

УДК 640

НОВАЯ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ БАКТЕРИЯ РОДА *EXIGUOBACTERIUM* SP. S4/2 – ЭФФЕКТИВНЫЙ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТИМУЛЯТОР РОСТА РАСТЕНИЙ**Т.Н. Абашина, А.Н. Звонарев, А.П. Шорохова, В.Н. Полищцева, Н.Е. Сузина***Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН). Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина Российской академии наук, Пуццино, Россия*

Грамположительная бактерия с высоким многофункциональным потенциалом к стимуляции роста растений выделена с поверхности кожного покрова водной лягушки-когтеносца Бёттгера *Hymenochirus boettgeri*. На основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК установлено филогенетическое положение нового изолята. Выделенная бактерия штамм S4/2 относится к роду *Exiguobacterium*. Наиболее близким видом является *Exiguobacterium mexicanum* (более 99,0 % сходства). *Exiguobacterium* – род бацилл, относящийся к низкому по содержанию ГЦ-пар в ДНК типу грамположительных бактерий. Впервые род *Exiguobacterium* с характеристикой штамма *E. aurantiacum* DSM6208T, полученного на щелочном заводе по переработке картофеля был описан Коллинз с соавт. в 1983 г. (1). Представители рода *Exiguobacterium* обнаружены в районах с широким диапазоном температур (от -12 до 55 °C), включая ледники в Гренландии и горячие источники в Йелоустоне. Представители этого рода также были выделены из вечной мерзлоты в Сибири (2). Эта способность выживать при различных экстремальных температурах делает исследование бактерий рода *Exiguobacterium* весьма актуальным. Некоторые штаммы в дополнение к динамической термоадаптации также являются галотолерантными (до 13 % NaCl в среде), могут расти в широком диапазоне значений pH (5–11), устойчивы к высоким уровням УФ-излучения и стрессу тяжелых металлов (включая мышьяк) (3). *Exiguobacterium* – это распространенные в глобальном масштабе микроорганизмы, которые встречаются в различных природных биотопах, включая микробиалиты (тромболины) (4) из озера Павильон в Британской Колумбии и строматолиты (5) из лагуны Сокомпа (Аргентина), а также встречаются в океанах (6), пресноводных озерах (7), в гималайских льдах (8), гималайских почвах (9), в гидротермальных источниках (10), в организме артемии (11), желудочно-кишечном тракте морской рыбы (12) и в микробных биопленках (13). Виды *Exiguobacterium* широко изучались на предмет биodeградации сложных органических и неорганических соединений. Сообщалось, что штамм *E. sibiricum* DR11 и штамм *E. Undae* DR14 разлагают полистирол, образуя биопленку на поверхности, что приводит к изменению физических свойств материала. Сообщалось также, что бактерия *Exiguobacterium* sp. ASW-1, выделенная на побережье Чжэцзяна в Китае, может разлагать 75,1 % сырой нефти (1 % в массе) за 7 дней даже при различных изменениях окружающей среды, таких как температура, pH, соленость и концентрация сырой нефти (15). Некоторые виды бактерий рода *Exiguobacterium* могут быть использованы для реабилитации нефтезагрязненных территорий в условиях Крайнего Севера. Малахитовый зеленый, один из наиболее распространенных красителей в текстильной промышленности и эффективное противогрибковое средство, оказывает множество негативных воздействий на окружающую среду и оказывает канцерогенное воздействие на клетки млекопитающих. Было показано, что *Exiguobacterium* sp. MG2, выделенный из реки в провинции Юньнань в Китае, разрушает эту трудно разлагаемую молекулу даже при концентрации 2500 мг/л в диапазоне pH 5,0–9,0.

Литературные данные подтверждают тот факт, что штаммы экстремофильных бактерий *Exiguobacterium* способны разлагать ряд ксенобиотических соединений, а также преодолевать токсичность металлов путём адсорбции, биоаккумуляции, биотрансформации и выведения металла за пределы клетки, что может быть использовано для снижения загрязнения окружающей среды.

Материалы и методы

Выделение бактериальной культуры и условия её инкубирования. Источниками для выделения бактериальных культур были слизистые слои кожных покровов водной лягушки-когтеносца Бёттгера *Hymenochirus boettgeri*.

Образцы слизистых покровов лягушки отбирали соскобом после предварительного ополаскивания животного в стерильной водопроводной воде, чтобы удалить бактерии-контаминанты из окружающей среды. Полученный таким образом материал слизистых покровов переносили в 2 мл фосфатного буфера (г/л: NaH_2PO_4 – 6.0; Na_2HPO_4 – 22.0; pH 6.9), ресуспендировали, пропускали через фильтр с диаметром пор 0.4 мкм и высевали 100 мкл на агаризованную триптон-соевую среду 5/5, разработанную в ИБФМ РАН, следующего состава (г/л): экстракт сои – 30.0, гидролизат казеина – 5.0, дрожжевой экстракт – 1.0 и аминокислота (мл/л) – 60.0, pH 8.0; для получения твердой среды этого же состава в неё добавляли агар (г/л) – 20.0. Чистоту выделенной культуры контролировали: с помощью световой фазово-контрастной, трансмиссионной электронной микроскопии и путём расщепления изолятов на агаризованную среду для выявления в посевах посторонних, не свойственных выделенным штаммам, колоний.

Изучение и идентификация микроорганизмов. Физиолого-биохимические и морфологические свойства бактерии *Exiguobacterium* sp. S4/2 определяли при ее аэробном росте на питательной среде «ИБФМ 5/5». Микроскопические наблюдения в режиме фазового контраста проводили с использованием микроскопов Nikon Eclipse Ci microscope (Nikon, Япония) с камерой ProgRes SpeedXT (Jenoptic, Германия). *Флуоресцентная микроскопия.* Для стабилизации клеточных культур при работе использовали буфер HEPES-KOH (ThermoFisher) 50 mM + 330 mM Сорбита, pH 7.2. Для окрашивания бактериальных нуклеиновых кислот использовали краску SYTO™ 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain (ThermoFisher). В работе использовали микроскоп Zeiss imager A1, камеру Axioscam 506C, набор фильтров Zeiss 56HE (excitation 470/27, emission DBP 512/30 + 630/98).

Идентификацию выделенного штамма S4/2 проводили молекулярно-генетическими методами. Секвенирование 16S рРНК гена проводили с использованием двух универсальных праймеров 27F (5'–AGAGTTTGTACCTTGGCTCAG) и 1492R (5'–TACGGYTACCTTGTACGACTT). Анализ результатов секвенса был проведен с использованием базы данных NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 11 и модели Neighbor-joining (Tamura et al., 2007).

Проверка антибактериальных и антигрибковых свойств выделенного штамма. Проверку наличия у штамма S4/2 антагонистических свойств по отношению к фитопатогенным микроорганизмам осуществляли по наличию зон подавления роста тестируемых культур на агаризованных средах в чашках Петри. Агаризованные среды (картофельно-декстрозный агар для фитопатогенных мицелиальных грибов и питательный агар ИБФМ 5/5 для тестируемых бактерий) засеивали шпателем в чашках Петри, а на поверхность засеянного агара помещали стерильный бумажный диск, на который наносили 5 мкл 1–2-суточной культуральной жидкости штамма S4/2. Наличие антагонистических свойств считали доказанным, если зона подавления роста тестируемого организма составляла не менее 0,5 см вокруг диска.

Подготовка растительного материала. Объектами исследования служили растения рапса (*Brassica napus*) отечественного сорта «Галант», полученного из ВНИИМК имени В.С. Пустовойта, Краснодар. Семена стерилизовали 1,5 мин в 70 %-ном этаноле, затем 2 мин в 20 %-ном растворе гипохлорита натрия и промывали 3 раза по 10 мин в стерильной дистиллированной воде. Семена проращивали на безгормональной среде Мурасига–Скуга (МС) (16), содержащей 7 г/л агара, 30 г/л сахарозы (pH 5,8) и стандартный набор солей («Лабтех»). *Колонизация растений ассоциативными бактериями.* Семена и рапса обрабатывали суспензией ассоциативных бактерий. Для этого семена помещали в жидкую культуру бактерий с титром 10^3 на 2 мин, подсушивали на фильтровальной бумаге и переносили на чашки Петри, со средой МС. В качестве контроля на среду МС помещали необработанные бактериями семена и культивировали при 22–24 °С и 16-часовом фотопериоде при освещенности 2 клк. Для определения основного фитогормона типа ауксинов, определяющего фитостимуляцию индолил-3-уксусной кислоты, был проведен сравнительный анализ на спектрофотометре Шимадзу UV-1800 (Япония). Для анализа использовался реактив Сальковского, приготовленный согласно Гордону и Веберу (17), дающий характерное розово-красное окрашивание с ИУК. Количество фитогормонов в исследуемых образцах рассчитывали с помощью построения калибровочной кривой по стандартным растворам.

Результаты и их обсуждение

Клетки нового изолята *Exiguobacterium mexicanum* шт. S4/2 имеют палочковидную форму с характерными размерами 0,7–1,0 x 0,4–0,5 мкм. На агаризованной питательной среде культура образует пигмент с ярким насыщенным оттенком оранжевого цвета.

На основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК установлено филогенетическое положение нового изолята. Выделенная бактерия относится к роду *Exiguobacterium*. Наиболее близким видом является *Exiguobacterium mexicanum* (более 99,9 % сходства) (Рис. 1).

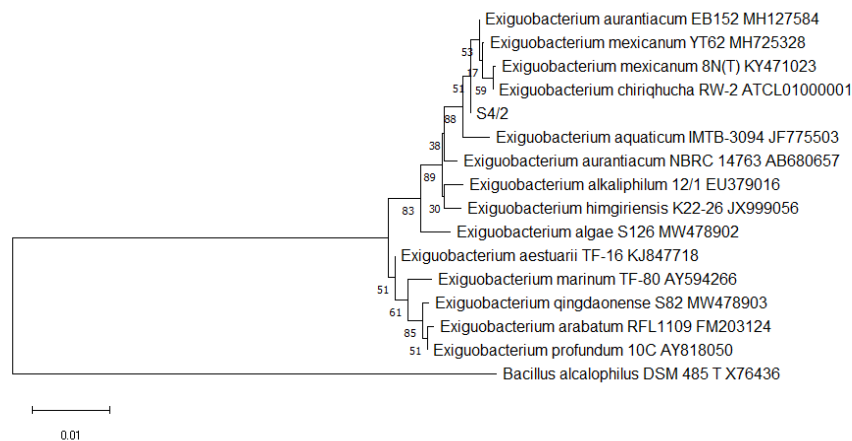


Рис. 1 Филогенетическое положение штамма S4/2, основанное на результатах сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК.

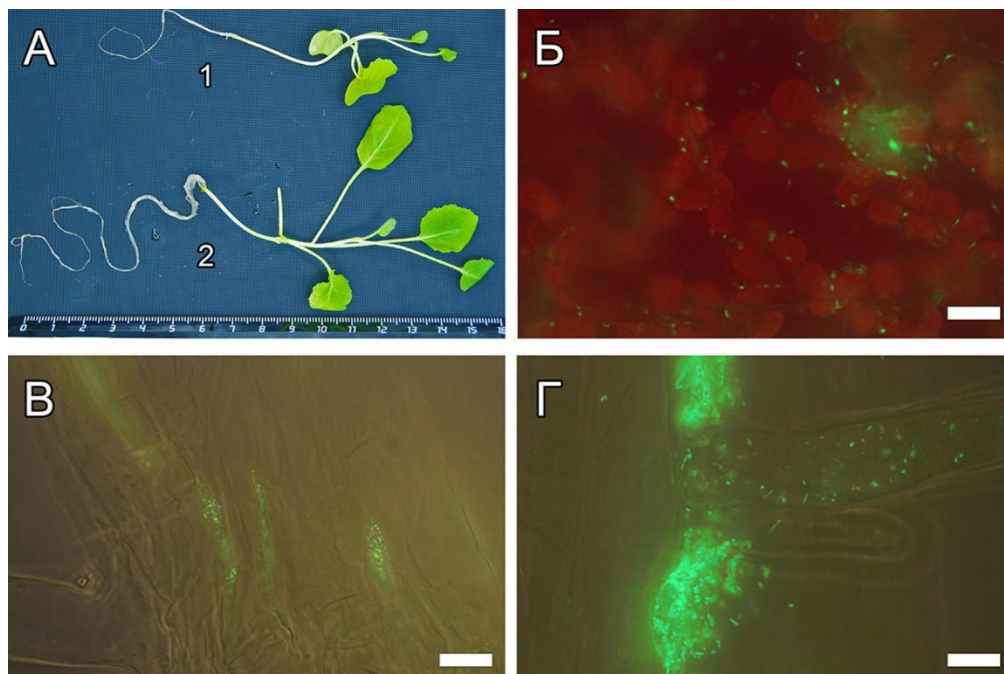


Рис. 2. A1 – контрольное растение, A2 – колонизированное растение, Б – листовая пластина колонизированного растения, люминесцентная микроскопия, Г, Д – корневая система колонизированного растения, совмещенный режим светлое поле и люминесцентная микроскопия. Масштабная метка 10 микрометров.

Штамм S4/2 обладает слабой антибактериальной активностью и эффективно подавляет рост двух штаммов фитопатогенных грибов, один из которых является патогеном рапса. Штамм S4/2 является продуцентом растительных гормонов – ауксинов – стимуляторов роста растений. Фотоколомитрическим методом с реактивом Сальковского было выявлено, что концентрация ауксинов в культуральной жидкости бактерий *Exiguobacterium sp.* S4/2 составляет примерно 4,8 мг/мл.

В лабораторных экспериментальных исследованиях методом люминисцентной микроскопии, показана высокая способность клеток *Exiguobacterium mexicanum* шт. S4/2 колонизировать корни и листья растений. Через 7 дней после прорастания семян наблюдали усиление ризогенеза, удлинение стебля и большее разветвление корневой системы у колонизированных растений в сравнении с контрольными. Растения рапса в фтисимбиозе с шт. S4/2 через 30 дней имели показатели роста примерно в 2 раза превышающие аналогичные показатели контрольных вариантов (рис 2А).

Данные люминисцентной микроскопии показали, что бактерии колонизируют корневую систему с образованием как микроколоний, так и свободно расположенных клеток. Интересной особенностью штамма S4/2 является колонизация не только корневых волосков, но и основного корня с образованием биопленки в слизи чехла калиптогена и на поверхности ризодермы у основания корневых волосков (рис 2В, 2Г). На листовых пластинах также обнаружены бактерии, которые располагаются в хаотичном порядке, не локализуясь в зоне устьиц, как это наблюдается у большинства фитосимбионтов (рис 2Б). Штамм S4/2 обладает слабой антибактериальной активностью, при этом эффективно подавляет рост двух штаммов фитопатогенных грибов, а также обладает высокой ростостимулирующей активностью, поэтому перспективен в качестве основы для создания ростостимулирующих препаратов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00132 А

Литература

1. Collins MD, Lund BM, Farrow JA, Schleifer KH (1983). "Chemotaxonomic study of an alkaliphilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen nov., sp. nov". J. Gen. Microbiol. 129 (7): 2037–2042.
2. Vishnivetskaya, Tatiana A.; Kathariou, Sophia; Tiedje, James M. (May 2009). "The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography". Extremophiles. 13 (3): 541–555.
3. Ordoñez OF et al. (July–August 2013). "Draft Genome Sequence of the Polyextremophilic *Exiguobacterium sp.* Strain S17, Isolated from Hyperarsenic Lakes in the Argentinian Puna". Genome Announcements. 1 (4): 2037–2042.
4. White III RA et al. (July–August 2013). "Draft Genome Sequence of an *Exiguobacterium pavilionensis* Strain RW-2 with Wide Thermal, Salinity, and pH Tolerance, Isolated from Modern Freshwater Microbialites". Genome Announcements. 1 (4): e00597–13.
5. Ordoñez OF et al. (July–August 2013). "Draft Genome Sequence of the Polyextremophilic *Exiguobacterium sp.* Strain S17, Isolated from Hyperarsenic Lakes in the Argentinian Puna". Genome Announcements. 1 (4): 2037–2042.
6. Kim IJ, Lee MH, Jung SY, Song JJ, Oh TK, Yoon JH (2005). "*Exiguobacterium aestuarii sp. nov.* and *E. marinum sp. nov.*, isolated from tidal flat of the yellow sea in Korea". Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55 (2): 885–889.
7. Raichand R, Pareek S, Singh NK, Mayilraj S (2012). "*Exiguobacterium aquaticum sp. nov.*, a new member of the genus *Exiguobacterium*". Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62 (Pt 9): 2150–2155.
8. Chaturvedi P, Shivaji S (2006). "*Exiguobacterium indicum sp. nov.*, a psychrophilic bacterium from the Hamta glacier of the Himalayan mountain ranges of India". Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56(103): 2765–2770.
9. Singh NK, Raichand R, Kaur I, Kaur C, Pareek S, Mayilraj S (2013). "*Exiguobacterium himgiriensis sp. nov.*, a novel member of the genus *Exiguobacterium*, isolated from the Indian Himalayas". Antonie van Leeuwenhoek. 103 (4): 789–796.
10. Crapart S et al. (2007). "*Exiguobacterium profundum sp. nov.*, a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent". Int. J. Syst. Bacteriol. 57 (Pt 2): 287–292.
11. Lopez-Cortes A, Schumann P, Pukall R, Stackebrandt E (2006). "*Exiguobacterium mexicanum sp. nov.* and *Exiguobacterium artemiae sp. nov.*, isolated from the brine shrimp *Artemia franciscana*". Syst. Appl. Microbiol. 29 (3): 183–190.
12. Hossain TJ et al. (2020). "Hydrolytic Exoenzymes Produced by Bacteria Isolated and Identified From the Gastrointestinal Tract of Bombay Duck". Front. Microbiol. 11 (2019): 2150–2155.
13. Carneiro AR et al. (2012). "Genome sequence of *Exiguobacterium antarcticum* B7, isolated from a biofilm in Ginger Lake, King George Island, Antarctica". J. Bacteriol. 194 (23): 6689–6690.
14. Chauhan D et al. (2018) "Biofilm formation by *Exiguobacterium sp.* DR11 and DR14 alter polystyrene surface properties and initiate biodegradation". RSC (Royal Society of Chemistry) Adv. (8): 37590–37599.
15. Chen Q, Li J, Liu M, Sun H, Bao M. (2017) "Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment". PLOS ONE | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174445>
16. Murashige T. et al. (1962) "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures". Physiol. Plant., (15): 473–497.
17. Gordon SA, Weber RP (1951) "Colorimetric estimation of indole acetic acid". Plant Physiol. (26): 192–195.
18. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. P. 1596–1599.