

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДЫ СВОБОДНОЖИВУЩИХ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS*

О.Н. Жук, Я.С. Камельчук, Д.А. Грушевская,
И.С. Лихтар, К.А. Риженков

Полесский государственный университет, Пинск

Введение. Деградация почвенных экосистем, динамическое уменьшение многообразия групп микроорганизмов, снижение не только их количества, но и физиологической активности, нарушение структуры биогеоценозов - последствия антропогенного воздействия [3]. Использование при интенсивном земледелии агроэдохимикатов и синтетических удобрений достигло своего потолка и дальнейшее увеличение их применения уже не ведет к повышению урожайности, но провоцирует экологические проблемы, негативно влияет на качество продуктов питания и, в конечном результате, на здоровье человека. Новый виток земледелия направлен на взаимовыгодное сотрудничество с природой, на восстановление микробиоты почвы, в том числе и с помощью биотехнологических приемов. Селекция природных микроорганизмов для производства биопрепаратов нацелена на виды, которые способны участвовать в процессах биоремедиации почвы и обогащении ее доступным азотом, витаминами и другими физиологически активными соединениями, угнетать рост фитопатогенных грибов. [2, 5]. Одним из первых биопрепаратов – «Азото-бактерин» – был разработан и применен в Советском Союзе в 30-х годах прошлого века [4]. Его основу составил *Azotobacter chroococcum* – род свободноживущих в почве бактерий, способных фиксировать атмосферный азот, переводить его в форму, доступную для усвоения растениями, выделять в окружающую среду биологически активные вещества, угнетать рост фитопатогенных грибов и, в конечном итоге, стимулировать рост и развитие

растений [2, 5]. На современном этапе актуальность разработки и внедрения в производство микробных биопрепаратов для повышения устойчивости производства и качества продукции растениеводства значительно возрастает [1, 2]. Беларусь активно включилась в развитие экологического земледелия – принят закон о производстве и обращении органической продукции, для исполнения которого необходимо не только развивать биотехнологии, но и готовить кадры.

Цель нашей работы – провести функциональную оценку свободноживущих почвенных азотфиксирующих бактерий, выделенных из природы. Для достижения поставленной цели требовалось выделить чистую культуру микроорганизмов, провести их идентификацию, исследовать физиологические свойства и оценить способность стимулировать ростовые потенции сельскохозяйственных растений.

Материалы и методы исследований. Чистую культуру микроорганизмов выделяли из почвы путем многократных пассажей с последующим отбором колоний.

Идентификация штамма была осуществлена на основании изучения его культурально-морфологических и физиолого-биохимических характеристик в соответствии с описанием, данным в определителе бактерий Берджи [6], а также на основании изучения последовательности генов 16S рРНК.

Для изучения культурально-морфологических особенностей штамма в лабораторных условиях культивирование проводили на питательных средах: МПА, солевой среде МТ-1 (г/л): KH_2PO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_2\text{O}_7$ – 0,005; CaCO_3 – 3,5; сахароза – 20; рН среды 7,0 до стерилизации, среде Эшби (г/л): сахароза – 20,0; K_2HPO_4 – 0,2; MgSO_4 – 0,2; NaCl – 0,2; K_2SO_4 – 0,2; CaCO_3 – 5,0; агар – 20., Среде Берка (г/л): KH_2PO_4 – 0,8; K_2HPO_4 – 0,2; MgSO_4 – 0,2; NaCl – 0,2; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ – 0,01; CaSO_4 – 0,1; глюкоза – 10; агар – 15; рН – 6,8-7,0.

Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК проводился в Институте микробиологии НАН Беларуси с использованием коммерческого набора «Jena Bioscience» (Германия) для выделения геномной ДНК, универсальных эубактериальных праймеров 8f (5'-agagtttgatcctggctcag-3') и 1492r (5'-gggtacctgttacgactt-3') для амплификации нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.

Продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) анализировали методом электрофореза в 1 % агарозном геле с использованием 1X ТАЕ-буфера, напряженность электрического поля – 5 В/см. Визуализация ДНК – окрашивание раствором бромистого этидия (0,05 мкг/мл). Стандарт для определения размера продуктов ПЦР – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler DNA Ladder 1Kb Plus (Thermo Scientific). Для очистки целевого продукта ПЦР использован коммерческий набор DNA Extraction kit (Thermo Scientific, Литва) согласно прилагаемой инструкции. Реакцию секвенирования проводили, используя набор реагентов DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience) согласно прилагаемой инструкции. Разделение и анализ продуктов секвенирования осуществляли с помощью анализатора Li-COR 4300 DNA Analyzer (США). Компьютерную обработку результатов секвенирования, их редактирование и предоставление в форматах FASTA, Genbank, Plain text выполняли с помощью программы e-Seq™ Software.

Сравнительный анализ гомологии секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и референтных последовательностей проводили on-line с использованием баз данных GenBank и Ribosomal Database Project (RDP).

Результаты исследований и их обсуждение.

При выращивании на среде МПА в течение 96 часов при 28°C культура микроорганизмов, выделенных из почвы, образует выпуклые блестящие слизистые колонии диаметром 2-4 мм, гладкие с ровным краем, бежевого цвета, тягучей консистенции, при микроскопировании мелкие палочки, встречаются кокковидные формы. На 4 сутки на поверхности солевой жидкой питательной среды МТ-1 появляется поверхностный рост культуры микроорганизма в виде тонкой 2-3 мм толщины пленки светло-серого цвета. Через 36 часов на поверхности среды Эшби образуются слизистые колонии размером до 3 мм серова-

то-белого цвета. После 96 часов культивирования цвет колоний приобретает кремовый оттенок. После 96 часов культивирования на среде Берка при $29\pm 1^\circ\text{C}$, колонии слегка беловатые, с гладкой блестящей поверхностью, круглые, выпуклые с ровным краем. При микроскопировании – мелкие грамположительные палочки, реже кокковидные формы, одинарные или соединенные в короткие цепочки. Размер колоний не превышает 5,0 мм через 72 часа после посева. Аэроб, не требует добавок факторов роста и витаминов в питательную среду для выращивания. Выделенный микроорганизм не разжижает желатин, кислотообразование при росте на сахарах и углеводородах слабое, не образует индол и сероводорода, является каталазоположительным.

По совокупности полученных результатов нами было предположено, что данный микроорганизм может относиться к роду азотобактер и штамм был обозначен как *Azotobacter sp.* S18.

При проведении ПЦР на матрице геномной ДНК штамма S18 с универсальными праймерами 8f и 1492g для амплификации нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК получен ампликон размером ~ 1500 п.н., что соответствует ожидаемому размеру целевого продукта (полная последовательность гена 16S рРНК).

Первичный скрининг по базе данных Ribosomal Database Project (RDP) показал, что штамм S18 относится к царству *Bacteria*; отделу *Actinobacteria*; классу *Actinobacteria*; порядку *Actinomycetales*; семейству *Nocardiaceae*; роду *Rhodococcus*.

Сравнительный анализ секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма S18 с референтными нуклеотидными последовательностями из базы данных GenBank выявил её максимальное сходство с нуклеотидной последовательностью гена 16S представителей рода *Rhodococcus*, видов *Rhodococcus sp.* (99.61%), *Rhodococcus erythropolis* (99.61%).

Сравнительный анализ секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма S18 с референтными нуклеотидными последовательностями типовых штаммов из базы данных Ribosomal Database Project (RDP) выявил её максимальное сходство с нуклеотидной последовательностью гена 16S представителей рода *Rhodococcus*, вида *Rhodococcus erythropolis* (99.7%).

Критерием отнесения микроорганизма к тому или иному виду считается гомология не менее 97%, следовательно, наиболее вероятно принадлежность штамма S18 к виду *Rhodococcus erythropolis* (99.7%).

Таким образом, результаты анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК показывают, что наиболее вероятной является принадлежность исследуемого штамма к роду *Rhodococcus*, виду *Rhodococcus erythropolis* (99.7%). Вид относится к микроорганизмам 1-2 группы риска согласно классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ).

Исследование влияния *Rhodococcus erythropolis* на ростовые характеристики кукурузы (*Zea*) было проведено в 2 этапа. В первом – на всхожесть, прорастание, формирование корневой системы в лабораторных условиях, при этом кукурузу помещали в чашки Петри (по 10 зерен), покрытые фильтровальной бумагой и добавляли 20 мл культуральной среды, содержащей разные концентрации микроорганизма. Было проведено 6 серий экспериментов в 5-кратном повторе: № 0 – солевая среда, не содержащая микроорганизмы, № 1 – концентрация микроорганизмов составила $1,3 \times 10^7/\text{см}^3$, № 2 – $3,25 \times 10^7/\text{см}^3$, № 3 – $6,5 \times 10^7/\text{см}^3$, № 4 – $9,78 \times 10^7/\text{см}^3$, № 5 – $1,3 \times 10^8/\text{см}^3$, температура экспозиции – 22°C , длительность – 5 суток.

Через одни сутки наблюдали первые признаки прорастания семян, на вторые – формирование ростка, на третьи – образование корневой системы. Результаты наблюдений представлены в таблице.

Таблица – Влияние микроорганизма на рост кукурузы

		№0	№1	№2	№3	№4	№5
1 сут	Проросшие семена, шт	3	2	4	4	3	6
	Рост, мм	-	-	-	-	-	-
2 сут	Проросшие семена, шт	10	9	9	8	10	10
	Рост, мм	3,8 ± 0,2	7,2 ± 0,3	7,8 ± 0,2	6,6 ± 0,4	8,0 ± 0,5	8,8 ± 0,2
	Количество корней, шт	19	19	22	20	22	26
3 сут	Проросшие семена, шт	10	9	10	9	10	10
	Рост, мм	19 ± 0,5	20,5 ± 0,5	23,5 ± 0,5	19 ± 0,5	24,4 ± 0,6	26,3 ± 0,2
	Количество корней, шт	30	33	28	27	28	30
4 сут	Проросшие семена, шт	10	9	10	9	10	10
	Рост, мм	37,3 ± 0,2	41,3 ± 0,2	42,2 ± 0,3	39,6 ± 0,4	49,2 ± 0,3	42,6 ± 0,4
	Количество корней, шт	34	33	33	32	28	30
5 сут	Проросшие семена, шт	10	9	10	9	10	10
	Рост, мм	52,3 ± 0,2	66,6 ± 0,4	69,2 ± 0,3	53,7 ± 0,3	64,5 ± 0,5	52,6 ± 0,4
	Количество корней, шт	35	33	33	32	28	30

Как следует из полученных данных, показатели роста и развития семян в контроле были ниже всех экспериментальных серий. Наилучший показатель образования ростков кукурузы отмечен в эксперименте № 2 (концентрация микроорганизмов $3,25 \times 10^7 / \text{см}^3$) – длина ростков достигала $69,2 \pm 0,3$ мм (рисунок 1). Наибольшее количество корней было сформировано в контроле (чашка Петри № 0 – 35 шт). Однако у экспериментальных проростков корни были длиннее и более опушенными.



Рисунок 1. – Пятые сутки эксперимента

На втором этапе эксперименты проведены в полевых условиях. Суспензию *Rhodococcus erythropolis* вносили в грунт на участок поля с уже взошедшей кукурузой.

Был выбран участок поля, где всходы отстали в росте из-за переувлажненности участка (рисунок 2). Первые пять рядов кукурузы были обработаны данной суспензией при концентрации микроорганизма – $3,25 \times 10^7 / \text{см}^3$.

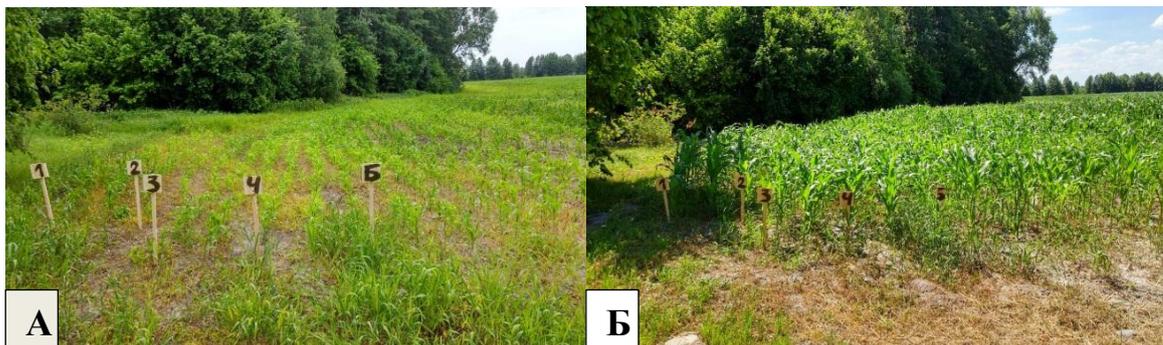


Рисунок 2. – Влияние *Rhodococcus erythropolis* на рост и развитие всходов кукурузы (пояснение в тексте)

Эксперимент проводился в течение 35 суток и как видно на рисунке 2 (Б), те ряды с кукурузой, куда был внесен микроорганизм, не только догнали основную часть поля, но и превзошли ее в развитии и росте в отличие от восьми «контрольных» рядов.

Заключение. На основании проведенных исследований по определению биохимических, морфологических и физиологических исследований, используя определитель Берджи, а также, при проведении генетического эксперимента, изучения последовательности генов 16S рРНК, выделенный микроорганизм относится к роду - *Rhodococcus*, виду – *Rhodococcus erythropolis*.

Он положительно влияет на развитие кукурузы (*Zea*) – улучшая всхожесть, рост и развитие как самого растения, так и корневой системы. Выделенный микроорганизм может быть использован при создании микробных биопрепаратов для применения в органическом земледелии.

Список использованных источников

1. Прохоров А.М. Азотобактер / Большая советская энциклопедия / А. М. Прохоров. – М.: Советская энциклопедия. – 1978.
2. Гарбуз С.А. Подбор оптимальной питательной среды для гомогенного, периодического культивирования *Azotobacter chroococcum* / С.А. Гарбуз, В.Е. Корытова // Международный научно-исследовательский журнал № 12 (54) Часть 1. – Екатеринбург, 2016. – С. 12-14.
3. Заварзин, Г. А. Введение в природоведческую микробиологию / Г.А. Заварзин, Н.Н. Колотилова. – М.: Университет, 2001. – 256 с.
4. Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения / Н.А. Красильников. – М.: Издательство АН СССР. – 1958. – 493 с.
5. Наумова А.Н. Природа действия бактериальных удобрений (азотобактерина, фосфобактерина) на сельскохозяйственные растения / А.Н. Наумова, Е.Н. Мишустин, В.Г. Марьенко. – Изв. АН СССР. – 1962. – С.709-717.
6. Хоулта Дж. Определитель бактерий Берджи: В 2 т. / Дж. Хоулта. – М.: Мир, 1997, Т.1. – 426 с.