

УДК 631.46: 631.461.5

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЧВЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ*И.А. Дегтярева, Ш.З. Валидов*

*Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук»,
Казань, Россия*

Выделение автохтонных штаммов для создания на их основе микробных препаратов при выращивании сельскохозяйственных культур является экологически целесообразным приемом для получения высококачественной конкурентоспособной растениеводческой продукции, сохранения плодородия почвы и окружающей среды. Для эффективного применения биопрепаратов необходимы глубокие исследования взаимоотношений в системе почва – микроорганизмы – растение с учетом экологических законов ее функционирования. Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», имея современное высокоточное оборудование, ориентирована на решение проблем эффективности биопрепаратов при их использовании в открытом грунте, а также внедрении молекулярно-генетических методов для анализа консорциумов микроорганизмов, характеристике наиболее перспективных штаммов и разработке систем мониторинга фитопатогенов в решении проблем защиты растений. Детально изучается микрофлора культурных растений (более шести тысяч бактериальных изолятов) и создаются консорциумы, состоящие из полезных и совместимых между собой автохтонных микроорганизмов. В модельных системах выделяются новые штаммы – агенты биологической защиты растений. Штаммы бактерий, прошедшие все этапы отбора (определение различных типов ферментативных активностей, исключение повторов и патогенов, проверка антагонистических и колонизирующих свойств, способности к синтезу индол-3-уксусной кислоты (ИУК)), представлены четырьмя условными группами: (1) бактерии, способные колонизировать корневую систему растений; (2) бактерии – антагонисты фитопатогенных грибов; (3) бактерии – продуценты ИУК; (4) бактерии, стимулирующие рост растений за счет своих ферментативных активностей. Конкретный консорциум собирается из четырех штаммов (по одному из каждой группы) для проверки совместимости. Поэтапная экспресс-диагностика перспективных штаммов позволяет сократить сроки работ по выделению агентов биозащиты растений без потери качества выделяемых штаммов. ДНК-фингерпринтинг изолятов с помощью ВОХ-ПЦР значительно сокращает количество изолятов без потери штаммового разнообразия, удаляя клоны одного и того же штамма в пробе. При идентификации можно избавиться от потенциально патогенных штаммов, применение которых нежелательно. В процессе исследований выявлены биосинтетические гены и кластеры генов, задействованные в продукции широкого ряда вторичных метаболитов и ферментов, что подтверждает обоснованность выбора данных штаммов как потенциальных биоконтрольных агентов и их дальнейшее исследование для создания биопрепаратов. Созданы образцы биопрепаратов комплексного действия, эффективность которых экспериментально доказана в модельных системах.

Ключевые слова: почва, микроорганизмы, ферментативная активность, генотипирование, фунгистатический эффект, биологическая защита растений

Введение. Одним из основных и определяющих факторов почвенного плодородия является изучение почвенной и ризосферной микрофлоры. Именно состав микробных сообществ

определяет функционирование почвенной экосистемы в соответствии с биогеохимическими процессами и позволяет оценить ее состояние [1, 2]. Почва является уникальной биологической мембраной, главным природным банком при поиске микроорганизмов с любыми необходимыми свойствами [3-5].

Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов ФИЦ КазНЦ РАН, имея современное высокоточное оборудование, ориентирована на решение проблем эффективности биопрепаратов при их использовании в открытом грунте, а также внедрении молекулярно-генетических методов для анализа консорциумов микроорганизмов, характеристике наиболее перспективных штаммов и разработке систем мониторинга фитопатогенов в решении проблем защиты растений. Детально изучается микрофлора культурных растений и создаются консорциумы, состоящие из полезных и совместимых между собой автохтонных микроорганизмов. В модельных системах выделяются новые штаммы – агенты биологической защиты растений.

В перечне значимых этапов после выделения автохтонных штаммов из почв различных типов и ризосферы важнейших сельскохозяйственных культур является их отбор по полифункциональным свойствам с последующей идентификацией. Среди выявляемых характеристик важной является проверка ферментативной активности микроорганизмов, связанная с их функциональными характеристиками. Этот показатель относится к способности бактерий производить различные ферменты (протеолитические, амилолитические, хитинолитические и др.), играющие ключевую роль в различных биохимических процессах. Изучение ферментативной активности, для проверки которой используют различные методы (химический, спектрофотометрия, изучение продуктов ферментативной реакции, электрофорез), позволяет понять потенциал бактерий для различных биотехнологических приложений (средства биозащиты, очистка сточных вод, производство пищевых продуктов, медицинское применение и другие области) [6-8].

Важным этапом является генотипирование, позволяющее определить молекулярно-генетические характеристики каждого штамма. Современные методы генотипирования бактерий разделяют на три основные категории: методы, основанные на фрагментном анализе (DNA banding pattern), секвенирование и гибридизация ДНК. Наиболее быстрым и технологичным способом идентификации микроорганизмов является сравнительный анализ генов 16S рРНК у эубактерий и анализ межгенных спейсеров ITS1, ITS2 у эукариотических микроорганизмов. Необходимым является и полногеномное секвенирование новых штаммов.

В дальнейшем специальные методики позволяют выявить совместимые штаммы и использовать их в виде консорциума с комплексным положительным действием на растение. Перечисленные методы имеют важное значение для идентификации и классификации бактерий, а также их депонирования с целью их дальнейшего использования на практике. Алгоритм для быстрого и качественного выявления эффективных штаммов для целей биозащиты позволяет не только сократить время для выделения сельскохозяйственно значимых автохтонных штаммов и оценить их биотехнологический потенциал, но и в дальнейшем использовать наиболее перспективные из них в качестве основы создаваемых биопрепаратов.

Цель исследований – создание алгоритма конструирования консорциумов на основе эффективных автохтонных штаммов для создания биопрепаратов в растениеводстве.

Описание методов и методик проводимого исследования. Отбор и учет количества аэробных ассоциаций микроорганизмов проводили по методике О.И. Колешко [9]. Спектр различных активностей бактериальных изолятов включал определение: способности к гидролизу крахмала за счет продукции внеклеточных амилаз – на модифицированной среде ААМ (amylase activity medium) [10]; внеклеточных липаз – на среде с добавлением среды Tween 80 (полиоксиэтилен сорбитан моноолеат) как аналога высокомолекулярных жирных кислот [11]; способности к азотфиксации – на среде Йенсена [12]; протеаз и хитиназ – на модифицированной среде ВМ (basal medium) с добавлением 1% сухого обезжиренного молока [13] и 1% хитина

соответственно [14]; целлюлаз и фитаз – на среде ВМ с добавлением 1% карбоксиметилцеллюлазы натриевой соли [15] и среде PSM (phytase screening medium) [16] соответственно. Антагонистическую активность выделенных бактерий против патогенных микроорганизмов определяли, внося в чашку Петри со средой PDA (potato dextrose agar) в равноудаленном расстоянии друг от друга 3 мкл суспензии изолятов бактерий и 2 мкл суспензии фитопатогенного гриба. Количественное определение индол-3-уксусной кислоты (ИУК) проводили колориметрическим методом по S.A. Gordon и R.P. Weber [17]. Стерильные гнотобиотические системы использовали для изучения макроорганизмов, свободных от воздействия других организмов [18]. Статистический анализ проводили с использованием пакета программ OriginLab pro SR1 b9.5.1.195. Достоверную разницу между группами проверяли с использованием одностороннего ANOVA и апостериорного теста Тьюки на достоверно значимую разницу при $p < 0,05$.

Полученные результаты и их обсуждение. Из различных почв Республики Татарстан выделено более шести тысяч бактериальных изолятов – непосредственно из почв различных типов и ризосферы важнейших сельскохозяйственных культур (озимая и яровая пшеница, рапс, подсолнечник, кукуруза, ячмень). В качестве первичных селективных параметров проанализирована способность изолятов к мобилизации основных неорганических элементов (азота и фосфора), способность к разложению сложных органических соединений (целлюлозы, крахмала, липидов) и предрасположенность к антагонистической активности, а именно наиболее предпочтительные в случае биоконтрольных агентов ферментативных активностей (амилазная, липазная, протеиназная, фитазная и др.).

Так, амилазная активность детектирована при гидролизе крахмала в среде по образованию зон просветления при окраске среды раствором Люголя. Внеклеточная липазная активность у бактериальных изолятов выявлена по наличию вокруг колоний непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот, освобожденных из Tween 80. Штаммы, растущие на среде Йенсена, отобраны как способные фиксировать атмосферный азот. Вокруг колоний бактериальных изолятов, обладающих протеиназной активностью, отмечены зоны просветления, образуемые в результате гидролиза казеина в среде. Штаммы, проявляющие протеолитическую и хитиназную активности, образуют зоны просветления вокруг колоний. Целлюлолитическая активность идентифицирована методом детекции зон просветления (желтого цвета) вокруг колонии после окрашивания конго красным, образующимся в связи с разрушением целлюлозы и образованием ее комплексов с красителем. О наличии антагонистической активности свидетельствуют зоны подавления.

Впоследствии штаммы бактерий, прошедшие все этапы отбора (определение различных типов ферментативных активностей, исключение повторов и патогенов, проверка антагонистических и колонизирующих свойств, способности к синтезу ИУК), разделены на четыре условные группы: (1) бактерии, способные колонизировать корневую систему растений; (2) бактерии – антагонисты фитопатогенных грибов; (3) бактерии – продуценты ИУК; (4) бактерии, стимулирующие рост растений за счет своих ферментативных активностей. Конкретный консорциум собирается из четырех штаммов (по одному из каждой группы) для проверки совместимости. При отсутствии возможности совместимости штаммов внутри консорциума в данной системе образуются зоны подавления различной величины. Метод совмещения штаммов позволяет получить консорциумы, эффективность которых экспериментально доказана и в модельных системах [19]. Эксперименты на совместимость подходят только как первичный скрининг бактериального консорциума. Питательные среды, как правило, не моделируют условия голодания, синтеза некоторых метаболитов, антитоксинов и иных веществ, которые могут образовываться при взаимодействии с растением и играют значимую роль в формировании и функционировании консорциума.

Дальнейшие исследования бактериального консорциума, полученного методом подбора совместимых штаммов, включают удержание изолятов в прикорневой зоне. Поэтапная экспресс-

диагностика перспективных штаммов позволяет сократить сроки работ по выделению агентов биозащиты растений без потери качества выделяемых штаммов. ДНК-фингерпринтинг изолятов с помощью ВОХ-ПЦР значительно сокращает количество изолятов без потери штаммового разнообразия, удаляя клоны одного и того же штамма в пробе. При идентификации можно избавиться от потенциально патогенных штаммов, применение которых нежелательно. Проводится полногеномное секвенирование отобранных потенциальных биоконтрольных штаммов и предоставляется полная характеристика данных штаммов на уровне генома. В процессе исследований выявлены биосинтетические гены и кластеры генов, задействованные в продукции широкого ряда вторичных метаболитов и ферментов, что подтверждает обоснованность выбора данных штаммов как потенциальных биоконтрольных агентов и их дальнейшее исследование для создания биопрепаратов.

Заключение. Таким образом, выделение автохтонных штаммов для создания на их основе микробных препаратов при выращивании сельскохозяйственных культур является экологически целесообразным приемом для получения высококачественной конкурентоспособной растениеводческой продукции, сохранения плодородия почвы и окружающей среды. Для эффективного применения биопрепаратов необходимы глубокие исследования взаимоотношений в системе почва – микроорганизмы – растение с учетом экологических законов ее функционирования. Изучение почвенных микроорганизмов является важным направлением в науке о почве, которое может принести значительные экономические и экологические выгоды.

Считаем, что междисциплинарные фундаментальные и прикладные исследования в микробиологии, генетике, молекулярной биологии, биоинженерии по проблеме автохтонных штаммов, создаваемых на их основе эффективных консорциумов и биопрепаратов, способствуют решению приоритетного направления развития науки, технологий и техники в Российской Федерации, а именно проблеме рационального природопользования.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Государственного задания № FMEG-2021-0003, регистрационный номер 121021600147-1.

Библиографический список

1. Cookson W.R., Murphy D.V., Roper M.M. Characterizing the relationships between soil organic matter components and microbial function and composition along a tillage disturbance gradient // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2008. – № 40. – P. 763-777. DOI:10.1016/j.soilbio.2007.10.011.
2. Griffiths B.S., Philippot L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2012. – № 37. – P. 112-129. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x.
3. Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов Л.А. Микробиологическая трансформация азота в почве. – М.: ГЕОС, 2007. – 138 с.
4. Дегтярева И.А., Яппаров Д.А., Хидиятуллина А.Я., Зарипова С.К. Оценка эффективности жидких форм биопрепаратов // *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана*. – 2013. – Т. 215. – С. 96-100.
5. Дегтярева И.А., Бабынин Э.В., Сироткин А.С., Яппаров И.А. Биоремедиация почв: методы и подходы. Учебно-методическое пособие. – Казань: Изд-во КНИТУ, 2018. – 100 с.
6. Bergmeyer H.U. *Methods of enzymatic analysis*. – Elsevier, 2012. – 1088 p.
7. Hooff G.P., Van Kapmen J., Mesteers R.J.V., Van Belkum A. et al. Characterization of β -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry // *Journal of proteome research*. – 2012. – Vol. 11. – № 1. – P. 79-84. DOI:10.1021/pr200858r.
8. Šebela M. The use of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in enzyme activity assays and its position in the context of other available methods // *Mass Spectrometry Reviews*. – 2023. – Vol. 42. – № 3. – P. 1008-1031. DOI:10.1002/mas.21733.

9. Колешко О.И. Экология микроорганизмов почвы. Лабораторный практикум // Минск: Высшая школа, 1981. – 175 с.
10. Nimisha P., Moksha S., Gangawane A.K. Amylase activity of starch degrading bacteria isolated from soil // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. – 2019. – Vol. 8. – № 4. – P. 659-671. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.804.071>.
11. Kumar D., Kumar L., Nagar S., Raina C., Parshad R., Gupta V.K. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions // *Archives of Applied Science Research*. – 2012. – Vol. 4. – № 4. – P. 1763-1770.
12. Zebua A.C., Guchi H., Sembiring M. Isolation of non-symbiotic Nitrogen-fixing bacteria on andisol land affected by Sinabung eruption // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – IOP Publishing, 2020. – Vol. 454. – № 1. – P. 012167. DOI: 10.1088/1755-1315/454/1/012167.
13. Sharma A.K., Sharma V., Saxena J., Yadav B., Alam A., Prakash A. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from bacterial and fungal isolates of soil // *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*. – 2015. – Vol. 3. – № 9. – P. 334-340. DOI:10.12983/ijres-2015-p0334-0340.
14. Krithika S., Chellaram C. Isolation, screening, and characterization of chitinase producing bacteria from marine wastes // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2016. – Vol. 8. – № 5. – P. 34-36.
15. Islam F., Roy N. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses // *BMC research notes*. – 2018. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-6. DOI:10.1186/s13104-018-3558-4.
16. Singh N.K., Joshi D.K., Gupta R.K. Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters // *Jundishapur Journal of Microbiology*. – 2013. – Vol. 6. – № 5. <https://doi.org/10.5812/jjm.6419>.
17. Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indole-3-acetic acid // *Plant physiology*. – 1951. – Vol. 26. – № 1. – P. 192. DOI:10.1104/PP.26.1.192.
18. Luckey T. *Germfree life and gnotobiology*. – Elsevier, 2012. – 536 p.
19. Diabankana R.G.C., Shulga E.U., Validov S.Z., Afordoanyi, D.M. Genetic characteristics and enzymatic activities of *Bacillus velezensis* KS04AU as a stable biocontrol agent against phytopathogens // *International Journal of Plant Biology*. – 2022. – Vol. 13. – № 3. – P. 201-222. <https://doi.org/10.3390/ijpb13030018>.