

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

Кафедра биохимии и биофизики

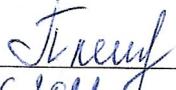
Выделение из корневой зоны *Miscanthus* × *giganteus* ризобактерий,  
проявляющих устойчивость к тяжелым металлам и стимулирующий  
рост растений потенциал

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 2 курса 241 группы  
направления 06.04.01 Биология  
Биологического факультета  
Зеленовой Надежды Алексеевны

Научный руководитель:

профессор кафедры биохимии  
и биофизики, доцент, док. биол. наук

  
07.06.2022 г. Е.В. Плешакова

Научный консультант:

заведующая лабораторией экологической биотехнологии  
ИБФРМ РАН, доцент, док. биол. наук

  
07.06.2022 г. А.Ю. Муратова

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,  
профессор, док. биол. наук,

  
07.06.2022 г. С.А. Коннова

Саратов 2022

**Введение.** Выделение устойчивых к поллютантам штаммов микроорганизмов, образующих с растениями симбиотические отношения, может послужить основой для разработки биопрепаратов, обеспечивающих рост фиторемедиантных растений и очистку загрязненной почвы. Экссудаты корней растений питательны для почвенных микроорганизмов, с которыми они образуют сложную взаимосвязанную систему. Некоторые полезные бактерии и грибы, способствующие росту растений (PGPR), могут снижать фитотоксичность металлов и уменьшать рост растений косвенно за счет индукции защитных механизмов против фитопатогена и/или непосредственно через солиubilization труднорастворимых соединений фосфора и кальция, производство веществ, способствующих росту растений и секрецию специфических ферментов. PGPR могут также изменять биодоступность металлов в почве посредством различных механизмов, таких как подкисление, осаждение, хелатирование, комплексообразование и окислительно-восстановительные реакции.

*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu – биоэнергетический вид растений, биомасса которого используется для производства биотоплива. В то же время *Miscanthus × giganteus* является эффективным фиторемедиантом почв, загрязненных тяжелыми металлами (ТМ) [1]. Возможность выращивания этого растения на загрязненных почвах и использование его биомассы для производства биотоплива делает это растение весьма перспективным в хозяйственной деятельности.

Цель настоящей работы: характеристика устойчивости к тяжелым металлам и стимулирующего рост растений потенциала у микроорганизмов, изолированных из корневой зоны растений *Miscanthus × giganteus*, выращенных в загрязненной тяжелыми металлами почве. Для выполнения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Выделение чистых культур микроорганизмов, проявляющих устойчивость к ТМ.

2. Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и максимальной толерантной концентрации (МТК) металлов для выделенных микроорганизмов.

3. Определение стимулирующих рост растений (PGPR) свойств у выделенных микроорганизмов.

4. Отбор штаммов, устойчивых к ТМ и проявляющих PGPR свойства как перспективных для дальнейшего применения в фиторемедиационных исследованиях.

5. Определение культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков штаммов ризобактерий, выделенных из корневой зоны *Miscanthus × giganteus*.

Растения *M. × giganteus* выращивали на искусственно загрязненной тяжелыми металлами ( $Zn^{2+}$  и  $Pb^{2+}$  в концентрации 15 ПДК) почве в контролируемых условиях лабораторного вегетационного опыта в течение 6 мес. По окончании эксперимента асептически отбирали образцы корней с оставшейся на них после обтряхивания ризосферной почвой для последующего микробиологического анализа. Получение изолятов ризосферных микроорганизмов осуществляли с использованием метода Коха. Оценку устойчивости выделенных ризобактерий к присутствию в среде ионов тяжелых металлов проводили по росту на твердой и в жидкой среде LB, содержащей возрастающие концентрации металлов: 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0 ммоль/л.

Для изучения у выделенных штаммов свойств, способствующих росту растений, использовали среду SMN [2]. Синтез индолилуксусной кислоты (ИУК) изучали на среде с триптофаном по методу S2/1 [3]. Способность к азотфиксации оценивали на среде Федорова [4]. Способность к растворению фосфатов изучали на среде Муромцева [5]. Синтез сидерофоров определяли по образованию окрашенных зон вокруг колоний на агаре, содержащем краситель хром азурол S [6].

Изучали физиолого-биохимические признаки микроорганизмов [7].

Магистерская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 98 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 67 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 8 рисунками и 5 таблицами.

**Научная новизна и значимость работы.** Выделенные нами штаммы могут служить объектом дальнейшего исследования и основой для разработки биопрепаратов. Для повышения эффективности фиторемедиации, чтобы получить максимальную производительность от существующих технологий на основе микробов и растений важно найти подходящую растительно-микробную комбинацию, реализующую эти процессы. Создание таких ассоциаций растений и микроорганизмов, устойчивых к повышенному содержанию тяжелых металлов в почве и осуществляющих ее очистку, может служить задачей дальнейших исследований.

**Основное содержание работы.** В результате проведенной работы было получено 20 изолятов ризобактерий, отличных друг от друга по морфологическим признакам, которые были подробно исследованы на устойчивость к металлам и стимулирующий рост растений потенциал. Для всех исследованных штаммов ризобактерий определяли значения МИК и МТК. Согласно полученным данным, из 20 изолятов от 80 до 90% были устойчивы к минимальной использованной концентрации металлов (0,2 ммоль/л), а от 70 до 80% изолятов проявляли устойчивость к 0,5 ммоль/л металлов. Различия в металлоустойчивости исследуемых штаммов наблюдались при использовании более высоких концентраций ТМ. Так, при концентрации 1,5 ммоль/л 45% изолятов проявляли устойчивость к  $Zn^{2+}$ , 35% – к  $Ni^{2+}$  и лишь 10% – к  $Cu^{2+}$ . Максимальная устойчивость к никелю наблюдалась у 25% изолятов при использовании ТМ в концентрациях 2,5 и 3,0 ммоль/л. Устойчивость к цинку, взятому в тех же концентрациях (2,5 и 3,0 ммоль/л), демонстрировали 20 и 10% изолятов соответственно.

Максимальную устойчивость к меди, используемой в концентрации 2,0 ммоль/л, демонстрировал лишь один штамм (или 10%) из созданной коллекции. Ни один из изолятов не проявлял устойчивости к исследуемым двухвалентным металлам, присутствующим в среде в концентрациях 4,0 и 5,0 ммоль/л. В таблице 1 приведена характеристика устойчивости для каждого исследованного ризосферного изолята.

Таблица 1 – МИК и МТК металлов для устойчивых к  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  ризобактерий, выделенных из ризосферы *M. × giganteus*

Шифр штамма	МТК			МИК			Шифр штамма	МТК			МИК		
	Zn	Ni	Cu	Zn	Ni	Cu		Zn	Ni	Cu	Zn	Ni	Cu
1a	1,5	3	0,5	2	4	1	2d	1,5	1	≤ 0,2	2	1,5	0,2
2a	3	3	0,5	4	4	1	21d	1,5	2	0,5	2	3	1
22a	2,5	3	0,5	3	4	1	1e	1	1	≤ 0,2	1,5	1,5	0,2
1b	1,5	0,5	2	2	1	2,5	3g	0,5	1	0,5	1	1,5	1
11b	1	0,5	1,5	1,5	1	2	2c	1	1	0,5	1,5	1,5	1
3b	1,5	1,5	0,5	2	2	1	31g	≤ 0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5
31b	-	1,5	0,5	-	2	1	1m	1	1,5	0,5	1,5	2	1
1c	3	3	0,5	4	4	1	3m	≤ 0,2	1	0,2	0,2	1,5	0,5
11c	2,5	3	0,5	3	4	1	31m	≤ 0,2	0,5	0,2	0,2	1	0,5
12c	1	1	0,5	1,5	1,5	1	1z	≤ 0,2	0,2	0,5	0,2	0,5	1

Как видно из представленных данных, максимальную устойчивость к  $Zn^{2+}$  проявляли штаммы 2a и 1c (к 3 ммоль/л), и 22a и 11c (к 2,5 ммоль/л). Штаммы 1a, 2a, 22a, 1c и 11c демонстрировали максимальную устойчивость к  $Ni^{2+}$  (3 ммоль/л), а штамм 1b являлся наиболее устойчивым к  $Cu^{2+}$  – его рост прекращался при концентрации меди в среде более 2 ммоль/л.

По совокупности результатов проведенного анализа было отобрано 4 штамма, проявляющих наибольшую устойчивость к исследуемым ТМ – 2a, 22a, 1c и 11c. Для этих штаммов, было проведено дополнительное исследование устойчивости к ТМ в условиях культивирования микроорганизмов в жидкой среде. Влияние различных концентраций ТМ на рост исследуемых ризобактерий в среде LB отражено на графиках (рисунки 1-3).

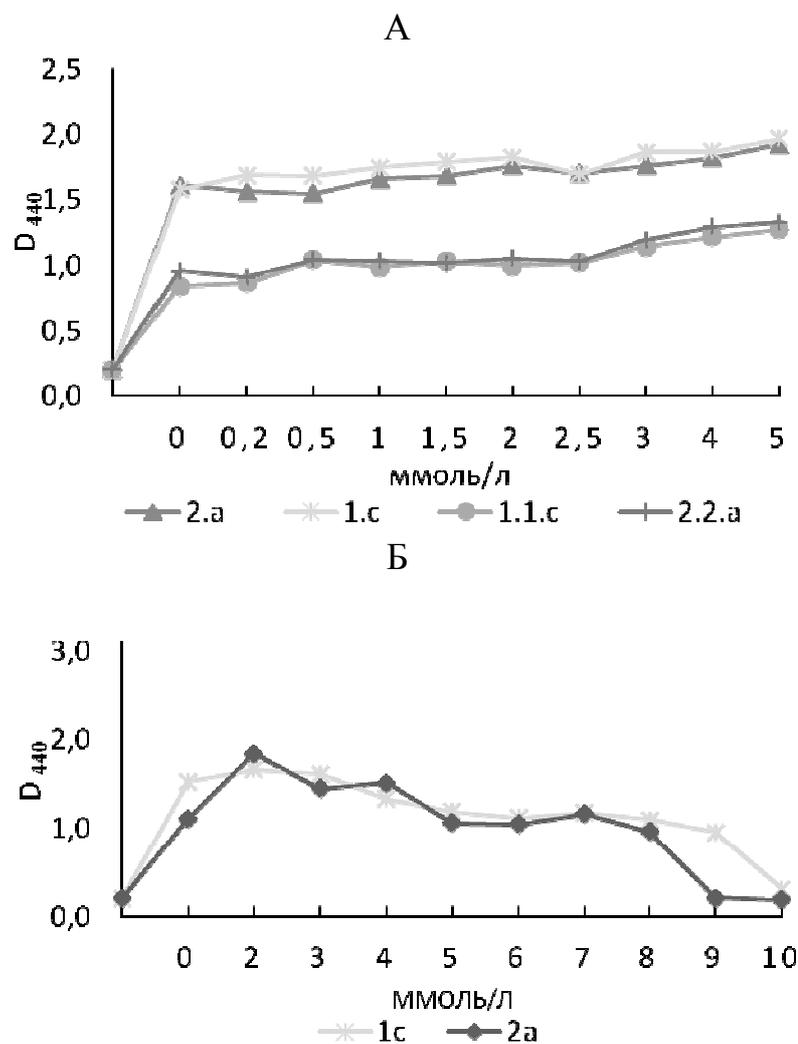


Рисунок 1 – Влияние  $Zn^{2+}$  на рост выделенных из ризосферы *M. x giganteus* микроорганизмов, культивируемых в жидкой среде LB

Как видно на рисунке 1, рост исследованных микроорганизмов не ингибировался цинком даже в максимальной исследованной концентрации – 5 ммоль/л (рисунок 1А), поэтому концентрационный ряд тестируемого металла был расширен до 10 ммоль/л (рисунок 1Б). Согласно полученным данным, для штамма 1с значение МИК цинка составило 10 ммоль/л, а для штамма 2а – 9 ммоль/л. Влияние никеля на рост отобранных штаммов ризобактерий представлено на рисунке 2.

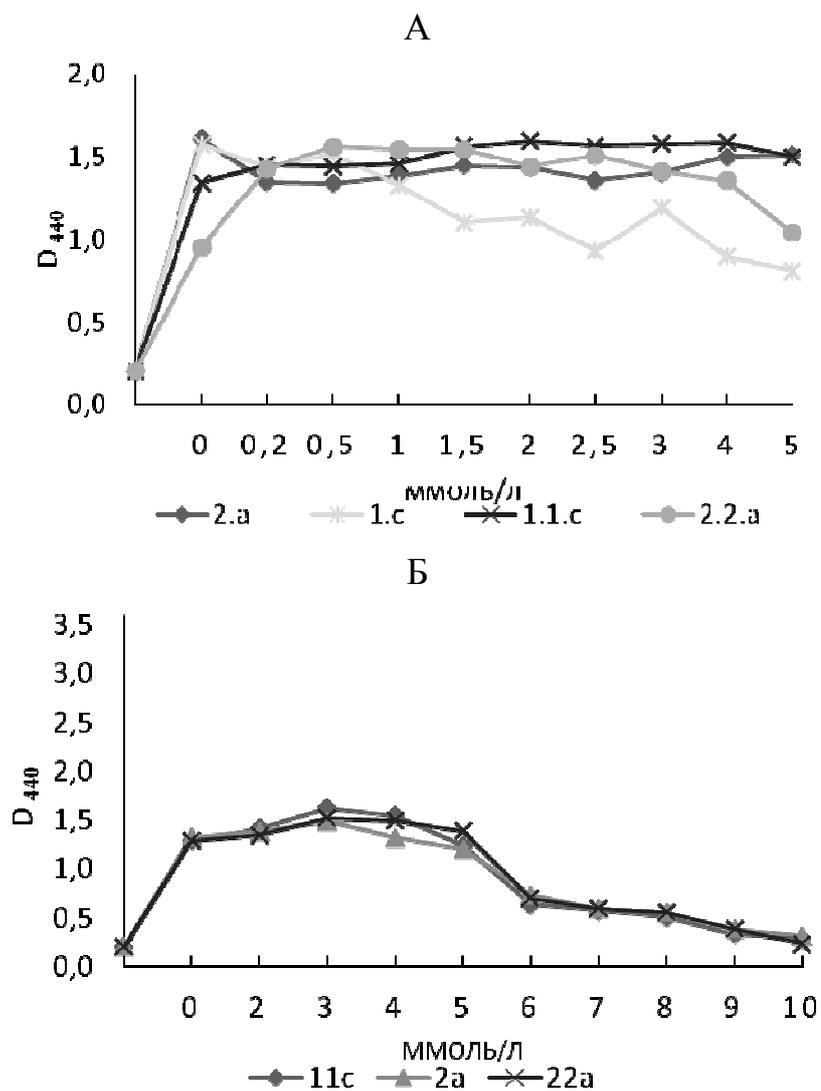


Рисунок 2 – Влияние  $Ni^{2+}$  на рост выделенных из ризосферы *M. x giganteus* микроорганизмов, культивируемых в жидкой среде LB

Также как и в случае с цинком, в первом опыте исследуемые штаммы демонстрировали рост при всех выбранных концентрациях никеля, включая максимальную (5 ммоль/л) (рисунок 2А). Расширение концентрационного ряда никеля позволило обнаружить МИК для штаммов 11с, 2а и 22а, которая составила 6 ммоль/л (рисунок 2Б). Влияние меди на рост отобранных ризосферных штаммов отражено на рисунке 3.

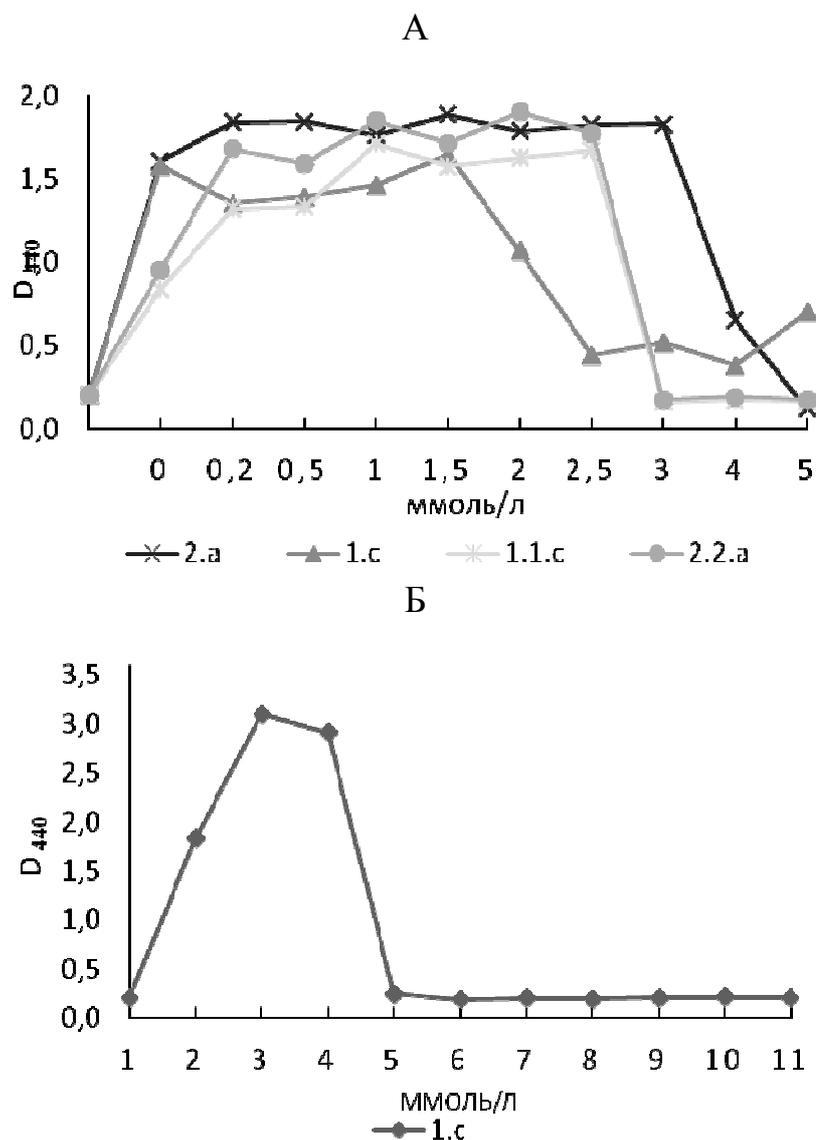


Рисунок 3 – Влияние  $\text{Cu}^{2+}$  на рост выделенных из ризосферы *M. x giganteus* микроорганизмов, культивируемых в жидкой среде LB

Были определены значения МИК меди для четырех исследованных штаммов ризобактерий. Для 1с этот показатель составил 2 ммоль/л, для 11с – 2,5 ммоль/л, для 2а – 4 ммоль/л, для 22а – 3 ммоль/л. Особый интерес вызвала кривая роста штамма 1с, которая демонстрировала ингибирование роста микроорганизма при концентрации 2 ммоль/л, а при концентрации 5 ммоль/л – повторное увеличение. Но при расширении концентрационного ряда меди данный эффект не был подтвержден, МИК составила 5 ммоль/л (рисунок 3Б).

У всех выделенных штаммов исследовались признаки, характерные для стимулирующих рост растений ризобактерий. Согласно полученным результатам, из 20 исследованных штаммов ризобактерий, выделенных из корневой зоны *M. x giganteus*, 9 оказались способными ассимилировать атмосферный азот (45%); 4 штамма оказались способны растворять фосфаты (20%); способность к продукции сидерофоров была выявлена у 5 штаммов (25%); а образование индольных производных было обнаружено у 9 штаммов (45%). Отобранные на предыдущем этапе штаммы 1с, 11с, 2а и 22а проявляли способность к азотфиксации и продукции фитогормона ИУК.

Согласно полученным в результате идентификационных тестов данным, штаммы 1с, 11с, 2а и 22а характеризовались одинаковыми морфологическими свойствами и представляли собой мелкие грамположительные палочки (рисунок 4).

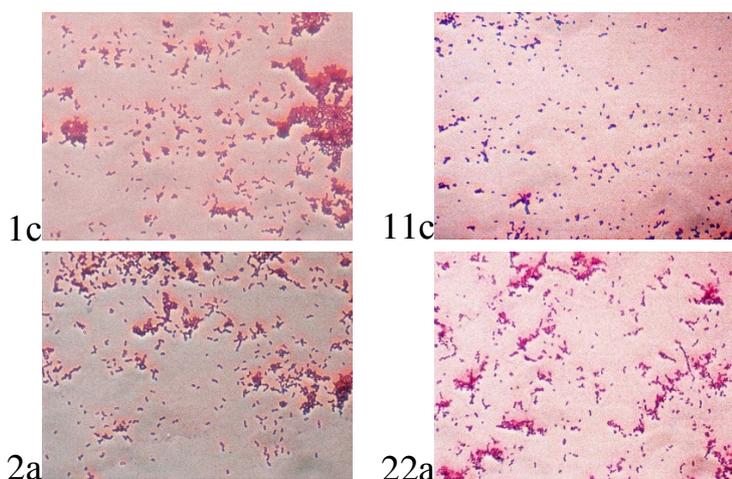


Рисунок 4 – Окраска исследуемых штаммов по Граму

Следует отметить, что все четыре штамма показали одинаковые морфологические признаки. Результаты исследования физиолого-биохимических признаков отобранных штаммов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки штаммов ризобактерий, выделенных из корневой зоны *M. × giganteus*

Признак	1с	11с	2а	22а
Форма клеток	палочки	палочки	палочки	палочки
Размер клеток, мкм	0,7 × 1,5	0,7 × 1,5	0,7 × 1,5	0,7 × 1,5
Образование спор	+	+	+	+
Окраска по Граму	Гр+	Гр+	Гр+	Гр+
Рост на агаризованной питательной среде	хороший рост по штриху на 1 сут			
Рост на МПБ				
при 45°C	-	-	-	-
при 2,5% NaCl	-	-	-	-
при 6,5% NaCl	-	-	-	-
при 45°C	-	-	-	-
Азотофиксация (ср. Эшби)	-	-	-	-
Подвижность (ср. Пешкова)	-	-	-	-
Пигменты				
Пиоцианин (Кинг А)	-	-	-	-
Флуоресцин (Кинг В)	-	-	-	-
Продукция				
каталазы	+	+	+	+
оксидазы	-	-	-	-
уреазы	+	+	+	+
лецитиназы (желт. агар)	-	-	-	-
липазы (желт. агар)	-	-	-	-
желатиназы	-	-	-	-
крахмал	-	-	-	-
нитратредуктаза	+	+	+	+
орнитиндекарбоксилаза	-	-	-	-
аргининдезаминаза	-	-	-	-
лизиндекарбоксилаза	-	-	-	-
фенилаланиндезаминаза	-	-	-	-
аммиак	+	+	+	+
индол	-	-	-	-
сероводород	-	-	-	-
Утилизация цитрата (среда Симмонса)	+	+	+	+
Реакция Фогес-Проскауэра	-	-	-	-
OF-тест:				
глюкоза	-	-	-	-
арабиноза	-	-	-	-
ксилоза	-	-	-	-
мальтоза	-	-	-	-
сахароза	-	-	-	-
лактоза	-	-	-	-
фруктоза	-	+-	+-	+-
маннит	-	+-	+-	+-
сорбит	-	-	-	-
инозит	-	-	-	-
дульцит	-	-	-	-
галактоза	-	+	+	+
манноза	-	+-	+-	+-
рамноза	-	-	-	-

Примечания: -- отсутствие признака; +- – признак слабо выражен; + – наличие признака.

Идентификация выделенных ризобактерий на основании полученных данных о физиолого-биохимических и культурально-морфологических признаках с использованием усовершенствованного программного обеспечения для идентификации бактерий (Advanced Bacterial Identification Softwar; ABIS online; [https://www.tgw1916.net/bacteria\\_logare\\_desktop.html](https://www.tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html); [8]) выявила 85,4% сходство исследуемых изолятов с видом *Lysinibacillus sphaericus*. Филогенетический анализ, основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, также позволил отнести все исследованные штаммы к роду *Lysinibacillus*.

**Заключение.** Таким образом, на основании полифазного подхода (т.е. по совокупности изучения культурально-морфологических, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических признаков) выделенные из корневой зоны *M. × giganteus* ризобактерии с лабораторными шифрами 1с, 11с, 2а и 22а были идентифицированы как *Lysinibacillus sphaericus* [9] и занесены в коллекцию ризосферных микроорганизмов ИБФРАМ РАН (г. Саратов).

**Выводы.** 1. Из корневой зоны *M. × giganteus*, выращенного в загрязненной тяжелыми металлами почве, выделены ризосферные микроорганизмы и создана коллекция из 20 штаммов.

2. Обнаружено, что выделенные ризобактерии оказались наиболее устойчивы к воздействию  $\text{Ni}^{2+}$  – у штаммов 2а, 22а и 11с МИК составила 9 ммоль/л и к воздействию  $\text{Zn}^{2+}$  – у штаммов 2а и 1с МИК составила 9 и 10 ммоль/л соответственно. Меньшую устойчивость ризобактерии проявили к воздействию  $\text{Cu}^{2+}$ , у большинства микроорганизмов наблюдалось ингибирование роста при концентрации 0,5 ммоль/л, МИК наиболее устойчивых к  $\text{Cu}^{2+}$  штаммов 11b и 1b составила 2 и 2,5 ммоль/л соответственно.

3. Установлено, что у исследованных ризосферных микроорганизмов наиболее часто встречалась способность к фиксации атмосферного азота – 70%. У 25% изолятов обнаруживалась способность к продукции

сидерофоров, у 45% – способность к синтезу фитогормона ИУК, у 20% – способность к растворению фосфатов.

4. На основе анализа полученных данных было отобрано 4 штамма: 2а, 22а, 1с и 11с, сочетающих свойства устойчивости к тяжелым металлам и стимулирующий рост растений потенциал, перспективных для дальнейшего применения в фиторемедиационных исследованиях.

5. На основании полифазного подхода (по совокупности изучения культурально-морфологических, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических признаков) отобранные штаммы: 2а, 22а, 1с и 11с были идентифицированы как *Lysinibacillus sphaericus*.

#### **Список использованных источников**

- 1 Влияние тяжелых металлов на микрофлору корневой зоны биоэнергетического растения *Miscanthus × giganteus* / И. Ю. Сунгурцева [и др.] // Гигиена и санитария на страже здоровья человека: Материалы межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, Саратов, 29 мая 2019 года. – Саратов: Общество с ограниченной ответственностью "Амирит", 2019. – С. 165-168.
- 2 Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) / A. A. Belimov [et al.] // Soil Biology and Biochemistry. – 2005. – Vol. 37, N 2. – P. 241-250.
- 3 Glickmann, E. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria / E. Glickmann, Y. Dessaux // Applied and Environmental Microbiology. – 1995. – Vol. 61, N 2. – P. 793-796.
- 4 Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д. Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 87 с.
- 5 Муромцев Г. С. Методы изучения растворения фосфатов кальция микроорганизмами / Г. С. Муромцев // Микробиология. – 1957. – № 26. – С. 172-178.

- 6 Schwyn, B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores / B. Schwyn, J. B. Neilands // Analytical Biochemistry. – 1987. – Vol. 160, N 1. – P. 47-56.
- 7 Практикум по микробиологии / под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Изд-во «Академия», 2005. – 608 с.
- 8 Shaw, D. R. Transcriptional analysis and molecular dynamics simulations reveal the mechanism of toxic metals removal and efflux pumps in *Lysinibacillus sphaericus* OT4b.31 / D. R. Shaw, J. Dussán // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2018. – Vol. 127. – P. 46-61.
- 9 Определитель бактерий Берджи: в 2-х томах / [Р. Беркли и др.] ; под ред. Дж. Хоулта [и др.] ; пер. с англ. под ред. акад. РАН Г. А. Заварзина. – 9-е изд. – Москва: Мир, 1997. – Т. 2. – 1997. – 325 с.

