

## Выделение и характеристика солеустойчивых азотфиксирующих и фосфатсолобилизирующих бактерий

Надежда Наумович, Зинаида Алещенкова

*Институт микробиологии НАН Беларуси*

Поступление в почву продуктов деятельности человека – органических и минеральных соединений, ксенобиотиков и других отходов ведет к сокращению общей площади земель сельскохозяйственного использования и потере ее плодородия. Засоление, обусловленное применением несовершенных методов орошения, увеличением числа территорий с аридным климатом и техногенным загрязнением является одной из актуальных проблем современного земледелия. Повышенное содержание легкорастворимых солей в почве негативно влияет на рост и урожайность возделываемых сельскохозяйственных культур. В почвах с высоким уровнем засоления и техногенной нагрузкой формируется уникальная микрофлора, способная выживать в экстремальных условиях среды. В связи с этим, особый интерес представляют микроорганизмы, адаптированные к выживанию в условиях повышенного содержания хлорида натрия. Из образцов почвы, отобранной в районе Старобинского месторождения калийных солей (ОАО Беларускалий), были выделены штаммы фосфатмобилизирующих и азотфиксирующих бактерий. Среди них проведен скрининг бактерий, растущих на среде содержащей 10% хлорида натрия, и проверена способность стимулировать рост и развитие семян люцерны (*Lotus corniculatus*) в условиях засоления. Отобранные солеустойчивые азотфиксирующие и фосфатсолобилизирующие изоляты были охарактеризованы и идентифицированы с помощью технологии MALDI-TOF. Выделенные и отобранные штаммы солеустойчивых азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих бактерий могут быть перспективны для создания инокулянтов и использования в технологии фиторекультивации техногенно засоленной почвы, в случае их не патогенности для человека и животных.

*Засоление, почва, азотфиксирующие и фосфатсолобилизирующие микроорганизмы*

### Введение

Стрессовые факторы окружающей среды, такие как засоление, засуха, токсичные газы, ксенобиотики, тяжелые металлы, радиация и другие крайне неблагоприятны для ведения сельскохозяйственного производства. По имеющимся литературным данным, лишь около 10% территорий нашей планеты классифицируется как не стрессовая категория, около 20% территории земли характеризуются минеральным стрессом, 26% - засушливым и 15% - холодным стрессом (Boonchan et al., 2000; Caton et al., 2004).

Почвенное засоление, обусловленное применением несовершенных методов орошения и техногенным загрязнением, является одной из актуальных проблем современного земледелия (Hedi et al., 2009). Деградация земель является одной из наиболее актуальных экологических проблем Беларуси. Особенно остро в Беларуси она стоит в промышленном Солигорском районе. Примером полного техногенного преобразования земной поверхности является район добычи калийных солей, где шахтным способом извлекается порядка 30 млн. тон породы в год. За время функционирования ОАО «Беларуськалий» на ранее плодородных землях скопилось свыше 730 млн. т твердых глинисто-солевых шламов. Повышенное содержание легкорастворимых солей в почве негативно влияет на микробный ценоз, урожай и качество сельскохозяйственной продукции.

Высокая соленость является одним из наиболее распространенных факторов экологического стресса, что неблагоприятно влияет на продуктивность, задерживая рост и развитие растений. Растения, находясь в неблагоприятных условиях среды, нуждаются в дополнительных ресурсах питания и энергии, оптимизации гормонального статуса и снижении интенсивности воздействия солевого стресса (Жумарь и др., 2007).

Несмотря на негативное влияние засоления, в почвах с высоким уровнем засоления и техногенной нагрузкой формируется уникальная микрофлора, способная выживать в экстремальных условиях среды. В связи с этим, особый интерес представляют микроорганизмы, адаптированные к выживанию в условиях повышенной минерализации. В последние десятилетия интенсивное исследование микрофлоры экосистем с высоким засолением среды позволило выделить и охарактеризовать галофильные и галотолерантные микроорганизмы. Они способны к активной жизнедеятельности в широком диапазоне концентраций солей и обнаруживаются в различных биотопах и антропогенных экосистемах с повышенным уровнем минерализации (Chen et al., 2000).

*Целью* наших исследований было выделение и характеристика солеустойчивых азотфиксирующих и фосфатсолобилизирующих бактерий.

*Растительные объекты:* люцерна рогатый (*Lotus corniculatus*) сорт «Изумруд».

*Микробиологические объекты:* солеустойчивые азотфиксирующие и фосфатсолобилизирующие изоляты бактерий.

### Методика исследования

Устойчивых к засолению фосфатсолобилизирующих и азотфиксирующих микроорганизмов выделяли из образцов почвы, отобранных на территории ОАО «Беларуськалий». Для выделения штаммов микроорганизмов использовали метод накопительного культивирования. В качестве селективных сред для получения накопительных культур олигонитрофильных микроорганизмов, многие из которых фиксируют молекулярный азот, использовали безазотистые среды Эшби и Birk'a (Теппер и др., 2004), фосфатсолобилизирующих микроорганизмов – глюкозо-

аспарагиновую среду, предложенную Муромцевым (Герхард и др., 1986). Из образцов накопительных культур, методом посева нате же агаризованные элективные питательные среды выделяли изоляты олигонитрофильных и фосфатсололюбилующих микроорганизмов.

Устойчивость отобранных изолятов микроорганизмов к хлориду натрия в концентрации 3,5; 5; 7 и 10% определяли на LB среде.

Бактериальную ДНК выделяли набором Genomic DNA purification kit фирмы Thermo scientific. Для установления детерминат, определяющих азотфиксирующую активность у отобранных бактериальных изолятов, определяли наличие в геноме гена *nifH*, с помощью пары праймеров *nifH-1F* и *nifH-1R* (Soltani et al., 2012).

Ростостимулирующее действие выделенных изолятов бактерий в условиях засоления на прорастание семени лядвенца, изучали по методам, изложенным в руководстве (Возняковская, и др., 1969). Обработанные семена проращивали в термостате при температуре 28°C в течение 2-3.

## Результаты и обсуждение

Из образцов дерново-подзолистой почвы с различной степенью засоления и значением pH, отобранной в районе действия ОАО «Беларуськалий», выделено и отобрано 10 олигонитрофильных изолятов, хорошо растущих на безазотных средах Эшби и Bürk'a.

Олигонитрофильные изоляты были проверены на способность к азотфиксации. В качестве маркера азотфиксации мы использовали *nifH*-ген, поскольку на настоящий момент сформирована представительная база данных, содержащих последовательность *nifH*-генов бактерий из различных мест обитаний. В ходе ПЦР-анализа фрагмента гена *nifH* исследуемых олигонитрофильных бактерий с парой праймеров *nifH-1F* и *nifH-1R* у 8 изолятов была выявлена одна специфическая зона амплификации размером ~ 430 п.о., служащая доказательством принадлежности

выделенных изолятов (СА-1, СА-2, СА-3, СА-4, СА-5, СА-6, СА-7, СА-8) к азотфиксаторам.

Также из этих образцов почвы, были выделены и отобраны 9 изолятов бактерий (ФС-1, ФС-2, ФС-3, ФС-4, ФС-5, ФС-6, ФС-7, ФС-8, ФС-9), которые через 48 часов культивирования образовывали зоны растворения фосфатов кальция, диаметр зон «галло» вокруг колоний этих штаммов достигал 5-8 мм.

На следующем этапе работы проводили адаптивную селекцию азотфиксирующих и фосфатсололюбилующих изолятов к повышающимся концентрациям хлорида натрия. В соответствии с целью нашего исследования наиболее перспективными для дальнейших исследований являются азотфиксирующие и фосфатсололюбилующие бактерии, растущие на среде, содержащей высокие концентрации хлорида натрия. Среди фосфатсололюбилующих микроорганизмов отобраны два изолята ФС-3 и ФС-4, которые являются умеренными галотолератными бактериями, так как способны расти на среде содержащей 5-10% хлорида натрия, и имеют высокий индекс солубилизации. Для дальнейшего изучения среди азотфиксирующих бактерий отобраны изоляты СА-2 и СА-3, которые растут на среде содержащей 10% хлорида натрия.

Выделенные и отобранные азотфиксирующие (СА-2 и СА-3) и фосфатсололюбилующие (ФС-3 и ФС-4) изоляты были идентифицированы при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии. Установлено, что штамм СА-2 на 99% идентичен штамму *Enterococcus casseliflavus*, а штамм СА-3 на 90% схож со штаммом *Staphylococcus lentus*. MALDI-TOF масс-спектрометрии показала, что фосфатсололюбилующие бактерии ФС-3 и ФС-4 на 99,9% идентичны штаммам *Acinetobacter baumannii* и *Enterobacter hormaechei* соответственно.

При проведении дальнейших исследований в серии модельных экспериментов изучили ростостимулирующее действие отобранных солеустойчивых азотфиксирующих СА-2 и СА-3 штаммов бактерий на всхожесть семян, рост и развитие проростков лядвенца (*Lotus corniculatus*) в условиях засоления (рисунок 1).

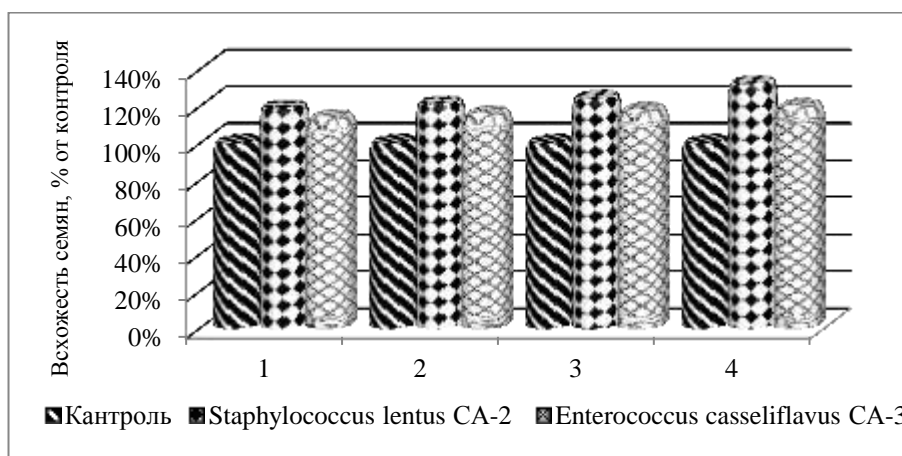


Рис. 1. Влияние солеустойчивых азотфиксирующих штаммов бактерий на всхожесть семян лядвенца (*Lotus corniculatus*) в условиях засоления

1 – 85,5 mM NaCl, 2 – 171 mM NaCl, 3 – 256,5 mM NaCl, 4 – 342 mM NaCl

Как видно из рисунка 2 обработка семян лядвенца галотолератным штаммом *Staphylococcus lentus* CA-2 оказывает стимулирующий эффект на прорастание семян в условиях засоления. В вариантах опыта с концентрацией хлорида натрия 85,5 и 171мМ всхожесть семян выше на 19 и 21% (соответственно) по сравнению с контролем без обработки в условиях засоления. Солеустойчивый азотфиксирующий штамм *Staphylococcus lentus* CA-2 также оказывает положительный эффект на всхожесть семян лядвенца в вариантах опыта с концентрацией хлорида натрия 256,5 и 342 мМ. Он стимулирует прорастание семян на 24 и 32 % (соответственно) по отношению к контролю без обработки в условиях засоления.

Обработка семян солеустойчивым азотфиксирующим штаммом *Enterococcus casseliflavus*

CA-3 также оказывает позитивный эффект на всхожесть семян лядвенца в условиях засоления. В опытах с концентрацией хлорида натрия 85,5 и 171 мМ штамм CA-3 стимулирует всхожесть на 14 и 16 % (соответственно) по сравнению с контролем без обработки в условиях засоления. В опыте с концентрацией хлорида натрия 256,5 и 342 мМ штамм *Enterococcus casseliflavus* CA-3 простимулировал всхожесть семян на 18 и 20% (соответственно) по отношению к контролю без обработки в условиях засоления.

В условиях лабораторного опыта нами изучено влияние галотолератных фосфатсольбилизирующих бактерий на всхожесть семян лядвенца в условиях засоления (рисунок 2).

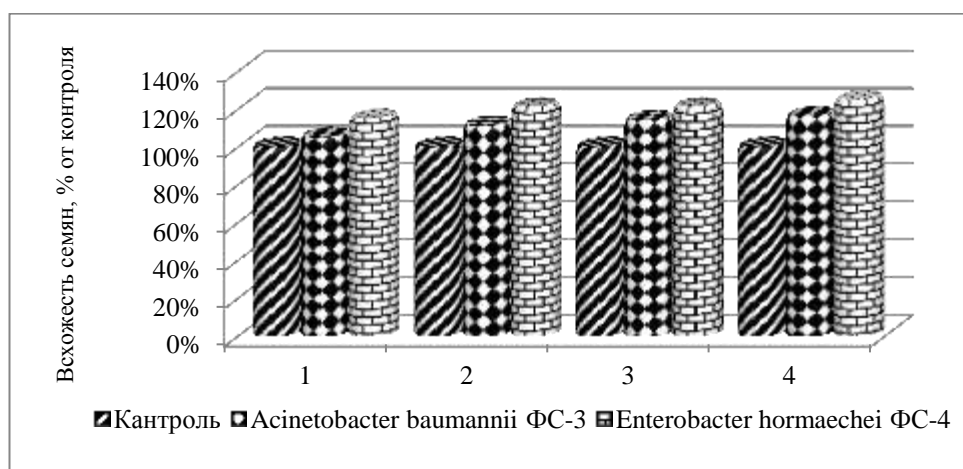


Рис. 2. Влияние солеустойчивых фосфатсольбилизирующих штаммов бактерий на всхожесть семян лядвенца (*Lotus corniculatus*) в условиях засоления  
1 – 85,5мМ NaCl, 2 – 171мМ NaCl, 3 – 256,5 мМ NaCl, 4 – 342 мМ NaCl

Обработка семян солеустойчивым фосфатсольбилизирующим штаммом *Enterobacter hormaechei* FC-4 оказывает позитивный эффект на всхожесть семян лядвенца в условиях засоления. В опытах с концентрацией хлорида натрия 85,5 и 171 мМ штамм FC-4 стимулирует всхожесть на 15 и 21 % (соответственно) по сравнению с контролем без обработки в условиях засоления. В опыте с концентрацией хлорида натрия 256,5 и 342 мМ штамм *Enterobacter hormaechei* FC-4 простимулировал всхожесть семян на 21 и 25% (соответственно) по отношению к контролю без обработки в условиях засоления.

Как видно из рисунка 2 обработка семян лядвенца галотолератным фосфатсольбилизирующим штаммом *Acinetobacter baumannii* FC-3 оказывает стимулирующий эффект на прорастание семян в условиях засоления. В вариантах опыта с концентрацией хлорида натрия 85,5 и 171мМ всхожесть семян выше на 5 и 11% (соответственно) по сравнению с контролем без обработки в условиях засоления.

Солеустойчивый фосфатсольбилизирующим штамм *Acinetobacter baumannii* FC-3 оказывает положительный эффект на всхожесть семян лядвенца в вариантах опыта с концентрацией хлорида натрия 256,5 и 342 мМ. Он

стимулирует прорастание семян на 14 и 16 % (соответственно) по отношению к контролю без обработки в условиях засоления.

Влияние малых доз (85,5 и 171мМ) NaCl на всхожесть семян лядвенца оказывает наименее негативное влияние по сравнению с концентрацией хлорида натрия 256,5-342мМ.

## Выводы

Из образцов дерново-подзолистой почвы, отобранной в районе действия ОАО «Беларуськалий», выделено и отобрано 2 азотфиксирующих изолята, которые хорошо растут на безазотных средах Эшби и Birk'a и имеют в геноме ген *nifH*, служащий доказательством принадлежности выделенных галотолерантных бактерий к азотфиксаторам. Из числа фосфатсольбилизирующих микроорганизмов отобрано 2 изолята бактерий, которые хорошо растут на глюкозо-аспарагиновой среде, образуя на вторые сутки культивирования, образуют зоны «галло» 5-8 мм, растут на среде, содержащей хлорид натрия в концентрации 10%.

Выделенные и отобранные азотфиксирующие (CA-2 и CA-3) и фосфатсольбилизирующие (FC-3 и FC-4) изоляты были идентифицированы при помощи

MALDI-TOF масс-спектрометрии: *Staphylococcus lentus* СА-2 и *Enterococcus casseliflavus* СА-3, *Acinetobacter baumannii* ФС-3 и *Enterobacter hormaechei* ФС-4.

Наибольший положительный эффект на рост и развитие бобовых трав в условиях засоления оказали штаммы *Staphylococcus lentus* СА-2 и *Enterobacter hormaechei* ФС-4. Штаммы СА-2 и ФС-4 наиболее активно стимулирует всхожесть семян лядвенца на 35 и 25%, по сравнению с контролем без обработки в условиях засоления.

Таким образом, выделенные и отобранные солеустойчивые азотфиксирующие и фосфатсолубилизирующие штаммы, оказывают стимулирующий эффект на рост растений в условиях засоления и могут быть перспективны в технологии фиторекультивации засоленных почв, в случае их непатогенности для человека и животных.

#### Литература

- BOONCHAN, S., BRITZ, M.L., STANLEY, G.A. Degradation and mineralization of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, Vol. 66, № 3, p. 1007-1017.
- CATON, T.M., WITTE, L.R., NGYUEN, H.D. Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the great salt plains of Oklahoma. *Microbial Ecology*, 2004, Vol. 8, № 48, p. 449-462.
- CHEN, W.M., LEE T.M., LAN, C.C. Chiu-Ping Cheng Characterization of halotolerant rhizobia isolated from root nodules of *Canavalia rosea* from seaside areas. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 2000, Vol. 34, p. 9-16.
- HEDI, A., SADAFI, N., FARDEAUL, M.L. Studies on the biodiversity of halophilic microorganisms isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under aerobic conditions. *International Journal of Microbiology*, 2009, Vol. 2009, p. 1-17.
- SOLTANI TOOLAROOD, A.A., ALIKHANI, H.A., SALEHI, G.H. et al. Genetic diversity and phylogeny of alfalfa nodulating rhizobia assessed by *nifH* and *nodA* genes. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 2012, Vol. 3, №7, p. 1470-1476.
- ВОЗНЯКОВСКАЯ, ЮМ. *Микрофлора растений и урожай*. Ленинград, 1969, с. 14-22.
- ГЕРХАРД, Ф. *Методы общей бактериологии*, в 3 т. Москва, 1983, Т. 2, 420 с.
- ЖУМАРЬ, ПВ. ЧЕРТКО, НК. Способы повышения эффективности использования техногенно-засоленных почв и выращивания сельскохозяйственных культур. *Приемы повышения плодородия почв и эффективности удобрений: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвященной 130-летию со дня рождения академика Я.Н. Афанасьева*. Горки, 2007, с.124-127.
- ТЕППЕР, ЕЗ., ШИЛЬНИКОВА, ВК., ПЕРЕВЕРЗЕВА, ГИ. *Практикум по микробиологии*. Москва, 2004, 256 с.

Nadezhda Naumovich, Zinaida Aleschenkova

#### Isolation and characterization of haloresistant nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria

##### Summary

Supply into soil of anthropogenic activity products – organic and mineral substances, xenobiotics and other waste materials leads to reduction of total arable land area and loss of its fertility. Salinization caused by application of inappropriate irrigation methods, increased proportion of arid and polluted territories may be referred to one of the sharpest challenges facing contemporary agronomists. Soil saturation with readily soluble mineral salts adversely affects growth and productivity of tilled cultivars. Soils exposed to elevated salinity and technogenic load make up the habitat for unique microbiota capable to survive in extreme environmental media. It appears therefore that keen interest of researchers is focused on microorganisms adapted to withstand high sodium chloride concentrations. Strains of phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria were isolated from soil specimens sampled near Starobin potash deposit exploited by Belaruskali mining concern. The microbial cultures were further screened for the ability to grow on the medium containing 10% sodium chloride and stimulate growth and development of birds-foot trefoil (*Lotus corniculatus*) in saline media. The selected halotolerant nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing isolates were characterized and identified using MALDI-TOF technique. Isolated and selected strains of halotolerant nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria may be potentially engaged in formulation of inocula and further used to technogenic salinization, provided they are not pathogenic for humans and animal.

*Salinization, soil, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing microorganisms*

Получено в марте 2018 г., подписано в печать в апреле 2018 г.

**Надежда НАУМОВИЧ.** Младший научный сотрудник Института микробиологии НАН Беларуси. Адрес: ул. ак. Купревича, 2, 220141, Минск, Беларусь. Тел. 8017-2659967, e-mail: [naumovichnadezda@yandex.ru](mailto:naumovichnadezda@yandex.ru)

**Nadezhda NAUMOVICH.** Institute of Microbiology Academy of Sciences (NAS), junior researcher. Address: Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Belarus. Tel/8017-2659967, e-mail: [naumovichnadezda@yandex.ru](mailto:naumovichnadezda@yandex.ru)

**Зинаида АЛЕЩЕНКОВА.** Доктор биологических наук, главный научный сотрудник Института микробиологии НАН Беларуси. Адрес: ул. ак. Купревича, 2, 220141, Минск, Беларусь. Тел. 8017-2659967, e-mail: [aleschenkova@mbio.bas-net.by](mailto:aleschenkova@mbio.bas-net.by)

**Zinaida ALESCHENKOVA.** Institute of Microbiology Academy of Sciences (NAS), doctor of biological sciences, Address: Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Belarus. Tel/8017-2659967, e-mail: [aleschenkova@mbio.bas-net.by](mailto:aleschenkova@mbio.bas-net.by)