

## Оптимизация способа стерилизации растительных образцов для выделения эндофитных микроорганизмов

Екатерина Соловьева, Лилия Картыжова, Зинаида Алещенкова, Ирина Шавейко

Институт микробиологии НАН Беларуси

Эндофиты – микроорганизмы, населяющие внутренние растительные ткани, не причиняя им вреда, оказывающие многогранное положительное влияние на растение-хозяина и являющиеся перспективными биообъектами защитного и стимулирующего действия. Для выявления эндофитов нами были отработаны способы стерилизации растительных объектов (корни, стебель, листья и семена сои, пшеницы). Методы стерилизации растительного материала оптимизировали в лабораторных условиях с использованием стерилизующих агентов разной концентрации: соединения, служащие источником активного хлорамина, гипохлориты кальция и натрия; ртутьсодержащие составы (диоксид, растворы, включающие сулему); нитрат серебра совместно с детергентом; концентрированная серная кислота; перекись водорода. Наиболее оптимальным способом стерилизации было использование 50% раствора  $H_2O_2$ . Отработанная технологическая схема стерилизации поверхности растительных образцов обеспечила выделение 102 изолятов агрономически ценных групп эндофитных бактерий сельскохозяйственных культур.

*Эндофитные бактерии, выделение, стерилизация, соя, озимая пшеница*

### Введение

С каждым годом во всем мире возрастает потребность в производстве безопасных для здоровья продуктов питания, что, в свою очередь, требует использования экологических методов возделывания сельскохозяйственных культур, ограничивающих использование удобрений и химических пестицидов. Одним из наиболее перспективных подходов для решения этой проблемы является применение эффективных штаммов микроорганизмов, способных защищать растения от фитопатогенов и оказывать ростстимулирующее воздействие (Gao et al., 2010).

Долгое время считалось, что ассоциированные с растениями микроорганизмы обитают только на поверхности, а размножение микроорганизмов внутри растения свидетельствует об их патогенности. Исключением являются специализированные симбионты такие, как клубеньковые бактерии или грибы эндотрофной микоризы. Однако в последнее время появляется все больше сведений о том, что внутренние ткани растений также заселены самыми различными микроорганизмами. Такие микроорганизмы принято называть «эндофитными», а характер их взаимодействия с растением расценивается не столько как паразитический, сколько как симбиотический (Мошинец и др., 2010).

Эндофиты (от греч. *endon* – внутри; от греч. *phyton* – растение) – микроорганизмы, населяющие внутренние ткани здоровых растений и не приносящие какого-либо вреда хозяину (Гарифуллина, 2012). Эндофиты используют внутреннюю среду растения – эндосферу в качестве уникальной экологической ниши, защищающей их от изменений окружающей растение внешней среды, которая возникла в результате сотен миллионов лет совместной эволюции растений и микроорганизмов. Некоторые из них имеют широкий круг хозяев, другие же, наоборот, обитают только в растении определённого вида. В настоящее время эндофиты обнаружены во всех известных растениях, однако, большая часть из них недостаточно изучена. Инфицирование осуществляется через различные структуры растений (рисунок), благодаря чему

эндофиты могут стать обитателями тканей различных органов.

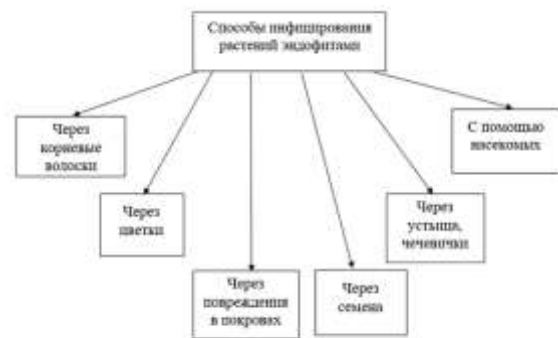


Рис. 1. Способы инфицирования растений эндофитами

Эндофитные микроорганизмы выбирают растение-хозяина благодаря хемотаксису, электротаксису или случайному взаимодействию. Основной способ проникновения эндофитов – через естественные повреждения в покровах, образуемых в результате роста растений, корневые волоски или эпидермальные переходы, что было подтверждено микроскопическими исследованиями. Некоторые эндофиты способны к активному проникновению в ткани растений благодаря целлюлолитическим и пектинолитическим ферментам, вырабатываемым многочисленными эндофитными бактериями, такими как *Azoarcus* sp., *Azospirillum irakense* и *Pseudomonas fluorescens*.

В отличие от микроорганизмов, обитающих в ризосфере и филлосфере, эндофиты защищены от экстремальных условий окружающей среды (температура, осмотический потенциал, ультрафиолетовое излучение и т.д.) и находятся в условиях стабильного pH, оптимальной влажности, обеспечены потоком питательных веществ. Немаловажным является тот факт, что в эндосфере нет большой конкуренции ввиду незначительного многообразия обитаемых там микроорганизмов (Чеботарь и др., 2015).

В связи с этим целью наших исследований было изучение способов стерилизации растительных образцов для выделения и отбора

конкурентноспособных штаммов эндофитных бактерий и создания на их основе микробных препаратов, стимулирующих рост и развитие сельскохозяйственных культур.

*Растительные объекты:* соя (*Glycine max.*) сорта «Ясельда», озимая пшеница (*Triticum aestivum* L.) сорта «Могилевская».

*Микробиологические объекты:* изоляты эндофитных бактерий, выделенные из растительных объектов (корни, стебель, листья, семена).

### Методика исследования

Методы стерилизации растительного материала отрабатывали опытным путем в лабораторных условиях с использованием стерилизующих агентов:

- соединения, служащие источником активного хлорамина, гипохлориты кальция и натрия, имеющие средний стерилизующий эффект;

- ртутьсодержащие составы: диоксид, растворы, содержащие сулему ( $\text{HgCl}_2$ ), имеют наиболее выраженные стерилизующие свойства;

- нитрат серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) совместно с детергентом является высокоэффективным стерилизующим составом;

- концентрированная серная кислота ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ );

- перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Контрольным методом стерилизации служил способ стерилизации концентрированной серной кислотой в течение 3 мин, дальнейшим промыванием в стерильной воде, экспозицией в 98% этаноле в течение 1 мин с последующим 3-х кратным промыванием стерильной водой.

Для выделения эндофитных бактерий олигонитрофильной группы использовали среду Эшби (Теппер и др., 2004), фосфатмобилизующей – глюкозо-аспарагиновую среду (Герхардт и др., 1983). Для установления детерминант, определяющих азотфиксирующую активность у отобранных бактериальных изолятов, определяли наличие в геноме гена *nifH* (Марусина и др., 2001).

### Результаты и обсуждение

Для оптимизации способа стерилизации растительных образцов с целью освобождения их от эпифитной микрофлоры и выделения эндофитных бактерий использовали семена сои и пшеницы урожая 2016 г. В лабораторных условиях разработали способы стерилизации растительных объектов с использованием различных стерилизующих агентов.

Способы стерилизации проростков:

1 способ:

- 70 % раствор этанола;
- 6 % раствор перекиси водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 10 мин;
- 0,1 % раствор  $\text{AgNO}_3$ ;
- промывание стерильной водой (3-х кратное).

2 способ:

- 7 объемов этанола + 3 объема воды (1 мин);

- 3 объема «Domestos Bel» (отбеливатель) + 7 объемов воды – экспозиция в течение 50 мин;
- 4-х кратное промывание в дистиллированной воде.

3 способ:

- соединения, служащие источником активного хлорамина, гипохлориты кальция и натрия;
- ртутьсодержащие составы: диоксид, растворы, содержащие сулему ( $\text{HgCl}_2$ );
- 0,1%  $\text{AgNO}_3$  совместно с детергентом.

Способы стерилизации семян:

1 способ:

- конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в течение 3 мин;
- 3-х кратное промывание семян стерильной водой;
- Экспозиция в 98% этаноле в течение 1 мин;
- 3-х кратное промывание в стерильной воде.

2 способ:

- 50% раствор синтетического моющего средства в течение 3 мин;
- 4-х кратное промывание в проточной воде
- Экспозиция в 98 % этаноле в течение 2 мин;
- 18%/ 25%/50 % раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$  в течение 20 мин;
- 4-х кратное промывание семян стерильной водой.

3 способ:

- 50% раствор синтетического моющего средства в течение 3 мин;
- 4-х кратное промывание в проточной воде;
- экспозиция в 98 % этаноле в течение 2 мин;
- 10%  $\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{NNaCl} \times 2\text{H}_2\text{O}$  (хлорамин Б) в течение 15 мин;
- 4-х кратное промывание семян стерильной водой.

4 способ:

- 50% раствор синтетического моющего средства в течение 3 мин;
- 4-х кратное промывание в проточной воде;
- экспозиция в 98% этаноле в течение 2 мин;
- экспозиция в моющем средстве с  $\text{NaOCl}$  в течение 20 мин;
- 4-х кратное промывание семян стерильной водой;
- экспозиция в 98% этаноле в течение 2 мин;
- экспозиция в растворе синтетического моющего средства в течение 20 мин;
- 3-х кратное промывание в стерильной воде.

Наиболее оптимальным способом стерилизации было использование 50%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , поскольку на поверхности обработанных этим способом семян при посеве растительной суспензии на питательные среды мясо-пептонный агар и Чапека отсутствовал бактериальный и грибной рост. Данный стерилизующий агент  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50 %) отобран, как наиболее эффективный из используемых в эксперименте. Отработана технологическая схема

стерилизации поверхности растительных образцов, которая использована в работе с выделением эндофитных микроорганизмов бобовых и зерновых культур:

1. 50% раствор синтетического моющего средства в течение 3 мин;
2. 4-х кратное промывание в проточной воде;
3. экспозиция в 98% этаноле в течение 2 мин;
4. 50%  $H_2O_2$  в течение 20 мин;
5. 4-х кратное промывание семян стерильной водой.

Из разных частей растений сои и пшеницы отобраны 102 изолята эндофитных бактерий, растущие на селективных средах (Эшби и глюкозо-аспарагиновая). У отобранных изолятов была изучена фосфатмобилизующая и азотфиксирующая способность. Молекулярно-генетический анализ не выявил наличия *nifH*-гена в геноме первично отобранных изолятов олигонитрофильной группы пшеницы и сои. Установлено, что максимальной фосфатмобилизующей способностью, определяемой по диаметру зоны «гало», обладали 11 изолятов эндофитных бактерий сои и пшеницы.

Дальнейшая работа будет направлена на установление антимикробной, ростстимулирующей, колонизирующей активности и других хозяйственно-ценных свойств отобранных фосфатмобилизующих изолятов эндофитных бактерий для создания эффективного микробного препарата на их основе.

## Выводы

Отобран наиболее эффективный стерилизующий агент  $H_2O_2$  (перекись водорода) и оптимизирована его

концентрация для обработки растительных объектов с целью уничтожения эпифитной микрофлоры. Отработана технологическая схема стерилизации поверхности растительных образцов для выделения агрономически ценных эндофитов бобовых и зерновых культур, включающая обработку 50% раствором синтетического моющего средства в течение 3 мин; 4-х кратное промывание в проточной воде; экспозиция в 98% растворе этанола в течение 2 мин; экспозицию в 50% растворе  $H_2O_2$  в течение 20 мин; 4-х кратное промывание семян стерильной водой. Применение данной схемы позволило отобрать 11 изолятов эндофитных бактерий сои и пшеницы, обладающих максимальной фосфатмобилизующей активностью.

## Литература

1. Gao, F., Dai, C., Liu, X. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, Vol. 4, № 13, p. 1346–1351.
2. Гарифуллина, ДВ. *Эндофитные бактерии растений гороха как активный компонент бобово-ризобияльной симбиотической системы*. Автореферат дис. канд. биол. наук: 03.02.03; 03.01.06, БашГУ, Уфа, 2012, 26 с.
3. Герхардт, Ф. *Методы общей бактериологии*, в 3 т. Москва, 1983, Т. 2, 470 с.
4. Марусина, АИ., Булыгина, ЕС., Кузнецов, ББ. и др. Система олигонуклеотидных праймеров для амплификации генов *nifH* различных таксономических групп прокариот. *Микробиология*, 2001, Том 70, №1, с. 86–91.
5. Мошинец, ЕВ., Бруне, Ж., Рымарь, СЕ. и др. Выделение и идентификация эндофитных бактерий из растений бамбука. *Микробиология і біотехнологія*, 2010, № 4, с.44–57.
6. Теппер, ЕЗ., Шильникова, ВК., Переверзева, ГИ. *Практикум по микробиологии*. Москва, 2004, 256 с.
7. Чеботарь, ВК., Щербаков, АВ., Щербакова, ЕН. и др. Эндофитные бактерии как перспективный биотехнологический ресурс и их разнообразие. *Сельскохозяйственная биология*, 2015, № 5, с.648–654.

Ekaterina Solovyova, Liliya Kartyzhova, Zinaida Aleschenkova, Irina Shaveiko

## Optimization of plant sample sterilization for isolation of endophytic microbial species

### Summary

Endophytes are microorganisms inhabiting internal plant species and causing no harm but multiple favorable effects on the host. They are regarded as promising biological agents showing protective and stimulating activities. Methods of sterilizing vegetative objects (roots, stems, leaves and seeds of soybean and wheat) were tested to reveal endophytic cultures. Sterilization methods were optimized under laboratory conditions using sterilizing agents in various concentrations: compounds – sources of active chloramine, calcium and sodium hypochlorites; mercury-containing compositions (diocide, mercuric chloride solutions); silver nitrate combined with detergent; concentrated sulfuric acid; hydrogen peroxide. The optimal sterilization scheme engaged 50% hydrogen peroxide solution. The improved technology of plant surface sterilization resulted in recovery of 102 isolates representing agrovaluable endophytic bacteria from various crops.

*Endophytic bacteria, isolation, sterilization, soybean, wheat*

Получено в марте 2017, подписано в печать в апреле

**Екатерина СОЛОВЬЕВА.** Кандидат биологических наук, научный сотрудник Института микробиологии НАН Беларуси. Адрес: ул. ак. Купревича, 2, 220141, Минск, Беларусь. Тел. +37529-3959308, адрес эл. почты: [ekatya@tut.by](mailto:ekatya@tut.by)

**Ekaterina SOLOVYOVA.** PhD, Institute of Microbiology, National Academy of Sciences (NAS), researcher. Address: Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Belarus. Tel. +37529-3959308, e-mail: [ekatya@tut.by](mailto:ekatya@tut.by)

**Лилия КАРТЫЖОВА.** Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Института микробиологии НАН Беларуси. Адрес: ул. ак. Купревича, 2, 220141, Минск, Беларусь. Тел. +37529-6385416, адрес эл. почты: [Liliya\\_Kartyzhova@mail.ru](mailto:Liliya_Kartyzhova@mail.ru)

**Liliya KARTYZHOVA.** PhD, Institute of Microbiology, National Academy of Sciences (NAS), senior researcher. Address: Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Belarus. Tel. +37529-6385416, e-mail: [Liliya\\_Kartyzhova@mail.ru](mailto:Liliya_Kartyzhova@mail.ru)

**Зинаида АЛЕЩЕНКОВА.** Доктор биологических наук, заведующая лабораторией взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений. Адрес: ул. ак. Купревича, 2, 220141, Минск, Беларусь. Тел. 8017-2659967, адрес эл. почты: [aleschenkova@mbio.bas-net.by](mailto:aleschenkova@mbio.bas-net.by)

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

**Ирина ШАВЕЙКО.** Младший научный сотрудник Института микробиологии НАН Беларуси. Адрес: ул. ак. Купревича, 2, 220141, Минск, Беларусь. Тел. 8017-2659967, адрес эл. почты: [6773381@gmail.com](mailto:6773381@gmail.com)

**Irina SHAVEIKO.** Institute of Microbiology, National Academy of Sciences (NAS), junior researcher. Address: Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Belarus. Tel. 8017-2659967, e-mail: [6773381@gmail.com](mailto:6773381@gmail.com)