 7	–	–	–	0
IMZT 8	–	–	–	0
IMZT 9	–	–	+	0
IMZT 10	+	–	–	0
IMZT 11	–	–	+	0
IMZT 12	+	–	–	0
IMZT 14	–	–	–	0
IMZT 15	+	–	–	0
IMZT 16	–	+	–	0
IMZT 17	–	–	–	0
IMZT 18	–	–	+	0,93
IMZT 19	+	–	+	0
IMZT 20	–	–	–	0
IMZT 21	–	–	+	3,7
IMZT 22	–	–	+	0
IMZT 23	–	–	–	0

На основании исследования способности к деградации имазетапира у выделенных штаммов был отобран штамм IMZT 9, у которого определяли способность использовать для роста пиридинсодержащие субстраты. После культивирования хороший рост штамма IMZT 9 наблюдается на средах с глюкозой, с сукцинатом натрия и с IMZT. Рост на никотиновой кислоте и ее производных был слабее, но все же присутствовал. На основании представленных данных можно заключить, что указанные соединения могут быть использованы в качестве ко-субстратов в экспериментах по деградации имазетапира.

Исследование способности подвергать деструкции пиридинсодержащие гомологи имазетапира на примере штамма IMZT 9 показало, что наилучшему разрушению подвергалась никотиновая кислота (50-95%), разрушались слабее 2-гидрокси-никотиновая (13-33%) и 2,3-пиридиндикарбоновая кислоты (0-1,5%) в зависимости от концентрации в среде (0,05; 0,1 или 0,2 г/л).

На основании изучения культурально-морфологических, физиолого-биохимических и генетических признаков выделенного штамма-деструктора имазетапира была установлена его предварительная идентификация.

Исследование культурально-морфологических признаков

На мясо-пептонном агаре через неделю культивирования образует округлые мелкие, 1 мм в диаметре, розовые глянцевые колонии, мажущейся консистенции. В мазке, окрашенном по Грамму, культура представлена грамположительными неправильными палочками, располагающимися попарно или одиночно, капсула отсутствует. Так как мазок был приготовлен с 24-х часовой агаровой культуры, можно предположить, что эта первая стадия морфогенетического цикла развития *Rhodococcus spp.* Рост в полужидком агаре локализуется строго в верхней части на поверхности среды, что говорит о том, что для данной культуры оптимальными являются аэробные условия.

Были проведены тесты для определения следующих физиолого-биохимических свойств микроорганизма (таблица 3).

Таблица 3 – Физиолого-биохимические свойства штамма IMZT 9

Признак	Наличие	Примечания
Кислотоустойчивость	–	Вегетативные клетки обесцвечиваются серной кислотой и окрашиваются в синий цвет
Окраска по Грамму	+	Грамположительные
Рост на МПБ	+	Рост культуры в виде пленки
при 2,5 % NaCl	+	
при 6,5 % NaCl	–	Отсутствует
при 55 °C NaCl	–	Отсутствует
Подвижность (ср. Пешкова)	–	Рост ровно по уколу
Пигменты: пиоцианин	–	Голубое окрашивание среды отсутствует
флуоресцин	–	Флюоресценция колоний в УФ – свете отсутствует
Производство каталазы	+	Образование пузырьков газа
оксидазы	–	Пурпурная окраска отсутствует
желатиназы	–	Разжижение желатиновой среды в пробирке отсутствует
крахмал	–	Вокруг выросшей культуры не образуется прозрачная зона
нитратредуктаза	+	Появление красного окрашивания свидетельствует о наличии NO ₂ – ионов
фенилаланиндезаминаза	–	Интенсивное зеленое окрашивание отсутствует
аммиак	+	Посинение розовой лакмусовой бумажки
индол	–	Отсутствие розовой окраски
сероводород	+	Бумажка почернела, вследствие образования сернистого свинца
Среда Симмонса (цитрат)	–	Окрашивание среды в синий цвет не произошло

Генетическая характеристика

Была проведена предварительная идентификация штамма IMZT 9 на основе анализа полноразмерного гена 16S рРНК. Для этого было проведено секвенирование и сравнение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с известными типовыми штаммами.

На основании изучения культурально-морфологических, физиолого-биохимических, а также генетических признаков, штамм-деструктор имазетапира IMZT 9 был идентифицирован как *Rhodococcus* sp.

Заключение. Имидазолиноны легко усваиваются через корни и листья растений и быстро транслоцируются по ксилеме и флоэме в меристему, где и накапливаются. Их действие направлено на медленное уничтожение растения путем ингибирования ацетолактатсинтазы, которая локализуется в растительных меристематических тканях [19]. Наряду с остатками пестицидов, в почве обнаруживаются и их персистентные метаболиты, что дополняет перечень эколого-токсикологических проблем, связанных с использованием ядохимикатов.

Одним из перспективных направлений экологической биотехнологии является выделение и изучение микроорганизмов – деструкторов поллютантов и разработка на их основе приемов снижения остаточного загрязнения окружающей среды всевозможными пестицидами. Данная работа посвящена выделению штаммов микроорганизмов – деструкторов имазетапира – гербицида группы имидазолинонов, одновременно проявляющих свойства стимулирующих рост растений ризобактерий.

По результатам проведенного исследования можно заключить, что среди 23 изученных изолятов многие штаммы характеризовались заметным ростом в среде с имазетапиром в качестве единственного источника углерода и энергии и успешно разрушали гербицид. Из исследованных штаммов микроорганизмов 13 были способны в той или иной степени подвергать деградации имазетапир (на 2 – 55%). Наилучшую деструктивную активность в отношении исследуемого гербицида, присутствующего в среде в

концентрациях 20 и 50 мг/л, проявляли штаммы IMZT 8, IMZT 16 и IMZT 18. Среди исследованных изолятов 15 проявляли, по крайней мере, один из признаков, характерных для стимулирующих рост растений ризобактерий. По совокупности полученных данных можно заключить, что штаммы IMZT 3 и IMZT 21, проявляющие деструктивную активность к гербициду и стимулирующий рост растений потенциал, могут быть перспективны для дальнейших исследований, которые будут включать в себя анализ метаболических путей деградации гербицида; вегетационные опыты с использованием культурных растений и приемов бактеризации исследуемыми микроорганизмами; микрополевые опыты по восстановлению загрязненных имазетапиром почв.

Выводы:

1. Из образцов загрязненной имазетапиром почвы было выделено 23 штамма микроорганизмов, способных расти на среде, содержащей гербицид в качестве единственного источника углерода и энергии.

2. Деструктивная активность была выявлена у 12 изолятов. За 14 сут. культивирования штаммы IMZT 3 и IMZT 15 способны были разрушать гербицид в концентрации 20 мг/л на 51,1 и 21,6%; штаммы IMZT 13 и IMZT 16 разрушали имазетапир в концентрации 50 мг/л на 20,4 и 54,9 %. Наилучшую деструктивную активность в отношении имазетапира, присутствующего в указанных концентрациях, проявляли изоляты IMZT 8, IMZT 16 и IMZT 18 (12,4 -54,9%).

3. Исследование стимулирующего рост растений потенциала выделенных микроорганизмов показало, что лишь два изолята (IMZT 18 и IMZT 21) были способны к продукции ИУК; пять проявляли способность к фиксации азота (IMZT 3, IMZT 10, IMZT 12, IMZT 15 и IMZT 19); к растворению фосфатов проявляли способность два штамма (IMZT 3 и IMZT 16), а десять - к синтезу сидерофоров.

4. Исследование способности подвергать деструкции пиридинсодержащие гомологи имазетапира на примере штамма IMZT 9

показало, что наилучшему разрушению подвергалась никотиновая кислота (50-95%), разрушались слабее 2-гидроксиникотиновая (13-33%) и 2,3-пиридиндикарбоновая кислоты (0-1,5%) в зависимости от концентрации в среде (0,05; 0,1 или 0,2 г/л).

5. На основании изучения культурально-морфологических, физиолого-биохимических, а также молекулярно-генетических признаков (анализ последовательностей гена 16S рРНК) штамм-деструктор имазетапира IMZT 9 был идентифицирован как *Rhodococcus* sp.