

УДК 579.22:577.13:633.358

ФИЛОГЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ РАСТЕНИЙ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.), ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РИЗОСФЕРЫ ПРОРОСТКОВ

© 2024 г. Л. Е. Макарова^{1,*}, Ю. А. Маркова¹, Ю. В. Зайцева³, А. А. Бычкова³, И. В. Горбенко¹, Ю. М. Константинов^{1,2}, И. А. Васильев¹, А. С. Мориц¹, П. А. Бизиков¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664033 Россия

²Иркутский государственный университет, Иркутск, 664003 Россия

³Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, 150003 Россия

*e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 30.11.2023 г.

После доработки 10.01.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Ранее было показано, что эндофитные бактерии могут перемещаться из корней проростков растений гороха (*Pisum sativum* L.) в ризосферу. В настоящей работе при выращивании проростков на водной среде из среды для роста корней выделены 6 штаммов бактерий. С помощью анализа нуклеотидной последовательности фрагментов генов 16S рРНК установлено таксономическое положение этих штаммов с точностью до рода. Изучены культурально-морфологические признаки, активность гидролитических ферментов (пектиназы, целлюлазы, протеазы), ИУК-продуцирующая способность. Обнаружено, что количество эндофитных бактерий, оказывающихся на поверхности корня проростков гороха, существенно превышает их количество в тканях корня. Сделано предположение, что в перемещении исследуемых бактерий во внешнюю среду принимали участие гидролитические ферменты пектиназы и целлюлазы, вызывающие разрушение углеводных структур растительных клеточных стенок. Обсуждаются особенности метаболизма у исследуемых штаммов эндофитных бактерий и их значение для растения-хозяина после их выхода из корней в ризосферу.

Ключевые слова: эндофитные бактерии, ген 16S рРНК, целлюлаза, пектиназа, протеаза, ИУК-продуцирующая способность бактерий

DOI: 10.31857/S0555109924040064 EDN: SATJVO

В жизнедеятельности растений важная роль принадлежит непатогенным эндофитным бактериям, поселяющимся в растениях и вступающим с ними в мутуалистические взаимоотношения [1–4]. Со стороны растений осуществляется регуляция локализации и численности эндофитных бактерий в пределах растительного организма, а со стороны эндофитных бактерий – биоконтроль колонизации растений не только патогенными микроорганизмами, но и насекомыми [3].

Особый интерес вызывают исследования взаимодействия эндофитных ненодулирующих и нодулирующих видов бактерий при формировании бобово-ризобиальных симбиозов [4–5]. Считают, что поселяющиеся в клубеньках неризобиальные эндофитные бактерии способствуют функционированию азотфиксирующей системы, обеспечивая улучшение минерального питания и синтез

биологически активных соединений [7]. По спискам приведенных в публикациях [1, 4, 6, 8] в числе таксонов эндофитных бактерий, встречающихся в тканях бобовых культур, насчитывается более 30 неризобиальных родов.

Временным хранилищем эндофитных бактерий можно рассматривать семена [8]. После прорастания семян эндофитные бактерии перемещаются в развивающиеся органы проростков. Далее они могут проникать из тканей растения во внешнюю среду, что было зафиксировано у проростков гороха, полученных из поверхностно обеззараженных семян [9]. Проведенные исследования позволили установить, что эндофитные бактерии, накопившиеся в семенах гороха, по мере роста появляющихся проростков через корни проникают во внешнюю среду, где размножаются и по-разному способны взаимодействовать с ризосферными

бактериями, включая нодулирующие корни гороха ризобии. Установлено, что взаимодействия обсуждаемых эндофитных бактерий с ризобиями не вызывают изменений в их составе и, таким образом, благоприятны для размножения последних в ризосфере гороха [9].

У выращенных в асептических условиях проростков в водной среде, куда на 1 сут помещали их корни, было обнаружено 6 штаммов бактерий [9]. Для данных штаммов исследованы некоторые морфологические показатели, получены данные о неоднозначности их взаимодействия с разными видами ризосферных бактерий и способности деградировать нафталиновые структуры с образованием фталатов. При этом не были определены механизмы перемещения этих бактерий из тканей корня во внешнюю среду для выхода эндофитных бактерий из корней в ризосферу и не установлена их таксономическая принадлежность.

Выявленные штаммы, неоднозначно взаимодействуя с другими видами почвенных бактерий [9], вероятно, способны вносить изменения в состав почвенного микробиома путем воздействия на другие виды бактерий посредством синтезируемых ими метаболитов. В частности, в числе таковых – фталаты, которые образуются в их клетках при деградации полициклических соединений. Это свойство бактерий было описано в работе [9]. Было показано, что все 6 штаммов способны деградировать *N*-фенил-2-нафтиламин – один из представителей полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), присутствующий в корневых экссудатах бобовых культур, с образованием фталатов [10]. При этом штаммы отличались по активности деградации указанного соединения и по соотношению образовавшихся при этом видов фталатов. Известно, что фталаты, в зависимости от структуры входящих в их состав алкильных группировок, связанных эфирной связью с фталевой кислотой, неоднозначно влияют на жизнедеятельность разных видов бактерий [11].

В литературе присутствуют, в основном, описания путей и механизмов проникновения эндофитных бактерий в растения [4, 8, 5]. Эти бактерии попадают в растения преимущественно через корневую систему из почвы и, отчасти, через устьица, и могут продвигаться далее по апопласту и сосудам растений. Проникновению данных бактерий в растительные ткани могут способствовать разрывы в эпидермисе, а также имеющиеся у этих бактерий гидролитические ферменты. В корни бобовых растений нодулирующие эндофитные бактерии могут проникать через корневые волоски совместно с ризобиями [7].

Цель настоящей работы – идентификация штаммов бактерий, выделенных из водной среды роста корней проростков гороха, определение наличия у этих бактерий гидролитических ферментов

для перемещения из корневых тканей во внешнюю среду и выяснение их способности оказывать влияние на рост растения, посредством продуцирования индоллил-уксусной кислоты (ИУК).

МЕТОДИКА

Изоляция штаммов бактерий. Культуры бактерий выделяли из водной среды, куда помещали корни проростков гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Торсдаг, выращенных из поверхностно стерилизованных семян [9].

Колонии эндофитных бактерий получали на твердой агаризованной среде, приготовленной на гороховом отваре как описано в работе [9], на которую наносили содержащую бактерии водную суспензию из сосуда, где находились корни проростков. Бактерии из одиночных колоний неоднократно пересеивали на новые твердые среды до получения однотипных по внешнему виду колоний и содержащихся в них клеток. Полученные таким образом культуры бактерий использовали для исследований.

Определение соотношения количества бактерий, содержащихся на поверхности корней и в тканях у проростков гороха. Объектами исследования служили этиолированные проростки гороха сорта Торсдаг. Поверхностную стерилизацию семян, используемых для исследования эндофитных бактерий, проводили в 3 этапа, по схеме, описанной в работе [9]. По этой схеме, семена промывали мыльным раствором, затем помещали на 10 мин в 95%-ный этанол, а после отмытия – на 30 мин в 3%-ный раствор пероксида водорода. После каждого вида обработки семена 3-кратно отмывали стерильной водой. Для контроля эффективности стерилизации на твердую агаризованную среду наносили небольшие количества смывных вод, полученных после третьего промыва семян, обработанных перекисью, либо на такую же среду помещали семена (на 2 ч). Затем в течение 2–3 сут проводился просмотр поверхности сред. Отсутствие на средах бактериальных колоний служило подтверждением эффективности проведенной поверхностной стерилизации семян.

Отмытые от раствора пероксида семена заливали стерильной водой нагретой до 60°C. После охлаждения воды до комнатной температуры семена помещали в термостат на 6–7 ч для набухания. Далее семена раскладывали на влажную фильтровальную бумагу в чашках Петри для получения трехсуточных проростков. Рост проростков проходил в термостате с температурой 21°C и при отсутствии освещения. Набухание семян, рост проростков, процедуры, проводимые с проростками, происходили в строго соблюдаемых асептических условиях. У проростков отделяли корни, которые делили на 2 группы. В одну группу входили корни,

которые промывали детергентом (0.01% нонидет Р-40) для удаления с их поверхности бактерий, во вторую группу входили необработанные детергентом корни. После обработки детергентом корни 3-кратно промывали стерильной водой и полноту отмывки от бактерий контролировали после нанесения небольшого количества последних смывных вод на твердую агаризованную среду.

Небольшие навески корней (1–2 г) каждой из групп растирали до кашицы в керамической ступке, заливали небольшим объемом стерильной воды, перемешивали, и полученные суспензии в разных разведениях наносили для выращивания бактерий на твердые агаризованные среды, которые готовили на гороховом отваре с сахарозой в качестве источника углерода по [9]. Количество бактерий рассчитывали на 1 г сырой массы корня.

Исследование морфолого-культуральных признаков штаммов бактерий. Изучали морфолого-культуральные показатели для колоний и клеток, тип реакции по Граму. Морфологические показатели для колоний бактерий получали при выращивании их на твердой агаризованной среде, приготовленной на гороховом отваре, как описано в работе [9], и на агаризованной среде Эшби. Изучение формы и размеров клеток при помощи инвертированного микроскопа “Axio Observer” (“Carl Zeiss Microscopy”, Германия) проводили, используя суспензии бактерий, взятых из отдельных колоний и окрашенных по Граму.

Молекулярно-генетическая идентификация штаммов. Идентификацию проводили с помощью анализа гена 16S рРНК. Тотальную ДНК из суточных культур микроорганизмов выделяли с помощью набора ExtractDNA (“Евроген”, Москва) в соответствии с инструкциями производителя. Гены 16S рРНК были амплифицированы с использованием универсальных прокариотических праймеров: 16S-9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG), 16S-1512R (5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT). ПЦР проводилось с помощью коммерческого набора БиоМастер HS-Тақ ПЦР-Color (2х), оптимизированного для ПЦР с горячим стартом согласно инструкциям производителя (“Евроген”, Москва).

Условия ПЦР: предварительная денатурация 95°C 4 мин. Денатурация 95°C 1 мин, отжиг 55°C 1 мин, элонгация 72°C 1.5 мин, 30 циклов. Финальная элонгация 72°C 5 мин. Детекция результатов ПЦР осуществлялась методом электрофореза в 1.5% агарозном геле. Выделение и очистка амплифицированных генов 16S рРНК производилась с помощью набора CleanupMini (“Евроген”, Москва) согласно инструкциям производителя.

Последовательности, секвенированные в настоящее время исследовании, были загружены в БД NCBI Nucleotide под идентификаторами: PS1 – OQ383612; PS2 – OQ383613; PS3 – OQ383614; PS4 – OQ383615; PS5 – OQ383616; PS6 – OQ383617. Названия

штаммов присвоены по первым буквам растения, из которого они выделены (*Pisum sativum*) с порядковыми номерами.

Идентификацию бактерий на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК проводили с использованием базы данных SILVA [12] и пакета dada2 для R [13].

Для построения филогенетического дерева дополнительно использовались по 10 последовательностей самой высокой оценки подобия из результатов BLASTN. Выравнивание производили с помощью ПО MAFFT [14]. Филогенетический анализ проводили в программе MEGA11 [15] с помощью метода Neighbor-Joining [16] с бутстрепом (10000 повторностей). Эволюционный расстояния рассчитывались с помощью метода “p-distance” [17]. В качестве аутгруппы использовали последовательность *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA, complete sequence (GenBank: J01859.1).

Определение подвижности бактерий. Для определения подвижности микроорганизмов использовали среду БТН-бульон (ООО “Биотехновация”, Россия) с 0.4%-ным агаром. Среду разливали в пробирки по 5–7 мл, посев проводили уколом [18]. Культивировали 10 сут при 37°C. Подвижность оценивали визуально, неподвижные микроорганизмы росли по ходу укола, подвижные давали диффузный рост.

Определение протеолитической активности. К БТН-бульону (ООО “Биотехновация”, Россия) добавляли 15% желатина, оставляли для набухания на 30 мин и нагревали на водяной бане до полного растворения желатина. Полученную среду разливали в пробирки по 5 мл и стерилизовали. Посев проводили уколом, культивировали 10 сут при 37°C [18]. Разжижение столбика желатина отмечали визуально.

Определение пектиназной и целлюлазной активности. Бактерии культивировали в стеклянных колбах при 27°C на минеральной среде 8E [19] с 5 г/л пектина (для определения пектиназной активности) или фильтрованной бумаги размером 1 × 5 см (для определения целлюлазной активности). Определение активности целлюлазы и пектиназы бактерий осуществляли по количеству образовавшихся редуцирующих сахаров методом, описанным в работе [20]. Количество редуцирующих сахаров оценивали через 3 и 14 сут экспозиции. Для этого суспензию бактерий центрифугировали в течение 15 мин при 1000 g. К 0.5 мл раствора Шомоди добавляли 0.5 мл супернатанта, смесь нагревали до 60°C на водяной бане 20 × 40 мин. После охлаждения добавили 0.5 мл раствора Нельсона, а затем 5.0 мл Н₂О. Измерения проводили при 750 нм против контрольного раствора (0.5 мл раствора Шомоди + 0.5 мл раствора Нельсона + 4.0 мл Н₂О). Содержание сахаров определяли с помощью калибровочной кривой. Активность ферментов

выражали в мг редуцирующих сахаров и рассчитывали на мг белка на 3 сут. Количество белка определяли методом Лоури.

Определение продукции индолилуксусной кислоты (ИУК). Бактерии культивировали в минеральной среде 8E с 5 г/л глюкозы и 200 мг/л триптофана, как предшественника индолилуксусной кислоты. Бактериальную суспензию на 3 и 14 сут экспозиции центрифугировали 15 мин при 1000 g. Как описано в работе [21], 1.0 мл супернатанта смешивали с 1.0 мл реактива Сальковского. Оптическую плотность измеряли при 490 нм с помощью спектрофотометра Specord S-100 (“BioRad”, США). Развитие розовой окраски показывало наличие ИУК. Содержание ИУК определяли с помощью калибровочной кривой и выражали в мг/мл среды.

Статистическая обработка. Все измерения проводили в 3–5 повторностях. Для показателей активности ферментов (пектиназы, целлюлазы) и содержания ИУК вычисляли средние значения и стандартные отклонения к ним. Вычисления производили в программе Microsoft Excel 2007 (“Microsoft,” США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

О выходе эндофитных бактерий во внешнюю среду свидетельствуют данные, приведенные в публикации [9], а также впервые полученные при выращивании проростков в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге (см. Методику). В ранее опубликованной работе [9] были использованы двухсуточные проростки гороха. Их корни помещали в водную среду, где наличия бактерий в нулевой

временной точке не выявляли, а через 1 сут экспозиции титр бактерий достигал 2.3×10^7 кл./мл. По полученным на основе этих данных расчетам, с учетом объема водной среды и числа проростков, приходящихся на 1 сосуд, к концу экспозиции на 1 корень приходилось 14.7×10^7 клеток бактерий. У трехсуточных проростков, росших на фильтровальной бумаге, количество бактерий на поверхности 1 корня после 3 сут выращивания проростков на влажной фильтровальной бумаге составляло около 8.9×10^5 клеток. По-видимому, водная среда с минимальным количеством микроэлементов, в которую из корней экскретировались органические компоненты в составе корневых экссудатов, способствовала более активному размножению эндофитных бактерий, чем условия роста на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри.

Полученные нами данные для проростков, выращиваемых в чашках Петри, свидетельствуют о более активном размножении эндофитных бактерий во внекорневой среде, чем в тканях корня. На это указывает сопоставление установленных количеств эндофитных бактерий в тканях 1 корня и на его поверхности. Количество бактерий в корнях составляло около 2.0% от их количества на поверхности корня.

Итак, результаты этих двух экспериментов позволили заключить, что перемещение эндофитных бактерий из корней во внешнюю среду – это естественное явление. Полагаем, что значение перемещения эндофитных бактерий из растения во внешнюю среду определяется трофическими преимуществами для их размножения в условиях почвы.

Таблица 1. Культуральные признаки эндофитных бактерий

Штамм	Характерные признаки колоний					Признаки клеток		
	Форма	Прозрачность	Цвет	Поверхность	Край	Окраска по Граму	Длина/ширина, мкм (средн.)	Наличие спор
PS1	Круглая	–	Белый	Гладкая	Неровный	+	1.84/0.51	+
PS2	Круглая	–	Светло желтый, с белым ободком	Гладкая	Ровный	+	2.02/0.53	+
PS3	Круглая	–	Светло желтый	Морщинистая	Слабо волнистый	+	1.63/0.75	+
PS4	Круглая	+	Желтый	Гладкая	Ровный	+	1.36/0.68	–
PS5	Ризоидная	–	Белый	Гладкая	Волнистый	+	2.27/0.54	+
PS6	Овальная, растекающаяся	+	Белый	Гладкая	Слабо волнистый	–	1.21/0.47	–

Обозначения: +, – соответственно наличие или отсутствие признака.

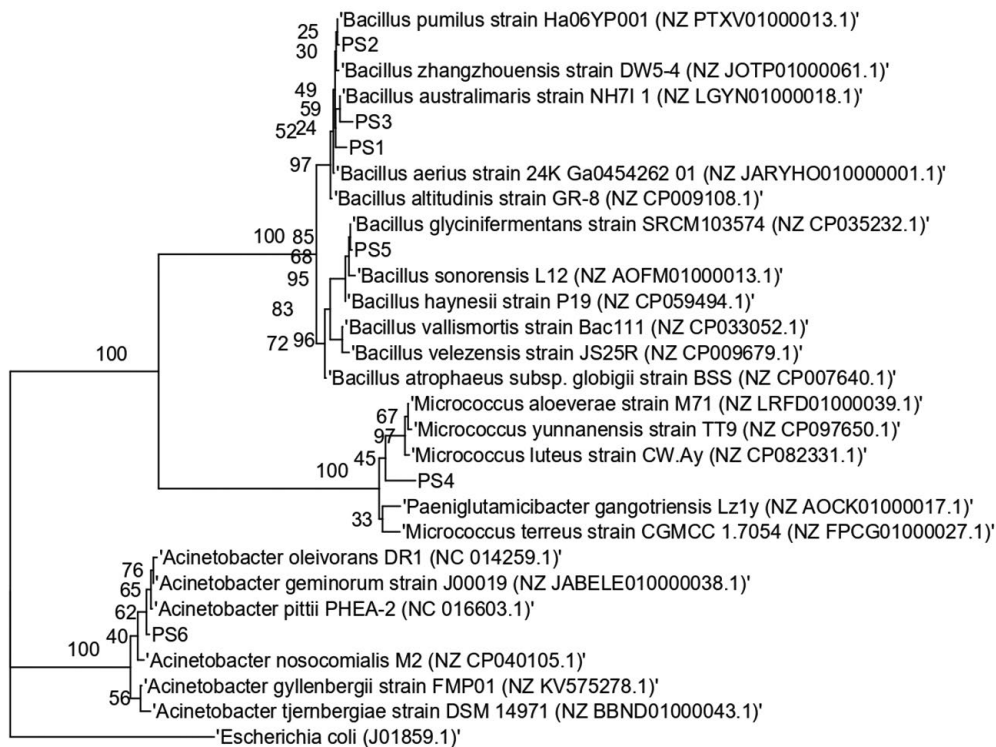


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное методом Neighbor-Joining (NJ), на основе последовательностей генов 16S рНК. В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны бутстреп значения. В скобках указаны идентификаторы последовательностей из GenBank. В качестве аутгруппы была использована последовательность 16S рНК *E. coli* (J01859.1).

Некоторые морфологические показатели выявленных нами штаммов суммированы в табл. 1. Штаммы PS1, PS2, PS3, PS5 по морфологическим показателям для клеток, положительно окрашивающихся по Граму, наличие в них спор можно отнести к роду *Bacillus* [22, 23]. Штаммы PS4 и PS6 имели близкие по форме клетки, разную окраску по Граму и не были способны к образованию спор.

С помощью анализа фрагментов последовательностей 16S рНК алгоритмом dada2 была подтверждена принадлежность штаммов PS1, PS2, PS3, PS5 к роду *Bacillus*, штамма PS4 к *Micrococcus*, PS6 к *Acinetobacter* (рис. 1).

Результаты филогенетического анализа фрагментов последовательностей 16S рНК изучаемых штаммов и наиболее похожих последовательностей, обнаруженных с помощью BLAST, методом Neighbor-Joining (NJ) представлены на рис. 1. Штамм PS2 был наиболее филогенетически близок к виду *Bacillus pumilus*, PS5 – к виду *Bacillus glycinifermentans*, штамм PS4 к виду *Micrococcus aloeverae*, а штамм PS6 к *Acinetobacter pittii*.

Что позволяет бактериям перемещаться из корневых тканей в ризосферу? По данным из табл. 2, подвижностью обладали 3 из 6 исследуемых штаммов. Выше отмечалось, что перемещение бактерий в растениях возможно по апопласту. В этом процессе, вероятно, должны участвовать

гидролитические ферменты, необходимые для разрушения пекто-целлюлозных структур растения. У всех исследуемых нами штаммов выявлены активности пектиназ и целлюлаз, которые, по всей вероятности, необходимы для перемещения этих бактерий из тканей корня во внешнюю среду (табл. 2). Следовательно, способность выхода всех шести штаммов бактерий в ризосферу из тканей корня объяснялась наличием у них активности ферментов, гидролизующих компоненты клеточных стенок – пектины и целлюлозу.

У изучаемых штаммов установлена протеолитическая активность, которая оказалась более выраженной у штаммов PS1 и PS4. Внеклеточные протеазы могут выполнять защитную функцию, участвуя в подавлении роста фитопатогенных грибов [24].

Модулирующее влияние эндофитных бактерий на рост растений при посредстве синтезируемых ими фитогормонов, таких как ауксины, гиббереллины, абсцизовая кислота, по-видимому, представляет один из механизмов, направленных на поддержание мутуалистических взаимоотношений между ними. Одним из важных фитогормонов для роста и развития растений является ИУК. Способность к продуцированию ИУК выявлена у многих представителей почвенных бактерий, но уровень ее продуцирования может существенно различаться, даже у штаммов, являющихся представителями

Таблица 2. Физиолого-биохимические свойства эндофитных бактерий

Штамм	Целлюлаза, мг/мл на 3 сут	Пектиназа, мг/мл на 3 сут	Протеаза, 10 сут*	Продукцирование ИУК, мг/мл на 3 сут	Подвижность, 10 сут	Рост на среде Эшби**
PS1	0.215 ± 0.020	0.406 ± 0.019	++	0.138 ± 0.001	Хорошая	–
PS2	0.147 ± 0.021	0.489 ± 0.055	+	0.155 ± 0.002	Слабая	+
PS3	0.134 ± 0.019	0.342 ± 0.024	+	0.864 ± 0.009	Нет	+
PS4	0.155 ± 0.018	0.477 ± 0.039	++	0.146 ± 0.005	Нет	+
PS5	0.076 ± 0.013	0.418 ± 0.027	+	0.579 ± 0.018	Нет	–
PS6	0.133 ± 0.014	0.416 ± 0.009	+	0.167 ± 0.001	Средняя	+

* “+” – наличие или ** “–” – отсутствие признака соответственно.

одного вида бактерий [25]. Подобное можно отметить для исследуемых нами штаммов, относящихся к роду *Bacillus*: PS1, PS2, PS3, PS5. Среди них оказалось 2 штамма (PS3, PS5) с высокой продукцией ИУК, а 2 штамма (PS1, PS2) имели значительно более низкую способность к синтезу ИУК (табл. 2).

Относительно представителей рода *Acinetobacter*, к которым отнесен выделенный штамм PS6, из данных литературы известно, что эти бактерии могут не только синтезировать ИУК, но и участвовать в ее деградации. Большинство штаммов бактерий *Acinetobacter* относят к индолнегативным [26], поскольку у них имеется система ферментов, деградирующих ИУК [27]. В то же время авторами работы [28] описан штамм *Acinetobacter pittii* гр-1, выделенный из почвы, который характеризовался достаточно выраженной продуктивностью ИУК. Исследуемый эндофит из растений гороха, штамм PS6, вероятно, принадлежит к тому же виду – *Acinetobacter pittii* (рис. 1). Однако, *in vitro* у штамма была определена относительно невысокая способность к синтезу ИУК, близкая к определяемой у выделенных штаммов рода *Bacillus* – PS1, PS2 и *Micrococcus* PS4 (табл. 2).

В числе полезных для растений свойств почвенных бактерий из рода *Acinetobacter* отмечены их способности солилизировать минералы, синтезировать сидерофоры, обезвреживать поллютанты и фиксировать азот [27]. Отмечалось, что штамм *Acinetobacter pittii* гр-1 обладает хорошими возможностями утилизировать нерастворимые фосфаты до образования растворимых фосфорных соединений [29]. Примечательно, что выделенный штамм *Acinetobacter* оказался способным к росту на среде Эшби (табл. 2), что является косвенным свидетельством наличия у этих бактерий азотфиксирующей способности. Подобным свойством, очевидно, характеризуются штаммы *Bacillus* – PS2, PS3 и штамм *Micrococcus* – PS4 (табл. 2).

Следует отметить, что не только бактерии рода *Acinetobacter* обладают свойством обезвреживать поллютанты, все исследуемые штаммы эндофитных бактерий способны снижать в среде концентрации полициклические ароматических

углеводородов (ПАУ), многие из которых относятся к опасным для живых организмов соединениям. На это указывает их способность деградировать N-фенил-2-нафтиламин – негативное аллелопатическое соединение, присутствующее в корнях и корневых экссудатах растений гороха [9, 10].

Роль эндофитных бактерий, представителей рода *Bacillus*, чаще всего выявляемых в тканях растений, в настоящее время исследуется весьма активно [4, 25, 30]. Выделено немало штаммов *Bacillus*, стимулирующих рост и устойчивость растений к действию неблагоприятных факторов среды, некоторые из которых используются для создания биопрепаратов для применения в сельском хозяйстве [4, 30]. Полученные в настоящей работе данные для исследованных штаммов *Bacillus* позволяют сделать вывод о наличии у них ряда полезных для растений свойств: способность к продуцированию ИУК, у 2 из 4 штаммов (PS2, PS3) – способность к азотфиксации (табл. 4). У всех штаммов бацилл ранее отмечена способность к деградации ПАУ [9], у исследованных представителей *Bacillus* наиболее активным оказался штамм PS3. Высокую деградирующую активность демонстрировали также бактерии штамма PS6, предварительно идентифицированные как *Acinetobacter pittii* (рис. 1). Разница между обсуждаемыми штаммами PS3 и PS6 проявлялась в соотношении видов фталатов, образующихся при деградации N-фенил-2-нафтиламина. Среди фталатов – продуктов деградации указанного соединения, в среде с бактериями штамма PS3 преобладал диоктилфталат, а в среде с бактериями штамма PS6 – дибutilфталат [9].

Появляющиеся в среде роста корней проростков гороха эндофитные бактерии могут взаимодействовать с другими видами бактерий, но неоднозначно. Как показано нами ранее [9], с *Rhizobium leguminosarum* (эндосимбионт) и *Azotobacter chroococcum* (эктосимбионт) эти бактерии показали совместимость, что, вероятно, должно благоприятствовать их симбиозу с растениями гороха. В то же время, не все из штаммов бактерий смогли выдержать присутствие в прикорневой среде гороха бактерий *Pseudomonas syringae* pv *pisi* – патогена

для растений гороха, и *Rodococcus erythropolis*, которые подавляли рост некоторых из исследуемых эндофитов [9]. Последнее говорит о подверженности эндофитных бактерий антагонистическому воздействию со стороны некоторых видов почвенных бактерий. В целом, можно заключить, что проникновение из корней гороха во внешнюю среду исследуемых штаммов эндофитных бактерий – представителей родов *Bacillus*, *Micrococcus* и *Acinetobacter* благоприятствует их более интенсивному размножению в аэробных условиях. Перемещение этих бактерий из корневых тканей в ризосферу, по-видимому, обусловлено наличием у них активности гидролитических ферментов – пектиназ и целлюлаз. Появление и размножение эндофитных бактерий в ризосфере может иметь важное значение для жизнедеятельности растения-хозяина и присутствующих в его прикорневой среде почвенных бактерий. К полезным для растения свойствам у изучаемых бактерий следует отнести их ИУК-продуцирующую способность и наличие у них возможности для деградации ПАУ. Среди выделенных из прикорневой среды проростков гороха наиболее активными в аспекте продуцирования ИУК оказались 2 представителя *Bacillus* – бактерии штаммов PS3 и PS5. В плане деградации ПАУ показали высокую активность штамм PS3 из рода *Bacillus* и бактерии *Acinetobacter*. Обсуждаются установленные у исследуемых штаммов показатели метаболизма и значение этих эндофитных бактерий для растения-хозяина после их выхода из корней в ризосферу. Мы предполагаем, что обнаруженные свойства штаммов PS3, PS5 и PS6 – активность в продуцировании ИУК и деградации ПАУ, могут быть использованы для получения биоактивных препаратов соответствующего целевого практического назначения.

Авторы выражают благодарность сотрудникам СИФИБР СО РАН О.В. Захаровой и А.М. Гончаровой за техническую помощь при размножении культур бактерий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена в рамках проекта № гос. регистрации 122041100050-6, частично проекта № 122041100052-0. Молекулярно-генетическая идентификация штаммов бактерий выполнена в научно-образовательной лаборатории “Молекулярная генетика и биотехнология” в рамках программы развития ЯрГУ до 2030 г. (№ 123042800011-6, грант ЯрГУ № GL-2023-03).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muresu R., Polone E., Sulas L., Baldan B., Tondello A., Delogu G., Cappuccinelli P. et al. // FEMS Microbiol Ecol. 2008. V. 63. P. 383–400.
2. Гарипова С.Р. // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132. № 11. С. 493–505.

3. Чеботарь В.К., Мальфанова Н.В., Щербаков А.В., Ахтемова Г.А., Борисов А.Ю., Люгтенберг Б., Тихонович И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 3. С. 283–289. <https://doi.org/10.7868/S0555109915030058>
4. Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тихонович И.А. // Экологическая генетика. 2019. Т. 17. № 1. С. 19–32. <https://doi.org/10.17816/ecogen17119-32>
5. Гарипова С.Р., Гарифуллина Д.В., Баймиев А.Х., Хайруллин Р.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 3. С. 299–307.
6. Martinez-Hidalgo P., Hirsh A.M. // Phytobioms. 2017. V. 1. № 2. P. 70–82.
7. Benito P., Alonso-Vega P., Aguado C., Luján R., Anzai Y., Hirsch A.M., Trujillo M.E. // Sc. Rep. 2017. V. 7. Art. 11051. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11428-1>
8. Dudeja S.S., Giri R., Saini R., Suneja-Madan P., Kothe E. // J. Basic Microbiol. 2012. V. 52. № 3. P. 248–260.
9. Макарова Л.Е., Маркова Ю.А., Мориц А.С., Карпова М.С., Сидоров А.В., Соколова Н.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 4. С. 394–401. <https://doi.org/10.31857/S0555109921040103>
10. Макарова Л.Е., Смирнов В.И., Клыба Л.В., Петрова И.Г., Дударева Л.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 4. С. 394–402
11. Шафикова Т.Н., Омеличкина Ю.В., Еникеев А.Г., Бояркина С.В., Гвильдис Д.Э., Семенов А.А. // Докл. Академии наук. 2018. Т. 480. № 3. С. 381–383. <https://doi.org/10.7868/S0869565218150264>
12. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P. et al. // Nucl. Acids. Res. 2013. V. 41 (D1). P. D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
13. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J., Holmes S.P. // Nat. Methods. 2016. V. 13. № 7. P. 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
14. Katoh K., Standley D.M. // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. № 4. P. 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
15. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: // Mol. Biol. Evol. 2021. V. 38. P. 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
16. Saitou N., Nei M. // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
17. Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. New York: Oxford University Press, 2000. 350 p.

18. Желдакова Р.А., Мямин В.Е. Фитопатогенные микроорганизмы. Минск: БГУ, 2005. 116 с.
19. Чугунов В.А., Ермоленко З.М., Жиглецова С.К., Мартовецкая И.И., Миронова Р.И., Жиркова Н.А. и др. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 6. С. 666–671.
20. Вешняков В.А., Хабаров Ю.Г., Камакина Н.Д. // Химия растительного сырья. 2008. № 4. С. 47–50.
21. Чумаков М.И., Горбань В.В., Ковлер Л.Е., Соловова Г.К., Кривопалов Ю.В., Васильев А.Ю., Каменева С.В. // Микробиология. 1992. Т. 61. С. 92–102.
22. Определитель бактерий Берджи / Ред. Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уилльямса. М.: Мир, 1997. Т. 1. С. 421.
23. Определитель бактерий Берджи / Ред. Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уилльямс. М.: Мир, 1997. Т. 2. С. 799.
24. Afzal I., Iqbal I., Shinwari Z.K., Yasmin A. // Plant Growth Regul. 2017. V. 81. № 3. P. 399–408.
25. Иванчина Н.В., Гарипова С.Р., Хайруллин Р.М. // Агрехимия. 2018. № 4. С. 39–44.
26. Чеботарь И.В., Лазарева А.В., Масалов Я.К., Михайлович В.М., Маянский Н.А. // Вестник РАМН. 2014. № 9–10. С. 39–50.
27. Lin H.-R., Shu H.-Y., Lin G.-H. // Microbiol. Research. 2018. V. 216. P. 30–39.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.08.004>
28. He D., Wan W. // Frontiers in Microbiology. 2021. V. 12. Art 737116.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737116>
29. Wan W., Qin Y., Wu H., Zuo W., He H., Tan J., Wang Y., He D. // Frontiers in Microbiology. 2020. V. 11. Art. 752.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00752>
30. Гарипова С.Р., Маркова О.В., Гарифуллина Д.В., Иванчина Н.В., Хайруллин Р.М. // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 3(1). С. 56–58.

Phylogeny and Characterization of Endophytic Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Pea Seedlings (*Pisum sativum* L.)

L. E. Makarova^{a, *}, Yu. A. Markova^a, Yu. V. Zaytseva^c, A. A. Bychkova^c, I. V. Gorbenko^a,
Yu. M. Konstantinov^{a, b}, I. A. Vasiliev^a, A. S. Morits^a, P. A. Bizikov^a

^aSiberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry (SIPPB SB RAS), Irkutsk, 664033 Russia

^bIrkutsk State University, Irkutsk, 664003 Russia

^cDemidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, 150003 Russia

*e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

We have previously shown the ability of endophytic bacteria to move out of the pea plant seedling roots (*Pisum sativum* L.) into the rhizosphere. In this study, six distinct bacterial strains were isolated from the root growth medium during the cultivation of seedlings in an aqueous medium. By analyzing the nucleotide sequence of 16S rRNA genes, the taxonomic position of these strains was established, their morphological and cultural parameters were assessed, the activity of hydrolytic enzymes (pectinase, cellulase, protease) and the IAA-producing capability were examined. It has been observed that the quantity of endophytic bacteria that appears on the root surface during the growth of pea seedlings significantly surpasses the quantity present in the root tissues. It is assumed that hydrolytic enzymes such as pectinase and cellulase are involved in the release of bacteria into the external environment, causing the destruction of carbohydrate structures in plant cell walls. The metabolic parameters established in the studied strains and the significance of these endophytic bacteria for the host plant after their exit from the roots into the rhizosphere are under discussion.

Keywords: endophytic bacteria strains, 16S rRNA genes, pectinase, cellulase, protease, IAA-producing capability of bacteria