

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

Кафедра биохимии и биофизики

**СКРИНИНГ ГАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ  
ШТАММОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОУДОБРЕНИЙ  
(УЛУЧШАЮЩИХ МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ РАСТЕНИЙ,  
СТИМУЛИРУЮЩИХ РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ, А ТАКЖЕ  
УСТОЙЧИВЫХ К РАЗЛИЧНЫМ СТРЕССАМ)**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы  
Направление подготовки магистратуры 06.04.01 Биология  
Биологического факультета  
Яковлевой Елены Александровны

Научный руководитель:  
Доцент кафедры биохимии  
и биофизики, к.б.н., доц.



Ю.П.Федоненко

Зав.кафедрой биохимии и  
биофизики д.б.н., проф.



С.А. Коннова

## **Введение**

**Актуальность работы.** В последнее время большое внимание уделяется выделению и изучению бактерий, способствующих росту и развитию растений, поскольку они являются достойной альтернативой пестицидам и минеральным удобрениям. Так же они могут обеспечивать защиту растений от абиотических стрессов. Механизмы, посредством которых бактерии осуществляют эти процессы разнообразны и сложны и зависят от множества факторов. Несмотря на это использование биопрепаратов на основе рост-стимулирующих бактерий в сельском хозяйстве неуклонно возрастает. Особое место занимают экстремофильные микробы, в том числе и галофилы. Для настоящего исследования были отобраны изоляты галофильных и галотолерантных бактерий, для которых исследовался ряд рост-стимулирующих свойств.

### **Цели и задачи исследования.**

Целью настоящего исследования является скрининг коллекции галофильных бактерий для выявления наиболее перспективных штаммов, подходящих для создания биоудобрений.

Для достижения цели работы были поставлены и решались следующие задачи:

- выявить способность бактерий фиксировать атмосферный азот;
- определить продукцию гормонов ауксинового ряда;
- проанализировать солубилизирующую активность в отношении нерастворимых фосфатов;
- провести исследование устойчивости микроорганизмов к солям тяжелых металлов;
- определить способность к продукции сидерофоров;
- определить способность бактерий использовать нефть в качестве единственного источника углерода и энергии.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования являлись изоляты грамотрицательных и грамположительных галофильных и

галотолерантных бактерий, выделенные из образцов соли соленых озер Карун (Египет) и Эльтон (Россия). Культивирование и хранение чистых культуры бактерий осуществляли на ГРМ-бульоне; анализ способности бактерий к азотфиксации и продукции ИУК осуществляли с использованием среды Муромцева; способность бактерий мобилизовать неорганические фосфаты оценивали при культивировании бактерий на минеральной среде «National Botanical Research Institutes phosphate growth medium»; нефть-деструктивную активность исследовали в жидкой среде Бушнела-Хааса, а устойчивость к катионам тяжелых металлов – в жидкой среде S-G. Азотфиксирующую активность бактерий оценивали по способности роста на плотной и полужидкой безазотистых средах. Продукцию бактериями ИУК в среду культивирования детектировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Фосфат-солубилизацию бактериальными культурами определяли по методу Чирикова. При исследовании нефть-деструктивной активности бактерии культивировали на минеральной среде, содержащей нефть в качестве единственного источника углерода и энергии. Остаточные количества нефти оценивали гравиметрически после ее экстракции из среды культивирования органическими растворителями. Фракционный анализ нефти осуществляли колоночной хроматографией на активированном  $Al_2O_3$ . Толерантность бактерий к солям тяжелых металлов определяли по значению минимальных ингибирующих концентраций. Для скрининга микроорганизмов на способность секретировать сидерофоры из всех штаммов были отобраны шесть, показавшие положительные результаты по предыдущим исследованиям и являющиеся наиболее перспективными. Скрининг проводили на CAS агаре. Оценивали наличие зоны просветления и ее диаметр вокруг лунки на агаре.

Все измерения проводили не менее чем в трехкратной биологической и аналитической повторностях. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Excel пакета Microsoft Office. Все

результаты приведены в виде среднего и среднеквадратичного отклонения для уровня значимости  $p=0,05$ .

**Структура и объем работы.** Работа изложена на 56 страницах, включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, заключение и список использованных источников. Работа проиллюстрирована пятью рисунками и четырьмя таблицами. Список использованных источников включает в себя 76 наименований.

### **Основное содержание работы**

В литературном обзоре представлен анализ литературных данных о различных рост-стимулирующих свойствах микроорганизмов и механизмы их реализации.

В разделе «Результаты исследований» представлены экспериментально полученные данные о возможности исследуемых бактерий фиксировать атмосферный азот, продуцировать фитогормоны ауксинового ряда, солюбилизировать нерастворимые фосфаты, данные о способности к деструкции сырой нефти, устойчивости к катионам тяжелых металлов и способности продуцировать сидерофоры.

Главными критериями при выборе конкретных бактериальных культур для запланированных исследований являлась их способность расти при различных условиях засоленности среды и продуцировать экстраклеточные полисахариды, поскольку именно их наличие может служить показателем их устойчивости к различным стрессам. Кроме того, нам представлялось оптимальным присутствие среди выбранных штаммов представителей как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, причем всех четырех экологических групп.

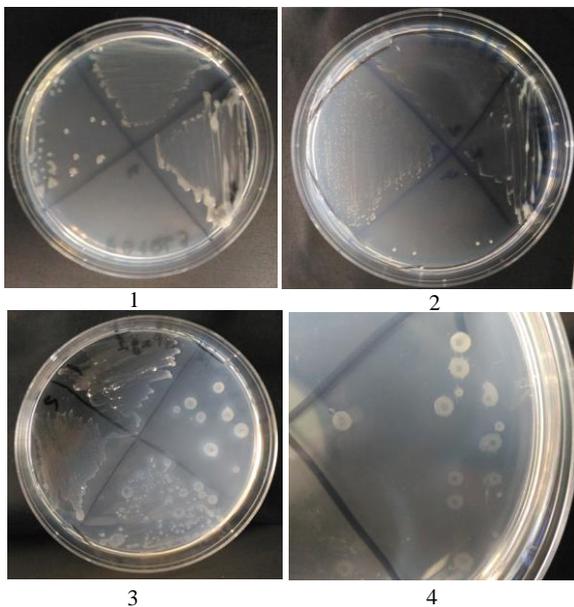
Разделение на экологические группы произведено по способности микроорганизмов обитать в средах с различными концентрациями хлорида натрия: слабые (2-5% NaCl), умеренные (5-15% NaCl), экстремальные (15-32%) и пограничные экстремальные галофилы (>15% NaCl). В результате среди отобранных штаммов преобладающей группой являлись слабые и

умеренные галлофилы представители семейств Bacillaceae (EG1QL30, EGP5QL12, RU2EL4, EG1HP4QL) и Halomonadaceae (RU5S2EL). Из группы экстремальных и пограничных экстремальным галлофилов отобрано всего два штамма, относящихся к семействам Halobacteriaceae (EG3QL57) и Halomonadaceae (EG1QL3). В группе исследуемых микроорганизмов преобладали грамотрицательные бактерии (двенадцать из шестнадцати).

Определение азотфиксирующих свойств у бактериальных культур осуществляли с использованием двух методических подходов, а именно культивированием на твердой и полужидкой питательных средах Муромцева, не содержащих источники азота. Оценивали способность к росту, морфологические особенности колоний, формирование распространяющейся популяционной волны (визуально имеющую форму кольца, так называемого «кольца роения»).

Для представителя группы экстремальных галлофилов *Ht. saccharovorans* EG3QL57, штамма EG24S8QL из группы умеренных галофилов и штамма EG30S8QL (изоляты, для которых не проведена видовая идентификация), относящегося к слабым галлофилам, не было выявлено способности фиксировать атмосферный азот.

Остальные тринадцать исследуемых штаммов бактерий (четыре грамположительных и девять грамотрицательных) демонстрировали рост на безазотистой среде (рисунок 1), причем два из них EG18S7QL и *H. ventosae* RU5S2EL не образовывали колоний на твердой среде, но росли на полужидкой. Очевидно, что их нитрогеназный комплекс более чувствителен к кислороду. Следует отметить, что большинство микробных культур (тринадцать из шестнадцати) образовывали четко выраженные кольца, причем отличающиеся между собой визуально. По форме образующиеся кольца роения разделялись на конусовидные, двояковогнутые и дискоидальные.



1 – *C. salexigens* EG1QL3; 2 – *H. caseinilytica* EG33S7QL;  
 3 – *B. subtilis* EGP5QL12; 4 – *B. licheniformis* EG1QL30  
 Рисунок 1 – Исследование азотфиксирующих свойств галофильных бактерий при культивировании на плотной среде Муромцева

Наблюдаемые отличия по форме колец роста, образуемых исследуемыми штаммами, очевидно, также объясняются различной чувствительностью нитрогеназного комплекса бактерий к кислороду. Одни из них более устойчивы к кислороду и могут расти в области, граничащей с воздухом, в то время как другие мигрируют в более глубокие слои плотной среды

культивирования, где его содержание минимально либо отсутствует.

Выявление у бактерий способности к продукции ИУК проводили на жидкой среде Муромцева с добавлением L-триптофана. Накопительную суточную культуру пересекали в жидкую минеральную среду до конечного значения оптической плотности 0,2 при  $\lambda=600$  нм. Культивирование осуществляли в течение трех суток. После отделения клеток центрифугированием в культуральной жидкости определяли содержание ИУК методом ВЭЖХ.

В ходе проведения анализа продукция ИУК была выявлена только у трех из анализируемых штаммов, относящихся к группе слабых галофилов (*H. caseinilytica* EG33S7QL, *H. ventosae* RU5S2EL, *H. dabanensis* EG1HP4QL). Ее содержание составило от 0,15 до 0,19 мкг/мл. Следует отметить, что продукция фитогормонов является одним из характеристических признаков, позволяющих отнести бактерии к группе стимулирующих рост и развитие растений. Причем очень часто для отнесения бактерий к этой группе достаточно проявления ими не всей совокупности подобных признаков, а нескольких или даже одного.

Очень важной для функционирования растительно-бактериальной ассоциации является способность бактерий солубилизовать

труднорастворимые соединения, в состав которых входят необходимые для роста и развития растений микро- и макроэлементы. Исследование фосфат-солюбилизующей активности проводили на минеральной среде с добавлением слаборастворимого фосфата кальция. *H. ventosae* RU5S2EL, *C. salexigens* EG1QL3, *H. caseinilytica* EG33S7QL не демонстрировали рост на данной среде, из чего можно сделать вывод, что у них отсутствуют механизмы превращения нерастворимых фосфатов в биодоступные формы. Для двенадцати штаммов средняя кратность превышения концентрации фосфатов в культуральной жидкости по сравнению с контрольной средой (без бактерий) составила от 0,4 до 2,8 раз. Наибольшая активность была отмечена для EG30S8QL (средняя кратность превышения концентрации фосфатов в культуральной жидкости оказалась больше в 2,5 раза) и EG24S8QL (средняя кратность превышения концентрации фосфатов в культуральной жидкости оказалась больше в 2,8 раза).

Поскольку уровень загрязненности окружающей среды, в том числе и нефтепродуктами, неизменно растет, проблема очистки загрязненных территорий с использованием «зеленых» технологий сохраняет свою актуальность. Из шестнадцати исследуемых штаммов при культивировании на жидкой среде Бушнела-Хааса, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии сырую нефть (1%), наибольшую способность к ее деструкции проявили семь изолятов: *H. caseinilytica* EG33S7QL (~70%), *C. salexigens* EG1QL3; *B. subtilis* EGP5QL12, *H. dabanensis* EG1HP4QL (~32-35%); *B. licheniformis* EG1QL30, *H. ventosae* RU5S2EL, *Ht. saccharovorans* EG3QL57 (~23-28%). Для всех штаммов показана способность к эмульгированию нефти во время роста, за исключением штамма *C. salexigens* EG1QL3, характеризующегося способностью к ее коагуляции. При микроскопическом исследовании бактериальных культур после двенадцати суток культивирования в присутствии нефти было показано, что клетки большинства штаммов накапливаются как на поверхности, так и внутри капель нефти (рисунок 2). При фракционном

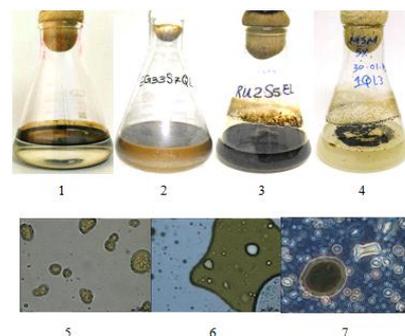
анализе была показана существенная убыль следующих компонентов нефти: парафинов, нафтенов, МБЦА, ПАУ и смол.

Наибольший процент деградации нефти отмечен для *H. caseinilytica* EG33S7QL, *C. salexigens* EG1QL3, *B. subtilis* EGP5QL12, *H. dabanensis* EG1HP4QL. При культивировании *H. caseinilytica* EG33S7QL убыль всех фракция была примерно равномерной (от 58 до 74 % в разных фракциях). *C. salexigens* EG1QL3 был наиболее активен в отношении нафтен (убыль составила 70%). *B. subtilis* EGP5QL12 наибольшую окисляющую

активность проявлял в отношении фракции смол (убыль составила 70%), а *H. dabanensis* EG1HP4QL характеризовался приблизительно одинаковой активностью в отношении нафтен, моно- и бициклические ароматические углеводороды и полиароматические углеводороды.

Загрязнение различных территорий нефтепродуктами очень часто сопровождается сопутствующим загрязнением солями тяжелых металлов. Для эффективного использования бактериальных препаратов для очистки подобных территорий следует отдавать предпочтение бактериям устойчивым к подобному рода токсикантам. Мы тестировали исследуемые штамма на устойчивость к катионам Cd(II), Cu(II), Ni(II), Pb(II) и Zn(II). В качестве критерия толерантности к загрязнителю мы использовали значение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) – это концентрации тяжелых металлов в среде культивирования, при которых не наблюдается видимый рост микроорганизмов.

Следует отметить, что большинство исследуемых нами штаммов проявляли достаточно высокую устойчивость к солям тяжелых металлов (таблица 1). Исключение составил *H. ventosae* RU5S2EL, который оказался



1 – контроль; 2, 5 – *H. caseinilytica* EG33S7QL; 3, 6 – *H. ventosae* RU5S2EL; 4, 7 – *C. salexigens* EG1QL3

Рисунок 2 – Деструкция сырой нефти бактериями при культивировании в жидкой среде Бушнела-Хааса (1-4 – колбы с культурами микроорганизмов после 12 суток культивирования; 5-7 – микроскопическое исследование деградации нефти культурами галофильных микроорганизмов)

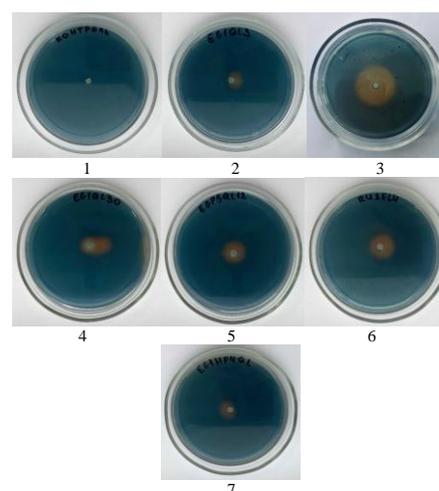
неустойчив к действию на него катионов кадмия, свинца и цинка. Отдельно стоит отметить высокую устойчивость *Ht. saccharovorans* EG3QL57 ко всем исследуемым ионам тяжелых металлов. Для *Ht. saccharovorans* EG3QL57 МИК цинка составила 1,5 мМ, а кадмия и свинца 7,0 мМ. Тогда как другие штаммы были в несколько раз менее устойчивы к кадмию и свинцу. МИК катионов меди был наиболее высоким для *B. subtilis* EGP5QL12 (10мМ) и *B. halotolerans* RU2EL4 (7мМ). К никелю, свинцу и цинку все штаммы имели примерно одинаковую устойчивость.

Таблица 1 – Минимальные ингибирующие концентрации тяжелых металлов по отношению к исследуемым микроорганизмам

Штаммы	МИК катионов тяжелых металлов, мМ				
	Cd(II)	Cu(II)	Ni(II)	Pb(II)	Zn(II)
EG33S7QL	2,5	5,0	5,0	2,5	2,0
RU5S2EL	0,2	2,5	2,5	0,5	2,5
EG1QL3	3,0	3,0	3,0	3,0	1,5
EG1QL30	1,0	5,0	5,0	2,0	2,5
EGP5QL12	0,2	10,0	5,0	2,5	1,0
RU2EL4	0,5	7,0	3,0	1,5	1,0
EG1HP4QL	3,0	5,0	3,0	3,0	1,5
EG3QL57	7,0	3,0	5,0	7,0	1,5

Для скрининга микроорганизмов на способность секретировать сидерофоры из всех представленных ранее штаммов были отобраны 6 штаммов, показавшие положительные результаты по предыдущим исследованиям и являющиеся наиболее перспективными.

Скрининг проводили на CAS агаре. Накопительную культуру сеяли в специально подготовленные лунки на



1 – контроль; 2 – *C. Saalexigens*; 3 – *H. caseinilytica*  
4 - *B. Licheniformis*; 5 - *B. Subtilis*; 6 - *B. Halotolerans*;  
7 - *H. dabanensis*.

Рисунок 3 – Исследование продукции сидерофоров на CAS агаре

плотной питательной среде в чашках Петри. Культивирование проводили 21 день. Оценивали наличие зоны просветления и ее диаметр вокруг лунки на агаре.

Все исследуемые штаммы при росте на CAS агаре демонстрировали способность к продукции сидерофоров, но различались по активности. Наиболее активными продуцентами сидерофоров были *C. salexigens* и *H. caseinilytica*, в то время как *B. licheniformis*, *B. subtilis* и *B. halotolerans* демонстрировали активность в 3-4 раза ниже. Наименее активным являлся штамм *H. dabanensis*, для которого была отмечена самая низкая способность к росту на аналитической среде.

### **Выводы**

1. Проведено исследование наличия рост-стимулирующей активности у шестнадцати изолятов галофильных и галотолерантных бактерий соленых озер Карун (Египет) и Эльтон (Россия).
2. Выявлена способность к азотфиксации у тринадцати штаммов (*C. salexigens* EG1QL3, *B. licheniformis* EG1QL30, EG18S7QL, *B. subtilis* EGP5QL12, EG9S8QL, EG27S8QL, EG6S8QL, *H. ventosae* RU2EL4, *H. caseinilytica* EG33S7QL, EG26S8QL, EG19S7QL, *H. ventosae* RU5S2EL, EG1HP4QL) и продукции ИУК у трех штаммов (*H. caseinilytica* EG33S7QL, *B. licheniformis* RU5S2EL, *H. dabanensis* EG1HP4QL).
3. Способность к фосфат-солубилизации была идентифицирована для двенадцати штаммов (EG24S8QL, *B. licheniformis* EG1QL30, EG18S7QL, *B. subtilis* EGP5QL12, EG9S8QL, EG27S8QL, EG6S8QL, *H. ventosae* RU2EL4, EG30S8QL, EG26S8QL, EG19S7QL, *H. dabanensis* EG1HP4QL).
4. Среди исследуемых штаммов *H. caseinilytica* EG33S7QL *C. salexigens* EG1QL3; *B. subtilis* EGP5QL12, *H. dabanensis* EG1HP4QL, *B. licheniformis* EG1QL30, *H. ventosae* RU5S2EL, *Ht. saccharovorans* EG3QL57 характеризовались способностью к деструкции нефти, а *H. caseinilytica* EG33S7QL, *H. ventosae* RU5S2EL, *C. salexigens* EG1QL3, *B. licheniformis* EG1QL30, *B. subtilis* EGP5QL12, *B. haloterans* RU2EL4, *H. dabanensis*

EG1HP4QL, *Ht. Saccharovorans* EG3QL57 – устойчивостью к катионам тяжелых металлов.

5. Все исследуемые штаммы при росте на CAS агаре демонстрировали способность к продукции сидерофоров, но различались по активности. Наиболее активными продуцентами сидерофоров были *C. salexigens* и *H. caseinilytica*, в то время как *B. licheniformis*, *B. subtilis* и *B. halotolerans* демонстрировали активность в 3-4 раза ниже. Наименее активным являлся штамм *H. dabanensis*, для которого была отмечена самая низкая способность к росту на аналитической среде.

