

КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ, ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ РОСТА РАСТЕНИЙ**

Учебно-методическое пособие



Казань – 2022

УДК 579.22
ББК 28.4

Печатается по решению Учебно-методической комиссии
Института фундаментальной медицины и биологии «Казанского
(Приволжского) федерального университета»
Протокол № 1 от 28.08.2022

Рецензент
докт.биол.наук, проф. О.Н. Ильинская

Использование бактерий, продуцентов биологически активных веществ для оптимизации роста растений: учебно-методическое пособие // Т.В. Григорьева, И.В. Хиляс, А.В. Лайков / Казань: Изд-во Казан. университета, 2022. – 19 с.

Пособие разработано к спецдисциплинам по микробиологии, биохимии, биотехнологии. В пособии охарактеризованы основные механизмы положительного влияния бактерий, обитающих в прикорневой зоне, на рост и развитие растений. Рассмотрены примеры прямого и опосредованного влияния ризобактерий на растения, включающие участие бактерий в минеральном питании растений, гормональной стимуляции роста и в защите растений от стресса и болезней. Приведены методы исследования ризосферных микробных сообществ с точки зрения численности и биохимической активности отдельных представителей, обуславливающих стимуляцию роста растений.

Учебно-методическое пособие предназначено для бакалавров биологов, изучающих курсы «Микробиология и вирусология», «Прокариоты в биосфере» и «Частная микробиология и систематика микроорганизмов», «Прикладная микробиология».

УДК 579.22
ББК 28.4

© Издательство Казанского университета, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. Разнообразие бактерий, стимулирующих рост растений (PGPR).	5
2. Механизмы положительного влияния PGPR на растения.	6
2.1 Прямая стимуляция роста растений.	6
2.1.1 Продукция фитогормонов.	6
2.1.2 Фиксация молекулярного азота из атмосферы.	7
2.1.3 Повышение доступности фосфора для растений.	8
2.2 Опосредованная стимуляция роста растений.	8
2.2.1 Деградация загрязнений.	8
2.2.2 Защита от фитопатогенов.	9
2.2.3 Продукция сидерофоров.	9
2.2.4 Синтез антибиотиков.	10
3. ЗАДАЧИ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ	10
Задача 1. Оценка микробного сообщества ризосферы злаковых растений. Выделение чистых культур ризобактерий.	10
Задача 2. Определение индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) (гетероауксина) колориметрическим методом.	11
Задача 3. Определение индолил-3-уксусной кислоты методом ВЭЖХ.	12
Задача 4. Определение индолил-3-уксусной кислоты масс-спектрометрией (LC/MS/MS).	13
Задача 5. Оценка азотфиксирующей способности бактерий методом газовой хроматографии.	14
Задача 6. Качественная оценка фосфатмобилизирующей активности.	15
Задача 7. Антагонистическая активность в отношении фитопатогенов.	16
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	17

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АГЛ – N-ацетил-гомосерин лактон

АТФ — аденозинтрифосфат

ГК – гибберелловая кислота

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ИУК – индолил-3-уксусная кислота

РНК — рибонуклеиновая кислота

рРНК — рибосомная РНК

т.п.н. — тысяч пар нуклеотидов

АФМ – антигрибные метаболиты (anti-fungal metabolite)

ISR – индуцированная системная устойчивость (induced systemic resistance)

PGPR – ризобактерии, стимулирующие рост растений (plant growth promoting rhizobacteria)

Единицы измерения:

г — грамм

л — литр

м — метр

М — моль

мин — минута

мл — миллилитр

мг — миллиграмм

мкл — микролитр

мкМ — микромоль

мм — миллиметр

мМ — миллимоль

об/мин — обороты в минуту

сек — секунда

см — сантиметр

ВВЕДЕНИЕ

В ризосфере, которая представляет собой корни растений и тесно прилегающее к ним пространство, плотность микробного населения, как правило, на несколько порядков выше, чем в отсутствие растений. Некоторые ризобактерии способны не только получать выгоду от сожительства с растениями в виде дополнительного питания в составе корневых экссудатов, но и прямо или косвенно приносить пользу растениям, в конечном счете, увеличивая их рост. Такие ризобактерии, способные стимулировать рост растений (*plant-growth-promoting rhizobacteria* (PGPR)), могут быть условно классифицированы в соответствии с положительными эффектами, которые они оказывают, и механизмами, лежащими в основе этих эффектов. К прямым эффектам принято относить гормональную стимуляцию, увеличение поступления питательных веществ в растения и биодegradацию ксенобиотиков. Опосредованное благотворное воздействие бактерий связано с подавлением болезней и повышением устойчивости растений к стрессовым факторам

Таким образом, ризобактерии могут выступать в роли фитостимуляторов, биоудобрений, деструкторов токсикантов, а также противопатогенных и иммуномодулирующих факторов для растений.

Возможность широкомасштабного применения полезных ризобактерий путем инокуляции семян является альтернативой химическим удобрениям и пестицидам, которые часто загрязняют окружающую среду. К основным областям применения бактерий, стимулирующих рост растений, относятся: сельское хозяйство, садоводство, лесоразведение и фиторемедиация (технология восстановления загрязненных объектов при помощи растений). В связи с высокой практической значимостью данной группы микроорганизмов спектр известных представителей и сведения о механизмах положительного влияния постоянно расширяются.

В данном пособии рассмотрены наиболее изученные эффекты и распространенные методы исследования ризобактерий, оказывающих положительное влияние на растения.

1. Разнообразие бактерий, стимулирующих рост растений.

Наиболее ярким и хорошо изученным примером прямого положительного влияния бактерий на растения является симбиотическая фиксация атмосферного азота клубеньковыми бактериями бобовых растений (ризобиями). К последним относятся граммотрицательные бактерии родов *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium* [Игнатов, 2005]. Начиная с 80-х годов прошлого столетия объектом подробных исследований становятся ассоциативные взаимоотношения между растениями и микроорганизмами, не имеющие четких морфологических очертаний, но проявляющие явные признаки взаимовыгодного сожительства. Классическим примером азотфиксирующего

ассоцианта растений стали представители рода *Azospirillum*. Дальнейшие поиски иных ассоциативных азотфиксирующих микроорганизмов позволили выявить высокую частоту встречаемости таких представителей среди семейств *Azotobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Spirillaceae*. Наиболее изученные несимбиотические diaзотрофные бактерии представлены родами: *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Rhizobium* [Kennedy et al., 2004].

На примере хорошо изученных представителей из рода *Azospirillum* показано, что наряду с биологической фиксацией азота стимуляция роста растений является многофакторным эффектом, связанным со способностью азоспирилл синтезировать ряд фитогормонов, способствовать поглощению растениями из почвы фосфора, калия, азота, железа. Азоспириллы активно синтезируют и экскретируют ряд витаминов, таких как рибофлавин, тиамин, пантотеновая кислота.

Практически невозможно достоверно точно установить, какой из факторов жизнедеятельности того или иного штамма является ведущим в феномене его стимулирующего воздействия на определенный вид растения и в определенных условиях. В экспериментах с мутантными штаммами свободноживущих diaзотрофных бактерий с повреждениями в генах, ответственных за биологическую фиксацию атмосферного азота, удалось установить роль азотфиксирующей способности как ключевого фактора в стимуляции роста растений (Kennedy et al., 2004).

Еще одним фактором прямого воздействия микроорганизмов на рост растений является продукция фитогормонов.

2. Механизмы положительного влияния PGPR на растения.

2.1 Прямая стимуляция роста растений.

2.1.1 Продукция фитогормонов.

Известно, что на развитие растений могут сильно и многопланово влиять фитогормоны: ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая кислота и этилен. К образованию индоллил-3-уксусной кислоты (ИУК), относящейся к фитогормонам ауксинового ряда и стимулирующей развитие корневой системы растений, способны многие ассоциированные с растениями микроорганизмы из родов *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* [Боронин, 1998; Tsavkelova et al., 2007; Akbari et al., 2007]. По-видимому, основным условием синтеза ИУК ризосферными бактериями является наличие предшественника ИУК – трипрофана в корневых экссудатах [Кравченко, 2004; Costacurta, Vanderleyden, 1995]. Наиболее хорошо изучена способность к синтезу ИУК, которая стимулирует развитие корневой системы растений, у ризосферных псевдомонад. Однако большинство штаммов псевдомонад, стимулирующих рост растений, продуцируют ИУК в незначительных количествах (3-5 мкг/мл), тогда как псевдомонады, угнетающие рост растений,

продуцируют ИУК до 20 мкг/мл. Исследования синтеза ИУК у PGPR из рода *Pseudomonas* демонстрируют возможность получения генетически модифицированных штаммов, способных к повышенному синтезу ИУК [Мордухова, 1998].

Перенос некоторых плазмид биодegradации нафталина также способствовал увеличению уровня синтеза ИУК у ризосферных псевдомонад, что обусловлено наличием в составе этих плазмид гена, ответственного за синтез нафталин-диоксигеназы (первого фермента на пути окисления нафталина), вовлекаемой в процесс биосинтеза ИУК [Боронин, 1998].

Этилен также очень важен для роста растений. Установлено, что чрезмерное количество этилена приводит к стрессу и угнетает рост [Morgan and Drew, 1997]. PGPR позитивно влияют на рост растений путем поглощения аминокислоты, которая является непосредственным предшественником этилена (через синтез фермента 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат дезаминазы), что приводит к снижению содержания этилена в растениях, подвергнутых стрессу [Reed, Glick, 2005].

Некоторые микроорганизмы, обитающие в ризосфере растений, способны синтезировать цитокинины. Цитокинины характеризуются способностью индуцировать деление растительных клеток, являясь наиболее активными среди известных рострегулирующих веществ. Показано образование цитокининов бактериями из родов *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* [Кудоярова, 1990].

2.1.2 Фиксация молекулярного азота из атмосферы.

Азотное питание растений в природных экосистемах в основном происходит за счет симбиотических, ассоциативных и свободноживущих микроорганизмов, способных восстанавливать молекулярный азот воздуха. По данным ряда исследований [Умаров, 1986], фиксировать атмосферный азот могут от 50 до 80% микроорганизмов. Обычно ризосферные популяции представляют собой смесь разных азотфиксирующих бактерий. Наиболее типичными представителями почвенного ризосферного сообщества аэробных азотфиксаторов являются бактерии из родов *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Enterobacter* и *Pseudomonas*. Показана их способность проявлять положительный хемотаксис к веществам, входящим в корневые выделения растений и прикрепляться к корням [Емцев, Чумаков, 1988]. Согласно опубликованным данным [Исмаилов, 1988], нефтяное загрязнение почвы создает условия для защиты микробной нитрогеназы от кислорода, активизируя, таким образом, процесс азотфиксации. На основании этого можно сделать вывод, что наличие деструктивного потенциала у азотфиксаторов может служить важным преимуществом перед другими микроорганизмами и позволяет рассматривать их в качестве перспективных интродуцентов для биоремедиации почв.

2.1.3 Повышение доступности фосфора для растений.

Фосфор присутствует в почве в виде органических (компоненты растительного, животного и микробного происхождения) и неорганических соединений. Из общего пула фосфорных соединений почвы только около 5% непосредственно доступны растениям. Некоторые микроорганизмы, в особенности микоризные грибы и некоторые ризобактерии, способны усиливать поступление фосфора в растения. Бактерии могут использовать две системы повышения концентрации экзогенного фосфата: 1) за счет гидролиза органических фосфатов под действием фосфатаз; 2) путем растворения минеральных фосфатов за счет продукции кислот. Бактерии родов *Pseudomonas*, *Azospirillum* способны к эффективному растворению фосфорных соединений [Боронин, 1998; Игнатов, 2005].

2.2 Опосредованная стимуляция роста растений.

2.2.1 Деградация загрязнений.

Большинство загрязняющих веществ обладают фитотоксичностью и способны угнетать рост растений. В лабораторных экспериментах с почвой, загрязненной дизельным топливом, показано, что углеводороды значительно подавляют прорастание и рост растений [Adam, Duncan, 2002]. Хлорбензойная кислота и полихлорированные бифенилы являются ингибиторами роста большого числа степных трав, хотя такие травы часто рассматривались в качестве потенциально пригодных для фиторемедиации [Aprill, Sims, 1990; Siciliano, Germida, 1997]. Для разрешения этой проблемы некоторые авторы использовали бактериальные инокулы для уменьшения фитотоксичности загрязнений в почве.

Например, было установлено [Siciliano, Germida, 1997], что инокуляция семян Даурского дикого риса двумя псевдомонадами позволяла растениям расти в почве загрязненной смесью 2,3-дихлорбензойной кислоты и 3-хлорбензойной кислотой, но не приводила к снижению уровня загрязненности почвы. Таким образом, бактерии уменьшали фитотоксичность хлорбензойных кислот, но не разрушали их.

В свою очередь, бактерии могут снижать фитотоксичность путем деструкции контаминантов. Так, инокуляция семян просо (*Panicum milaceum*) штаммом псевдомонады SR3, способной разрушать пентахлорофенол, снижало уровень фитотоксичности и способствовало росту растений [Pfender, 1996]. Подобно этому, инокуляция семян гороха бактериями-деструкторами пестицида дикамба, позволяла растениям расти в почве, загрязненной этим пестицидом [Krueger *et al.*, 1991]. Таким образом, одной из возможных ролей PGPR в системе фиторемедиации является снижение фитотоксичности загрязнений, что способствует росту растений и развитию эффективного сообщества ризосферных деструкторов.

Ризобактерии могут разрушать различные вещества [Zablotowica *et al.*, 1991]. В этой связи, существуют примеры инокуляции PGPR, потенциально способных увеличивать деструктивную активность ризосферы. Обнаружено, что *Azotobacter sp.* фиксировал N₂ в аэробных условиях и использовал монохлорацетат в качестве единственного источника углерода и энергии. Аналогичным образом, *Rhizobium sp.* разрушал органофосфатные пестициды для извлечения фосфора [Liu *et al.*, 1991].

Вместо селекции бактерий-деструкторов и оценки их эффективности, некоторые исследователи предпринимают попытки модифицировать микроорганизмы с целью деструкции загрязнителей. Так, был вставлен транспозон, содержащий ген *bph*, который кодирует деструкцию бифенила в геном псевдомонад [Crowley *et al.*, 1996]. Оказалось, что бактерии колонизирующие ризосферу сахарной свеклы и экспрессирующие продукт гена *bph*, были эффективны в отношении стимуляции роста растений и деструкции ксенобиотика.

2.2.2 Защита от фитопатогенов.

К настоящему времени выделено множество штаммов PGPR, подавляющих или замедляющих рост и развитие фитопатогенных грибов и бактерий. Бактерии рода *Pseudomonas* - одна из наиболее изученных групп бактерий антагонистов почвенных фитопатогенов. Механизмы антагонистических взаимодействий PGPR и фитопатогенов разнообразны по своей природе. Рассмотрим два из них, наиболее хорошо изученных и важных с точки зрения практического использования ризобактерий.

2.2.3 Продукция сидерофоров.

Хорошо известна способность псевдомонад продуцировать метаболиты, называемые сидерофорами, которые выполняют функцию связывания и транспорта железа в клетки бактерий. Сидерофоры флуоресцирующих псевдомонад имеют различную химическую природу и обладают, как правило, высоким сродством к трехвалентному железу, образуя с ним стабильные комплексы, недоступные для использования фитопатогенами. Фитопатогены продуцируют собственные сидерофоры, однако, в отличие от сидерофоров псевдомонад, они гораздо медленнее связываются с ионами железа, и псевдомонады выигрывают в конкурентной борьбе с фитопатогенами за такой жизненно важный элемент как железо. Таким образом, связывание железа сидерофорами приводит к ограничению роста фитопатогенов и улучшению роста растений.

Важная роль сидерофоров в антагонистических взаимоотношениях ризосферных псевдомонад с почвенными фитопатогенами и в стимуляции роста растений неоднократно доказана при инокуляции растений штаммами, продуцирующими сидерофоры, и их мутантами, дефектными по синтезу сидерофоров. При этом отмечено не только супрессирующее действие сидерофоров на фитопатогены, но и стимулирующее воздействие на растения. Это

подтверждается также в экспериментах с очищенным сидерофором одного из штаммов *Pseudomonas putida* В10 – псевдобактином, который оказывает стимулирующее действие на рост картофеля.

Следует отметить, что антагонизм псевдомонад в отношении фитопатогенов, обусловленный конкуренцией за железо, эффективен только при низком содержании железа в почве. Резко снижается защитный эффект сидерофор-продуцирующих штаммов в кислых почвах, где растворимость железа и его доступность для всех микроорганизмов возрастают. Избыток железа приводит также к репрессии синтеза сидерофоров

2.2.4 Синтез антибиотиков.

PGPR *Pseudomonas* способны продуцировать широкий спектр вторичных метаболитов, в том числе антибиотиков [Смирнов, Киприанова, 1990]. Наиболее изученными антибиотиками, играющими важную роль в супрессии болезней растений, являются антибиотики группы феназинов, флороглюцинов, пиолитеорин, пирролнитрин и оомицин А. Роль продукции антибиотиков в защите растений непосредственно в почве была показана в исследованиях Л. Томашова по бактеризации семян пшеницы штаммом *P. fluorescens* 2-79 и его дефектным по синтезу феназинового антибиотика (феназин-1-карбоновой кислоты) мутантом. Защиту растений от одного из возбудителей корневой гнили обеспечивал только исходный штамм с нормальной продукцией антибиотика, тогда как мутантный штамм в значительной степени утрачивал эту способность. Следует отметить, что мутанты PGPR *Pseudomonas*, характеризующиеся повышенным синтезом антибиотика, не улучшали защиты растений от фитопатогенов. Недавно была охарактеризована генетическая система, контролирующая биосинтез феназин-1-карбоновой кислоты у штамма *P. fluorescens* 2-79. Предложена принципиальная схема пути биосинтеза этого антибиотика [Мавроди с соавт., 1997].

3. ЗАДАЧИ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

Задача 1. Оценка микробного сообщества ризосферы злаковых растений.

Выделение чистых культур ризобактерий.

Цель - оценка разнообразия бактериального сообщества ризосферы злаковых растений.

Схема эксперимента.

1. Для получения исследуемого материала (ризосферы), высевают предварительно пророщенные семена злаковых растений (например: овес или ячмень) в почву с влажностью 50-60%.

2. Через 5-7 дней растения аккуратно с помощью стерильного шпателя извлекают из почвы, отделяют стерильными ножницами корни с налипшей на них почвой.

3. На стерильном часовом стекле делают навеску 0,5 г корней с остатками почвы и помещают ее в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды. Затем интенсивно взбалтывают на качалке 10 минут при 100 об/мин, чтобы тщательно смыть микробные клетки с поверхности корней.

4. Для качественной и количественной оценки состава ризосферного сообщества проводят поверхностный посев полученной путем серийных разведений суспензии на твердую питательную (МПА) и селективную среду (Эшби).

5. Обработка результатов: через 7 дней производят подсчет колоний и микроскопию отдельных колоний микроорганизмов. Проводят окрашивание колоний по Граму, оценивают форму колоний, подвижность, формирование капсул, эндоспор.

6. Пересев отдельных колоний на твердую питательную среду для получения чистой культуры.

Материалы и оборудование:

Почва, семена злаковых культур растений, стаканчики объемом не менее 200 см³, колбы на 100 мл, чашки Петри, пипетки на 1 мл, шпатель Дрегалевского, ножницы, часовое стекло, микробиологическая петля, среда МПА, Эшби, стерильная вода, пробирки, весы.

Задача 2. Определение индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) (гетероауксина) колориметрическим методом.

Цель - исследование способности чистых культур ризосферных бактерий продуцировать фитогормоны ауксинового ряда методом Сальковского. Метод основан на способности индольных соединений образовывать окрашенные комплексы с железом (III).

Схема эксперимента.

1. Для получения накопительной культуры бактерии отсевают на жидкую среду МПБ. Культивируют 24ч, 30⁰С, 150 об/мин.

2. Инокулируют 100 мкл накопительной культуры в 10 мл минеральной среды (MS). Культивируют 48ч, 30⁰С, 150 об/мин.

3. Перед началом тестирования продукции ИУК оценивают плотность бактериальной культуры с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) при 590 нм. 1,5 мл культуральной жидкости центрифугируют при 12000 об/мин, 5 мин. Полученный супернатант вносят к реагенту Сальковского (2% 0.5М FeCl₃ в 35% H₂SO₄) в соотношении 1:2.

4. Реакция должна протекать в течение 30 мин, в защищенном от света месте, при комнатной температуре.

5. Через 30 мин интенсивность розовой окраски измеряют при помощи спектрофотометра при 530 нм.

Учет и обработка результатов.

Для определения концентрации ИУК в исследуемых образцах необходимо построить калибровочную кривую. Для построения калибровочной кривой необходимо растворить ИУК в этаноле (стоковый раствор). Приготовить серию разведений 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.07, 0.1 мкг/мл ИУК.

Материалы и оборудование:

Спектрофотометр, пробирки, пипетки.

Состав минеральной среды (MS) (г/л): K_2HPO_4 – 1.36; Na_2HPO_4 – 2.13; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; следовые элементы; 5мМ L-триптофан или раствор с нафталином, вода дистиллированная – 1л. После автоклавирования к среде MS добавляют 5мМ раствор L-триптофана из расчета 50 мл/л.

В состав раствора с 5мМ L-триптофаном входят (г/100 мл): глюкоза – 10; L-триптофан – 1; дрожжевой экстракт – 0.1; вода дистиллированная – 100мл.

Задача 3. Определение индолил-3-уксусной кислоты методом ВЭЖХ.

Цель. Проведение разделения ИУК методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Хроматограф: UHPLC UltiMate® 3000, оснащенный автоматическим пробоотборником, инжектором, диодным и флуоресцентным детектором.

Рекомендуемая колонка для хроматографического разделения: обращенно-фазовая Acclaim® PolarAdvantage II (PA2) C18, 5 μm , 250 x 4.6 мм.

Подвижная фаза: вода/ацетонитрил с 0.01% ТФУ (A=99.99% вода/0.01% ТФУ; B=80% ацетонитрил/19.99% вода/0.01% ТФУ).

Градиент:

Время, мин	Фаза	% соотношение
0-40	B	0-60
40-50	B	60-100
50-55	B	100

Скорость потока: 1 мл/мин.

Температура разделения: 22°C.

Детекция: при 220 нм, 260 нм, 435 нм, 650 нм, флуоресцентный детектор (возбуждение при 470 нм, эмиссия 530 нм).

Стандарты: индолил-3-уксусная кислота.

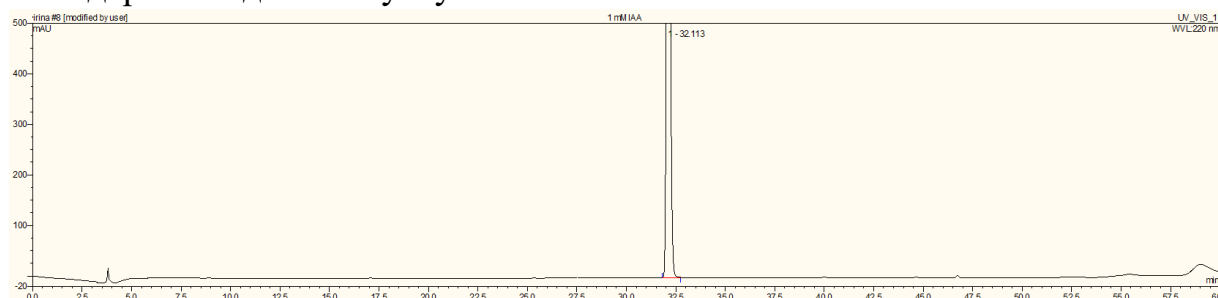


Рис. 1. ВЭЖХ хроматограмма индолил-3-уксусной кислоты детектируемой при 220 нм.

Задача 4. Определение индолил-3-уксусной кислоты масс-спектрометрией (LC/MS/MS).

Цель. Получение масс-спектров исходного иона ИУК и его дочерних ионов.

Хроматограф: масс-спектрометр ABSciex QTRAP 6500, комбинированный с высокоэффективным жидкостным хроматографом Agilent 1290 Infinity (LC/MS/MS System).

Колонка: ZORBAX Eclipse Plus C18 RR HD 2.1x50 mm 1.8-Micron (Agilent), Температура разделения: 40 °С.

Подвижная фаза: вода/ ацетонитрил/ муравьиная кислота (А=94,9% вода / 5% ацетонитрил / 0.1% муравьиная кислота; В=94,9%ацетонитрил / 5% вода / 0.1% муравьиная кислота).

Градиент:

Время, мин	Фаза	% соотношение
0-1	В	0-2
1-6	В	2-95
6-7	В	95
7-8	В	95-2
8-9	В	2

Скорость потока 400 мкл/мин.

Температура автосемплера 10 °С.

Спектры родительских (MS) и дочерних ионов (MS/MS) получают прямым забором раствора чистых веществ в масс-спектрометр с помощью шприцевого насоса.

Скорость потока 7 мкл/мин, режим работы - тройной квадруполь, тип сканирования Q1 MS и Product Ion (MS/MS).

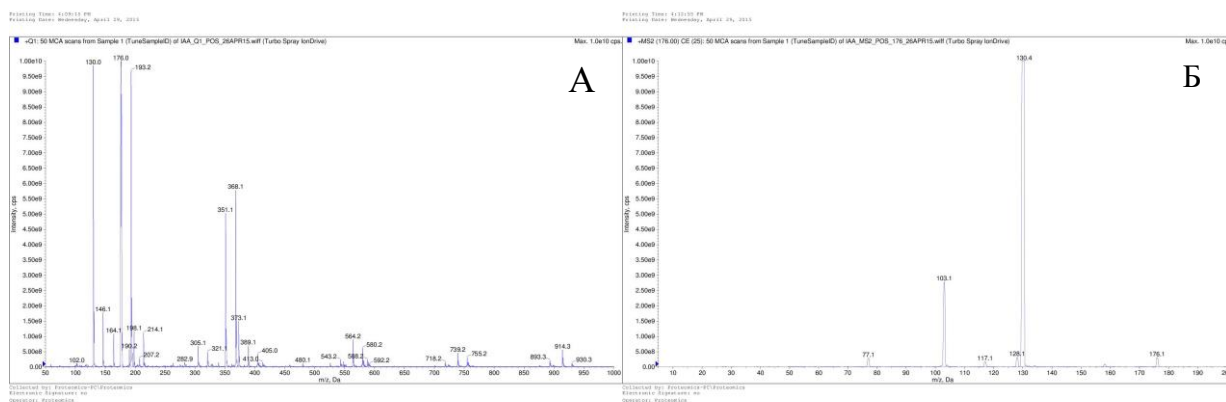


Рис. 2. (А) Масс-спектр ИУК (MS), (Б) масс-спектры дочерних ионов (MS/MS).

Количественное содержание ИУК определяют методом мониторинга множественных реакций (MRM), позволяющим селективно оценивать отдельные соединения. На основании спектра дочерних ионов выбирают MRM переход ИУК (Таблица 1).

Таблица 1. Данные фрагментационного анализа исходных и дочерних ионов ИУК.

Соединение	Исходный ион m/z	Дочерние ионы
Индолил-3-уксусная кислота	176.0	130.4; 103.1; 77.1

Задача 5. Оценка азотфиксирующей способности бактерий методом газовой хроматографии.

Цель. Исследование нитрогеназной активности бактериальных культур.

Метод газовой хроматографии позволяет определить наличие этилена в исследуемой смеси. Концентрация этилена, определенная с помощью газовой хроматографии, коррелирует с количеством восстановленного азота в смеси и позволяет оценить активность нитрогеназы. Нитрогеназа способна на ряду с восстановлением атмосферного азота неспецифически восстанавливать другие химические соединения с тройной связью, в частности ацетилен до этилена: $\text{HC}\equiv\text{CH}\rightarrow\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$.

Схема эксперимента.

1. Для получения накопительной культуры исследуемые бактерии отсеивают на жидкую среду Эшби. Культивируют 5 суток при 30⁰С, 150 об/мин.

2. 0.5 мл накопительной культуры вносят в пенициллиновые флакончики с 5 мл свежей среды Эшби. Инкубируют 24ч, при 30⁰С, в стационарных условиях.

3. До измерения нитрогеназной активности флаконы необходимо закрыть стерильными резиновыми пробками, уплотнить зажимами и ввести 10% ацетилена от объема газовой фазы. Инкубируют 1 ч при 30⁰С, в стационарных условиях.

4. После инкубации отбирают 0.5 мл газовой смеси и вводят в газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором. Разделение ацетилена и этилена происходит при 53⁰С на колонке Propak R.

Учет и обработка результатов:

Для количественного расчета этилена готовят калибровочную смесь. В герметичный сосуд объемом 500 мл вводят 1 мл этилена, что составляет 0.2% объема этилена в газовой фазе сосуда. Затем 0.5 мл газовой смеси стандарта анализируют на газовом хроматографе.

Расчет азотфиксирующей активности производят по формуле [Carone, Montoya, 2001; Теппер с соавт., 2004]:

$$A = \frac{P_{\text{опыта}}}{P_{\text{стандарта}}} * C_M * V_{\text{газ.ф}}, \text{ где}$$

$P_{\text{опыта}}$ - пик этилена в опыте; $P_{\text{стандарта}}$ - пик этилена в стандарте; C_M - молярная концентрация этилена в стандарте (нмоль мл⁻¹); $V_{\text{газ.ф}}$ - объем газовой фазы в опыте (мл).

Для пересчета активности в нмоль в мкг

$V = ((A * 28) / 3) * 10^{-3}$, где

28 – молекулярная масса азота, 3 – коэффициент перевода этилена в аммиак, 10^{-3} – множитель для пересчета.

Материалы и оборудование

Газовый хроматограф

Пенициллиновые флаконы с резиновыми пробками.

Задача 6. Качественная оценка фосфатмобилизирующей активности.

Цель. Исследование способности бактериальных культур (PGPR) повышать растворимость труднодоступных форм фосфора [Beneduzi *et al.*, 2008].

Схема эксперимента.

1. Приготовление селективной среды:

Раствор1: растворить 5г K_2HPO_4 в 50 мл дистиллированной воды, автоклавировать отдельно.

Раствор2: растворить 10г $CaCl_2$ в 100 мл дистиллированной воды, автоклавировать отдельно.

Глюкозо-дрожжевая среда (ГД), содержащая (г/л): глюкозы – 10; дрожжевого экстракта – 2; агара – 15. Автоклавировать отдельно.

В 850мл охлажденной до $50^{\circ}C$ ГД среды внести 50 мл **Раствора 1** и 100 мл **Раствора 2**. Разлить по 20 мл по чашкам Петри.

2. Бактериальные культуры можно наносить различными способами: посев уколом, внесением пипеткой оптимального объема бактериальной суспензии на поверхность чашки, внесением бактериальной суспензии в предварительно подготовленные отверстия в агаризованной среде. Культуральная жидкость исследуемых бактерий предварительно должна быть приведена к одинаковой оптической плотности ($A_{600\text{ нм}}=0.15$).

3. Бактерии, способные к растворению труднодоступных форм фосфора, образовывали зоны просветления среды вокруг лунок, величина которых отражает активность культуры. Измерение зон просветления проводят на 3 сутки.

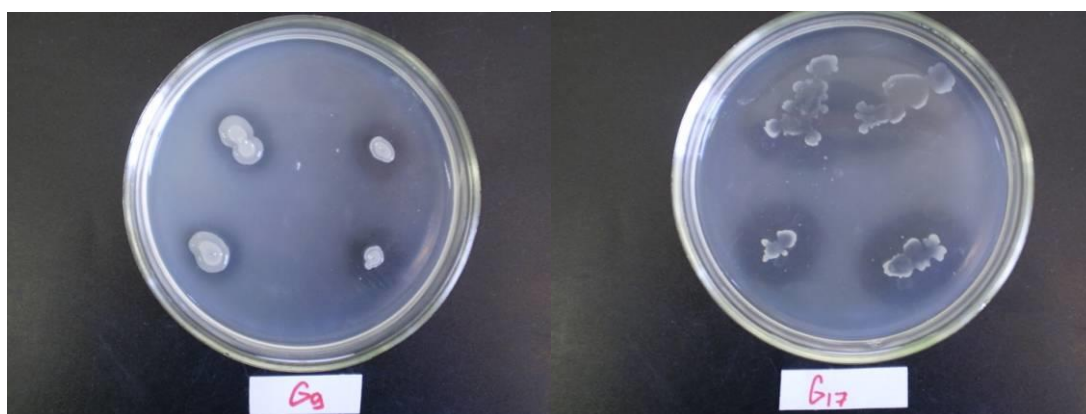


Рис.3. Исследование фосфатмобилизирующей активности штаммами PGPR, участвующих в растворимости труднодоступных форм фосфора.

Задача 7. Антагонистическая активность в отношении фитопатогенов.

Цель. Исследование способности бактериальных культур (PGPR) продуцировать метаболиты, подавляющих рост фитопатогенных микроорганизмов.

Схема эксперимента.

1. Приготовление богатой питательной среды: Картофельно-глюкозный агар (КГА), содержащий (г/л): сырой картофель - 200; глюкоза - 20; агар-агар - 20, вода водопроводная – 1 л.

2. В качестве фитопатогенных грибов использовали *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*

4. Для определения антагонистической активности посев фитопатогенного гриба делали уколом в центр чашки со средой КГА, посев PGPR - внесением бактериальной суспензии в объеме 25 мкл в предварительно подготовленные отверстия диаметром 8 мм. Культуральная жидкость исследуемых бактерий предварительно должна быть приведена к одинаковой оптической плотности ($A_{600\text{ нм}}=0.15$).

3. Инкубацию проводят при 30⁰С в течение 10-12 суток.

4. О величине антагонистической активности PGPR судили по зоне подавления роста фитопатогена, выраженной в мм.

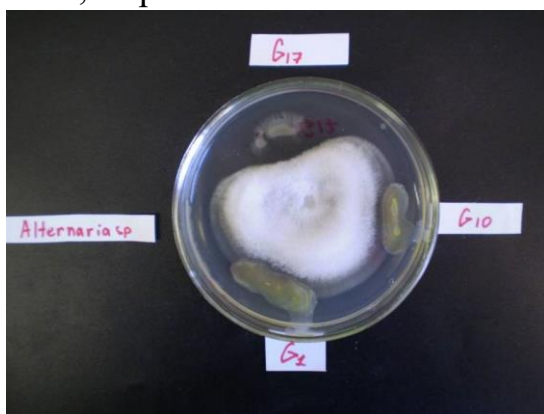


Рис. 4. Исследование антагонистической активности штаммами PGPR, в отношении фитопатогенного гриба *Alternaria sp.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боронин, А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений / А. М. Боронин // Соросовский образовательный журнал. – 1998. - №10. - С. 25-31.
2. Горюнова, Д. О. Определение стабильности плазмиды POS19 / Д. О. Горюнова, Л. А. Пшеницына, И. А. Кошелева, Ж. С. Бардинова, В. А. Сметанин, М. Т. Генгин // Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В.Г. Белинского. – 2008. – Т.14. – С.46-48.
3. Емцев, В.Т. Критерий ассоциативности для бактерий, находящихся в диазотрофном биоценозе с небобовыми растениями / В.Т. Емцев и М.И. Чумаков // Микробиол. Ж. - 1988. - Т. 50. - №.3. - С. 93-101.
4. Игнатов, В. В. Биологическая фиксация азота и азотфиксаторы / Игнатов В.В. // Соросовский образовательный журнал, №9 – 1998 – С. 28-33.
5. Исмаилов, Н.М. Микробиология и ферментативная активность в нефтезагрязненных почвах / Н. М. Исмаилов // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем / Н. М. Исмаилов под ред. М. А. Глазовской. – М.: Наука, 1988. – С. 42 - 56.
6. Кравченко, А.В. Роль триптофана в корневых экзометаболитах для фитостимулирующей активности ризобактерий / А. В. Кравченко, Т. С. Азарова, Н. М. Макарова, И. А. Тихонович // Микробиология. – 2004. – Т.73, №2. – С. 195 – 198.
7. Кудоярова, Г.Р. Иммуноферментная система для определения цитокининов / Г.Р. Кудоярова, С.Ю. Веселов, Н.И. Каровайко // Физиология растений. 1990. — Т.37, вып. 1.-С. 193-199.
8. Мавроди, Д.В. Структурно-функциональная организация генов *Pseudomonas fluorescens*, кодирующих ферменты биосинтеза феназин-1-карбоновой кислоты / Д.В. Мавроди, В.Н. Ксензенко, Б.М. Чатуев // Молекулярная биология. - 1997. - Т.31. - С. 76-82.
9. Смирнов, В.В. Бактерии рода *Pseudomonas* / В.В. Смирнов, Е.А. Киприанова.- Киев: Наук. думка, 1990.- С. 84 – 111.
10. Мордухова, Е.А. Синтез индолил-3-уксусной кислоты ризосферными псевдомонадами: Влияние плазмид биodeградации нафталина / Е. А. Мордухова, В. В. Кочетков, Ф. Я. Поликарпова, А. М. Боронин // Прикладная биохимия и микробиология. - 1998. Т.34, №3. - С. 287 – 292.
11. Умаров, М. М. Микробиологическая трансформация азота в почве / М. М. Умаров, А.В. Кураков, А.Л. Степанов.// Москва: ГЕОС - 2007. – С.67-73
12. Adam, G. Influence of diesel fuel on seed germination / G. Adam, H. Duncan // Environmental Pollution. – 2002. – V.120. – P.363-370.
13. Aprill, W. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil / W. April, R.C. Sims // Chemosphere. – 1990. –

V. 20. – P. 253-265.

14. Akbari, G.A. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of superior strains effects on wheat roots / G.A. Akbari, H.A. Arab, H. Alikhani, M.H. Arzanesh // World J. Agric. Sci.- 2007. – V.3. – P. 523–529.

15. Beneduzi, A. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brasil / A. Beneduzi, D. Peres, L.K. Vargas, M. H. Bodanese-Zanettini, L.-M. P. Passaglia // Microbiology.- 2008. - V. 159. – P. 244-250.

16. Crowley, D.E. Rhizosphere effects on biodegradation of 2 -5-dichlorobenzoate by a bioluminescent strain of rootcolonizing *Pseudomonas fluorescens* / D.E. Crowley, M.V. Brennerova, C. Irwin, V. Brenner, D.D. Focht // FEMS Microbiology Ecology.-1996.- V. 20.- P. 79-89.

17. Costacurta A., Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria // Critical reviews in microbiology. – 1995. – T. 21. – №. 1. – C. 1-18.

18. Husen, E. Screening of soil bacteria for plant growth promoting activities in vitro / E. Husen // Indonesian Journal of Agriculture Science.- 2003.- V.4.- N. 1.- P. 27-31.

19. Kennedy, I. R. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited / I.R. Kennedy, A. Choudhury, M. L. Kecskés // Soil Biology and Biochemistry. – 2004. – V. 36. – №. 8. – P. 1229-1244.

20. Krueger, J.P. Use of dicamba degrading microorganisms to protect dicamba susceptible plant species / J.P. Krueger, R.G. Butz, D.J. Cork // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1991. – V.39. – P.1000-1003.

21. Lalucat J. Biology of *Pseudomonas stutzeri* / J Lalucat, A Bennasar, R. Bosch, E. Garcia – Valdes, N. J. Palleroni // Microbiology and molecular biology reviews.– 2006. - P. 510–547.

22. Morgan, P.G. Ethylene and plant responses to stress / P.G. Morgan and M.C. Drew // Physiol. Plant. – 1997. – V.100. – P. 620–630.

23. Pfender, W.F. Microbial community structure and activity in wheat straw after inoculation with biological control organisms / W.F. Pfender, V.P. Fieland, L.M. Ganio and R.J. Seidler // Applied Soil Ecology.- 1996. - V.3.- N. 1.- P. 69-78.

24. Reed, M. L. E. Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons / M. L. E. Reed and B.R. Glick // Canadian Journal of Microbiology. – 2005. – V. 51. – №. 12. – P. 1061-1069.

25. Seoud, M. A. Biodegradation of Naphthalene by Free and Alginate Entrapped *Pseudomonas* sp. / M. A. Seoud, R. Maachi // Z. Naturforsch. – 2002. – V.58. – P.726-731.

26. Siciliano, S.D. Bacterial inoculants of forage grasses enhance degradation of 2-chlorobenzoic acid in soil / S.D.Siciliano, J.J. Germida // Environmental Toxicology

and Chemistry. – 1997. – V.16. – P.1098-1104.

27. Tsavkelova, E. A. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin / E.A. Tsavkelova, T. A. Cherdyntseva, S. G. Botina and A. Netrusov // Microbiological research. – 2007. – V. 162. – №. 1. – P. 69-76.

28. Zablutowica, R.M. Compatibility of plant growth promoting rhizobacterial strains with agrochemicals applied to seed / R.M. Zablutowica, C.M. Press, N. Lyng, G.L. Brown, J.W. Kloepper // Canadian Journal of Microbiology.- 1991.- V. 38.- P. 45-50.