

УДК 579.6

УСТОЙЧИВЫЕ К ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ PGPR ШТАММЫ *PSEUDOMONAS* SP., СТИМУЛИРУЮЩИЕ РОСТ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ ПРИ КАДМИЕВОМ СТРЕССЕ

© 2024 г. О. В. Чубукова*, @, Л. Р. Хакимова*, Р. Т. Матниязов*, З. Р. Вершинина* **

*Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,

"росп. Октября, 71, Уфа, 450054 Россия

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Уфимский государственный нефтяной технический университет», ул. Космонавтов, 1, Уфа, 450000 Россия

@E-mail: chubukova@bk.ru

Поступила в редакцию 17.11.2023 г.

После доработки 01.03.2024 г.

Принята к публикации 03.03.2024 г.

Из почвы, загрязненной химическими отходами, были выделены и исследованы три штамма бактерий рода *Pseudomonas*, обладающие устойчивостью к тяжелым металлам. В результате анализа генов 16S рРНК и *rpoD* штамм *Pseudomonas* sp. 17 НМ был идентифицирован как *Pseudomonas capeferrum*, а штаммы *Pseudomonas* sp. 65 НМ и 67 НМ оказались наиболее близки к типовым штаммам *Pseudomonas silesiensis* и *Pseudomonas umsongensis*. соответственно. Было показано, что штаммы *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ, 67 НМ характеризуются разным уровнем устойчивости к тяжелым металлам: максимальная толерантная концентрация (МТК) цинка составила 1 мМ для всех штаммов, кадмия 1, 1.5, 1 мМ, свинца 5, 5, 4 мМ, никеля 7, 9, 7 мМ, соответственно. Все штаммы псевдомонад могут формировать биопленки и обладают свойствами PGPR-бактерий. Обработка семян люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) штаммами *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ, 67 НМ в условиях кадмиевого стресса приводила к повышению сухой биомассы проростков люцерны до 40% и увеличению содержания хлорофилла *a* и *b* в листьях на 25–33% относительно контроля.

Ключевые слова: PGPR-штаммы, род *Pseudomonas*, ген 16S рРНК, ген *rpoD*, кадмиевый стресс, максимальная толерантная концентрация, тяжелые металлы

DOI: 10.31857/S1026347024050037, **EDN:** ulutlw

В настоящее время в результате растущей техногенной нагрузки актуальной проблемой сельского хозяйства является загрязнение почвы, снижение урожайности растений и качества аграрной продукции. На сегодняшний день одними из наиболее опасных экополлютантов являются тяжелые металлы (ТМ), такие как свинец (Pb), кадмий (Cd), ртуть (Hg), хром (Cr), цинк (Zn) и другие (Choudhury, Chatterjee, 2022). Ряд ТМ (молибден (Mo), железо (Fe), медь (Cu), марганец (Mn), цинк (Zn), никель (Ni), кобальт (Co)) в микроколичествах необходимы для функционирования растений и микроорганизмов. Другие, такие как Cd, Pb, Hg и Ag не выполняют никакой биологической функции и токсичны уже в микродозах (Raklami *et al.*, 2022). ТМ не поддаются разложению и способны накапливаться во всех звеньях пищевой цепи, что приводит к снижению роста и урожайности растений, к опасным

заболеваниям человека и животных (Pande *et al.*, 2022). Одним из многообещающих подходов к решению данных проблем является использование стимулирующих рост растений бактерий (PGPR), (plant growth-promoting rhizobacteria), которые колонизируют корни растения и способны улучшить его рост как в нормальных, так и в стрессовых условиях путем синтеза антимикробных и антигрибных соединений, органических кислот, гормонов, сидерофоров, фосфатмобилизирующих свойств и других процессов (Wang *et al.*, 2022). Также PGPR бактерии, обладающие устойчивостью к ТМ, могут снизить токсическую нагрузку на растения за счет различных механизмов: биосорбции, биоаккумуляции, биотрансформации и биоминерализации (Raklami *et al.*, 2022).

По данным литературы значительная часть ризосферных микроорганизмов представлена

грамотрицательными бактериями *Pseudomonas* sp. (Berendsen *et al.*, 2015). Представители данного рода отличаются высокой конкурентоспособностью и метаболической активностью, среди них описаны штаммы *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. protegens*, *P. kilonensis*, обладающие PGPR свойствами (Gu *et al.*, 2020; Чубукова и др., 2022). Биоудобрения на основе PGPR штаммов *Pseudomonas* sp. активно применяют в агротехнологиях для повышения урожайности сельскохозяйственных культур, поддержания продуктивности почвы и снижения доли вносимых химических удобрений (Singh *et al.*, 2022). В различных исследованиях также продемонстрированы примеры успешного применения PGPR штаммов псевдомонад для улучшения роста растений в почвах, загрязненных ТМ. Описана работа, в которой обработка растений томата (*Lycopersicon esculentum*), штаммом *Pseudomonas aeruginosa*, в условиях кадмиевого загрязнения вызвала улучшение ростовых параметров, повышение содержания фотосинтетических пигментов и снижение накопления Cd в тканях растения (Khanna *et al.*, 2019). В работе (Manzoog *et al.*, 2019) было показано, что в результате инокуляции штаммом *Pseudomonas* sp. strain PG-12 папоротника *Pteris vittata*, растущего на среде, загрязненной Pb, происходило улучшение фосфорного питания, роста и уменьшение содержания Pb в опытных растениях в сравнении с контролем. Штамм *Pseudomonas putida* SFB3 показал высокую устойчивость к нескольким ТМ (Cd, Cu, Pb, Ni, Zn) и способность улучшать всхожесть и ростовые характеристики вигны лучистой (*Vigna radiata*) в условиях загрязнения указанными поллютантами (Saif, Khan, 2017). Подобные штаммы могут быть использованы в качестве биоудобрения для выращивания агрокультур на почвах с небольшим загрязнением ТМ.

Для сельского хозяйства перспективным представляется применение многофункциональных штаммов *Pseudomonas* sp., сочетающих ростостимулирующие свойства и устойчивость к ТМ, которые в перспективе могут способствовать увеличению биомассы растений и усилить защитные свойства растений в условиях загрязнения ТМ.

Целью данной работы был поиск устойчивых к ТМ штаммов *Pseudomonas* sp., выделенных из загрязненных почв, и исследование ростостимулирующих и защитных свойств данных микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение чистых культур микроорганизмов из образцов почвы. Объектом исследования являлись микроорганизмы, выделенные из образцов почв, собранных в районе химического завода в г. Уфа. Для получения бактериальных изолятов

навески почв гомогенизировали в стерильной среде LB (масс. % в водном растворе: бактотриптон — 1, дрожжевой экстракт — 0.5, NaCl — 0.5). Инкубировали на качалке при комнатной температуре и 160 об/мин, через 30 мин отбирали надосадочную жидкость из которой готовили серию десятикратных разведений. Из разведений в 10^4 и 10^5 по 100 мкл рассеивали на чашки с агаризованной средой LB, содержащие Pb^{2+} и Ni^{2+} (с использованием солей $Pb(CH_3COO)_2$ и $NiCl_2$, соответственно) в концентрации 3 мМ и выращивали в течение 5 дней при температуре 28°C (Desoky *et al.*, 2020). Выросшие отдельные колонии пересевали и культивировали на чашках при 28°C и 37°C для исключения потенциальных патогенов человека и животных. Дальнейшие исследования проводились на штаммах с температурой роста при 28°C. Бактериальные изоляты пересевали на агаризованную среду LB без ТМ и выращивали сутки при 28°C.

Максимальную толерантную концентрацию (МТК) к Cd, Ni, Zn, Pb определяли на агаризованной питательной среде Nutrient Broth (NB) (масс. % в водном растворе: бактотриптон — 0.5, мясной экстракт — 0.15, дрожжевой экстракт — 0.15, NaCl — 0.5, агар — 0.1) с возрастающими концентрациями ТМ (Mtengai *et al.*, 2022). Для этого предварительно стерилизованные растворы солей $CdCl_2$, $NiCl_2$, $ZnSO_4$, $Pb(CH_3COO)_2$ в различных концентрациях добавляли к среде NB с агаром сразу после автоклавирования. МТК определяли как максимальную концентрацию металла в среде, при которой еще наблюдался рост колоний на чашках с агаром. Контролем служила среда без добавления ТМ. Штаммы выращивали на чашках при 28°C в течение 5 суток.

ДНК из бактерий выделяли лизированием клеток в 1% Triton X100 и 1% — ной суспензии Chelex100. Надосадочную жидкость брали в качестве матрицы для ПЦР (Чубукова и др., 2022).

Молекулярно-генетическая идентификация бактериальных штаммов. Генетическое разнообразие собранных изолятов исследовали с помощью RAPD анализа (Random Amplified Polymorphic DNA) с использованием следующих “случайных” праймеров: 1) LMBD 5'-GGGCGCTG-3'; 2) AFK 5'-ACGGTGGACG-3' (Чубукова и др., 2022).

Для амплификации гена 16S рРНК были использованы универсальные праймеры fD1 5'-CCCGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3' и rD1 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', фланкирующие фрагмент гена размером около 1500 пн (Чубукова и др., 2022). Для амплификации фрагмента гена *rpoD* были использованы праймеры PsEG30F 5'-ATYGAAATCGCCAARCG-3' и PsEG790R 5'-CGGTTGATKTCCTTGA-3' с размером продукта 760 п.н. (Mulet *et al.*, 2009).

Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе

Applied Biosystems 3500 фирмы “Applied Biosystems, Inc.” (США) с использованием наборов “Big Dye Terminator v. 3.1”.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergene фирмы “DNASTAR, Inc.” (США). Нуклеотидные последовательности для сравнительного анализа были взяты из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием метода множественного выравнивания Clustal W в программе Megalign Lasergene (DNASTAR, США).

Статистическую достоверность ветвления (bootstrap-анализ) оценивали с использованием соответствующей функции программы Megalign на основе 1000 альтернативных деревьев.

Анализ бактериальных биопленок, формируемых на инертных поверхностях. Для получения биопленок использовали среду LB, YM (масс. % в водном растворе: маннитол — 1, дрожжевой экстракт — 0.04, NaCl — 0.01, MgSO₄ — 0.01, K₂HPO₄ · 3H₂O — 0.05, агар — 1) и МН (масс. % в водном растворе: кислый казеиновый пептон — 1.75, крахмал — 0.15, вытяжка из говядины — 0.2) с применением 24-луночных пластиковых планшетов (полистирол) (“Corning Inc.”, США) согласно методике (Чубукова и др., 2022). Для определения относительных показателей плотности биопленки использовали метод окрашивания генцианом фиолетовым (“Агат-Мед”, Россия) (Чубукова и др., 2022). Оптическую плотность образцов измеряли с помощью прибора Enspire Model 2300 Multilabel Microplate Reader (“Perkin Elmer”, США).

Микроскопирование корней растений. Для исследования способности бактерий формировать биопленки на корнях растений штаммы *Pseudomonas* sp. были трансформированы ранее сконструированной генетической конструкцией на основе вектора pJN105, в которую был добавлен ген флуоресцентного белка TurboRFP (Баймиев и др., 2011). Полученными флуоресцентными штаммами псевдомонад были обработаны корни проростков люцерны.

Подготовка электрокомпетентных клеток и их трансформация, а также электрофорез фрагментов ДНК проводились согласно (Sambrook, 1989).

Стерильные семена люцерны посевной (*Medicago sativa*, L.) проращивали в течение 7 дней на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Далее проростки выдерживали при покачивании (50 об./мин) в суспензии бактерий (10⁶ КОЕ/мл) в течение суток. Для приготовления суспензий использовали суточные культуры бактерий, выращенные в жидкой среде LB.

Визуальное наблюдение меченых микроорганизмов на корнях растений проводили на флуоресцентном микроскопе AxioImagerM1 (“CarlZeiss”, Германия).

Исследование влияния бактерий на рост растений.

Семена растений люцерны посевной стерилизовали в течение 1 мин в 70% спирте, затем 20 мин в 5% растворе гипохлорита натрия и промывали несколько раз стерильной водой. Далее семена выдерживали в течение 30 мин в воде (контроль) или в суточной суспензии бактерий, которые предварительно выращивали на качалках в жидкой среде LB до концентрации 10⁸ КОЕ/мл и разводили до концентрации 10⁶ КОЕ/мл. Семена (100 штук) выращивали на смоченной водой фильтровальной бумаге в течение 3 сут при комнатной температуре в темноте. Аналогично выращивали в стрессовом варианте опыта семена без обработки и с обработкой бактериями на фильтровальной бумаге, смоченной раствором CdCl₂ в концентрации 0.5 мМ. Далее проросшие семена выращивали при естественном освещении в дистиллированной воде или в стрессовом варианте опыта в растворе CdCl₂ в концентрации 0.5 мМ в течение 7 сут. Часть растений использовали для определения содержания фотосинтетических пигментов, у остальных контрольных и опытных растений измеряли сухую биомассу. Для этого растения целиком высушивали в сушильном шкафу до постоянного веса, а затем взвешивали.

Определение содержания фотосинтетических пигментов. Экстракцию и определение содержания пигментов в растительных тканях проводили согласно (Maslennikova *et al.*, 2022). Для этого листья растений (0.05 г) гомогенизировали в 90% этаноле (10 мл) с добавлением CaCO₃ и фильтровали. Оптическую плотность отфильтрованных экстрактов измеряли с помощью спектрофотометра SmartSpec™ Plus spectrophotometer (Bio–Rad, США) при 663 (Хл а), 646 (Хл b).

Выявление фосфатмобилизующей активности при росте бактерий на агаризованной питательной среде. Анализ способности штаммов *Pseudomonas* sp. к мобилизации неорганического фосфора проводили по определению площади зоны просветления (гало) вокруг колоний через 1–4 сут на чашках со средой Муромцева (масс. % в водном растворе: глюкоза — 1, аспарагин — 1, K₂SO₄ — 0.02, MgSO₄ — 0.02, кукурузный экстракт — 0.002, агар — 2; pH 6.8), содержащей нерастворимый фосфат. В качестве источника фосфора в среду добавляли Са₃(РО₄)₂ в концентрации 5 г/л (Чубукова и др., 2022).

Определение способности бактерий синтезировать индолил-3-уксусную кислоту (ИУК). Для изучения способности микроорганизмов синтезировать ауксины их выращивали на среде LB с добавлением 1 мг/мл триптофана в течение 5 сут, после чего культуру центрифугировали 5 мин при 1300 об/мин. Затем к супернатанту добавляли реактив Сальковского (2 мл 0.5 М раствора FeCl₃ и 100 мл 37% HClO₄) в соотношении 1:2 и выдерживали в темноте в течение 30 мин. Определение уровня

ауксинов в супернатанте проводили колориметрическим методом по калибровочной кривой, построенной с использованием растворов ИУК с концентрацией 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 мкг/мл с помощью планшетного спектрофотометра Enspire Model 2300 Multilabel Microplate Reader (“Perkin Elmer”, США) при 535 нм (Maslennikova *et al.*, 2022).

Определение сидерофорной активности. Продукцию сидерофоров определяли, используя универсальный метод, с применением минимальной среды с CAS-реактивом (синий агар) (Maslennikova *et al.*, 2022). Бактерии выращивали на чашках с «синим» агаром в течение 7 дней. Появление желтого «гало» вокруг колонии выявляло выделение сидерофоров.

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили в 4-кратной повторности и каждый независимо воспроизводили не менее 3 раз.

Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010, доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

Депонирование штаммов. Последовательности исследованных штаммов были зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами ON892076, ON892493, ON892495 для гена 16S рРНК и ON993895, OP019022, OP019023 для гена *rpoD*, соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из загрязненной почвы нами было выделено и исследовано 120 изолятов бактерий, выросших на среде с ТМ. Из них было отобрано 70 изолятов с оптимальной температурой роста 28°C. Для идентификации штаммов псевдомонад из различных природных образцов ранее М. Мюлет с соавторами предложили использовать ПЦР с применением разработанных ими высокоселективных праймеров (PsEG30F и PsEG790R), специфичных к консервативным регионам гена *rpoD* бактерий *Pseudomonas* sp., кодирующего бактериальный фактор инициации транскрипции (Mulet *et al.*, 2009; Lalucat *et al.*, 2020). ПЦР анализ бактериальных изолятов с указанными праймерами выявил ожидаемый продукт в размере 760 п.н. у трех штаммов. Отобранные чистые культуры изучаемых микроорганизмов предварительно проверяли на гетерогенность с помощью RAPD-анализа с применением “произвольных” олигонуклеотидных праймеров AFK и LMBD.

Для определения филогенетической принадлежности данных штаммов было проведено исследование нуклеотидной последовательности фрагментов консервативных генов *rpoD* и 16S рРНК и сравнительный анализ с другими аналогичными генами из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). В настоящее время принято

считать, что для видовой идентификации бактерий сравнительный анализ генов 16S рРНК обладает недостаточной дискриминирующей способностью вследствие небольшого числа замен в нуклеотидной последовательности данного гена. Это особенно актуально для бактерий рода *Pseudomonas*, включающего более 200 видов, многие из которых филогенетически очень близки (Lalucat *et al.*, 2020). В отличие от гена 16S рРНК ген *rpoD* представлен у бактерий в одной копии, и его последовательность отличается значительной вариабельностью вследствие высокой эволюционной изменчивости. Во многих исследованиях показано, что для бактерий рода *Pseudomonas* филогенетический анализ гена *rpoD* в сравнении с геном 16S рРНК обладает большей разрешающей способностью для идентификации изолятов до вида (Mulet *et al.*, 2010; Lalucat *et al.*, 2020).

Анализ последовательностей генов 16S рРНК и *rpoD* позволил отнести все три исследуемых штамма, получившие название 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ, к роду *Pseudomonas*. На филогенетических деревьях, построенных на основе сравнения последовательностей вышеуказанных генов типовых штаммов псевдомонад и трех идентифицируемых штаммов, последние разделились на три обособленные группы (рис. 1, 2). На древе сходства генов 16S рРНК штамм *Pseudomonas* sp. 17 НМ показал очень высокий уровень гомологии с типовыми штаммами *Pseudomonas capeferrum* WCS358^T и *Pseudomonas putida* ATCC 12633^T (99.4% и 99.6%, соответственно), тогда как его сходство по гену *rpoD* с указанными штаммами составило 99.7% и 85.9%, соответственно. Таким образом, на основании полученных данных штамм *Pseudomonas* sp. 17 НМ можно идентифицировать как *P. capeferrum*. Штамм *Pseudomonas* sp. 65 НМ на 16S рРНК и *rpoD*-дендрограммах оказался наиболее близок к типовому штамму *Pseudomonas silesiensis* A3^T (99.7% и 96.7%, соответственно), а *Pseudomonas* sp. 67 НМ к типовому штамму *Pseudomonas umsongensis* LMG 21317^T (98.6% и 95.6%, соответственно). Охарактеризованные штаммы были депонированы в коллекции микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН «Симбионт».

По ранее полученным данным сравнительного анализа генов 16S рРНК и *rpoD* род *Pseudomonas* можно разделить на три основные группы: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pertucinogena* и *Pseudomonas fluorescens* (Lalucat *et al.*, 2020; Girard *et al.*, 2020). Секвенирование вышеуказанных генов выявило, что штаммы *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ с большой вероятностью можно отнести к видам *P. capeferrum*, *P. silesiensis*, *P. umsongensis*, соответственно, которые входят в группу *P. fluorescens*. Сообщалось, что представители данных видов в большинстве случаев были выделены из почв и многие из них обладали

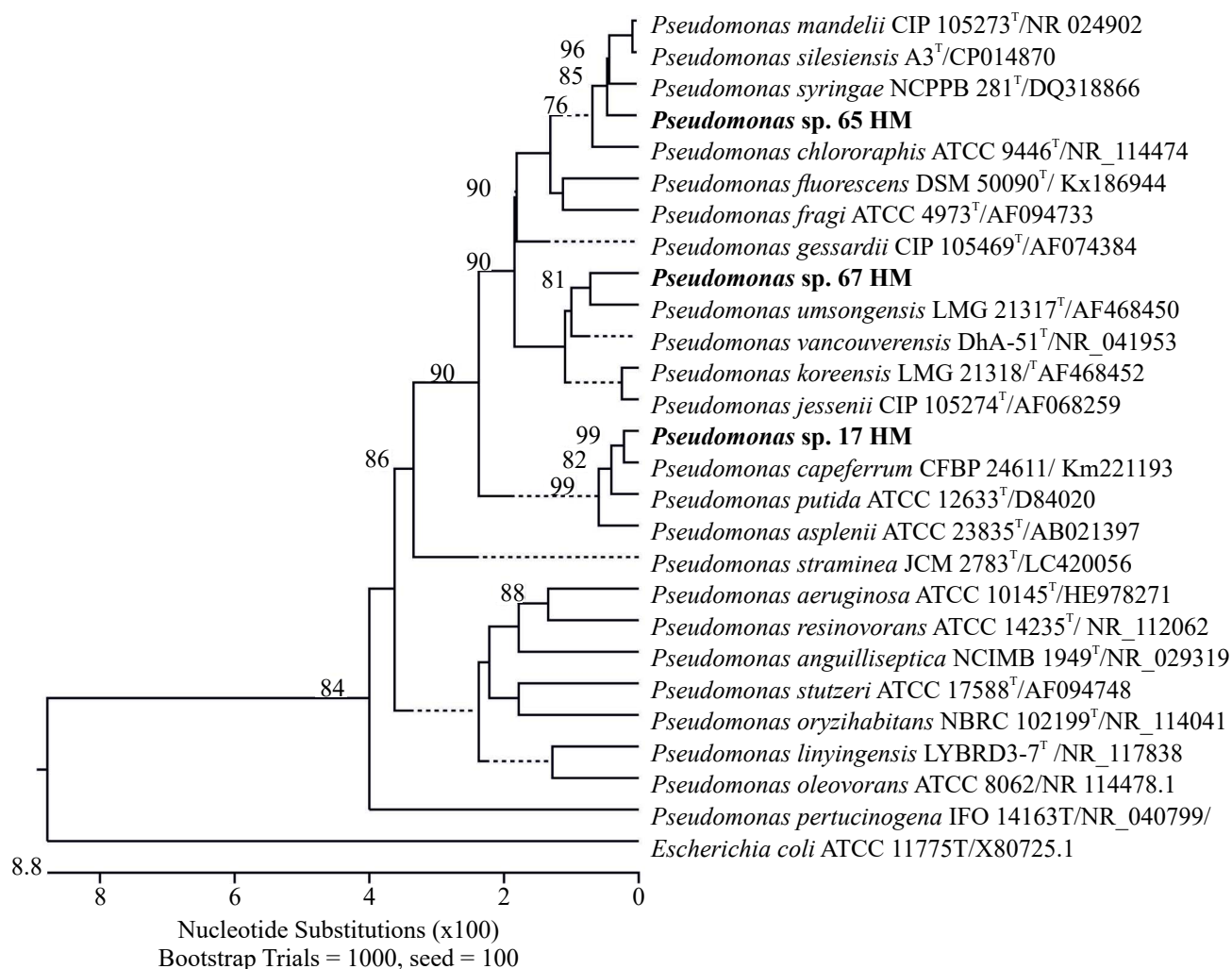


Рис. 1. Филогенетическое дерево бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена 16S рРНК. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (показаны величины показателя “bootstrap”-анализа от 70%). На горизонтальной оси приведен вес данного выравнивания, выраженный в количестве замен нуклеотидов ($\times 100$). В качестве внешней группы использована нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК *E. coli* ATCC 11775T.

свойствами PGPR бактерий, а также способностью к биоаккумуляции и биодegradации загрязняющих веществ (Berendsen *et al.*, 2015; Kaminski *et al.*, 2018; Narancic *et al.*, 2021).

Анализ металлорезистентности бактериальных штаммов. При культивировании штаммов *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ на питательной агаризованной среде NB с ТМ было установлено, что исследуемые бактерии характеризуются разным уровнем устойчивости к токсическому действию Cd, Ni, Pb, Zn (табл. 1). Минимальный уровень резистентности все три штамма псевдомонад показали к Zn и Cd; МТК цинка составил 1 мМ для трех штаммов, а МТК кадмия – 1, 1.5 и 1 мМ для штаммов *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ, соответственно. Значительную резистентность

все штаммы проявили к Pb; МТК штаммов *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ составила 5, 5, 4 мМ, соответственно. Наиболее высокую резистентность исследуемые штаммы псевдомонад проявили к Ni, причем наилучшие показатели были у *Pseudomonas* sp. 65 НМ (МТК 9 мМ).

Таким образом, анализ роста бактерий на твердых средах показал, что штаммы *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ отличаются повышенной резистентностью к Ni и Pb, и низким уровнем резистентности к Zn и Cd, что вероятно связано с различными механизмами устойчивости исследованных микроорганизмов к определенному ТМ. Полученные результаты соответствуют данным других исследований, в которых была выявлена подобная шкала устойчивости к ТМ у различных

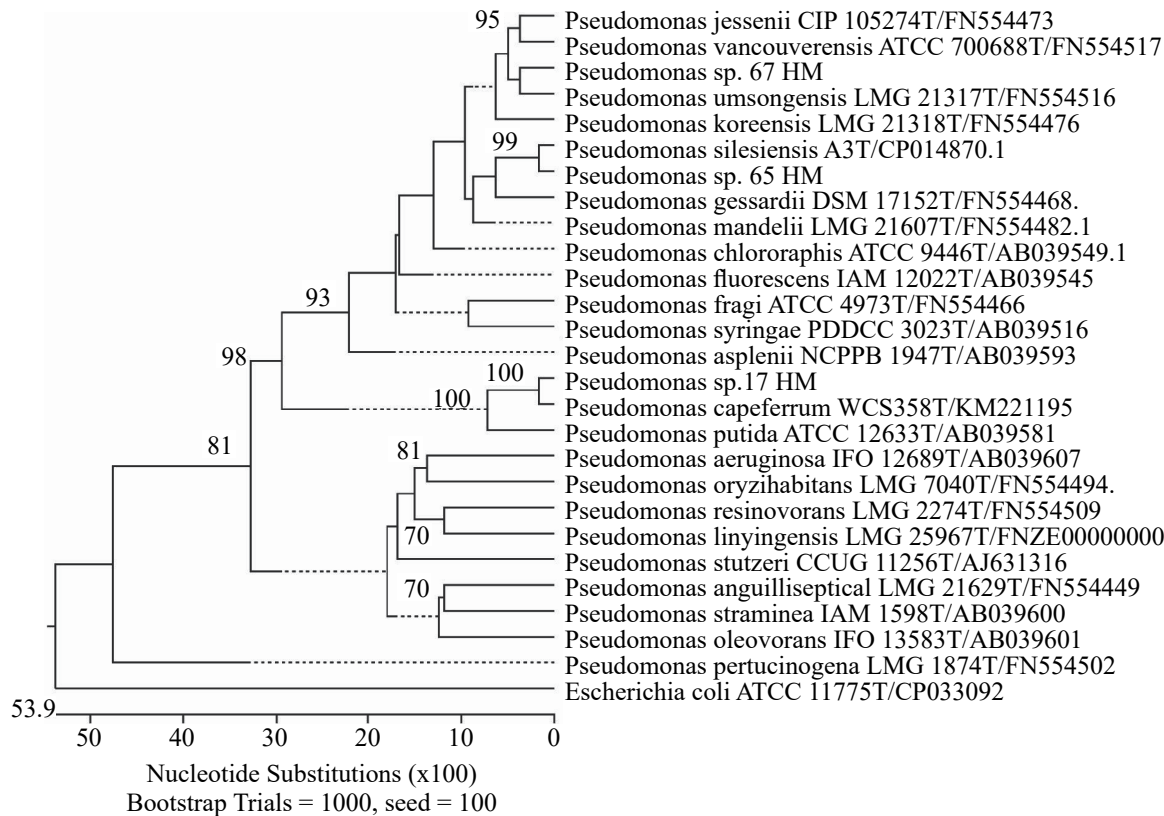


Рис. 2. Филогенетическое древо бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *rpoD*. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (показаны величины показателя “bootstrap”-анализа от 70%). На горизонтальной оси приведен вес данного выравнивания, выраженный в количестве замен нуклеотидов (×100). В качестве внешней группы использована нуклеотидная последовательность гена *rpoD* *E. coli* ATCC 11775T.

штаммов *Pseudomonas* sp., выделенных из донных отложений и почвы (Akinbowale *et al.*, 2007),

В целом, наиболее высокая резистентность к большинству исследованных ТМ была выявлена у штамма *Pseudomonas* sp. 65 HM. Подобные устойчивые штаммы могут быть использованы в биоремедиации, например, в качестве биосорбентов для удаления Ni и Pb из загрязненной воды, почвы, промышленных отходов. Ранее сообщалось о эффективной биосорбции Pb из сточных вод почвенной психротрофной бактерией *Pseudomonas* sp. I3, с минимальной ингибирующей концентрацией Pb²⁺ 7,5 мМ (Li *et al.*, 2017). У штамма *Pseudomonas aeruginosa* Zambia SZK17 Kabwe1 с множественной устойчивостью к ТМ, включая Ni²⁺ в концентрации до 2 мМ, была показана способность к их удалению из жидкой среды (Mtengai *et al.*, 2022). В исследовании (Patel *et al.*, 2006) описан штамм *Pseudomonas fragi*, способный к максимальной аккумуляции Ni в присутствии 2 мМ данного ТМ в среде.

Исследование биоуплотнения штаммами *Pseudomonas* sp. Устойчивость к ТМ выше у бактерий, организованных в биоуплотнения – специализированные

структуры, позволяющие им адаптироваться к меняющимся или неблагоприятным условиям окружающей среды (Pande *et al.*, 2022). Бактериальные биоуплотнения являются особенно эффективными для биоремедиации различных сред (почв, воды), загрязненных экоплютантами, из-за высокой микробной биомассы и лучшей, в сравнении с планктонными клетками, способности к биоаккумуляции и биосорбции различных соединений (Choudhury, Chatterjee, 2022).

Нами была изучена способность штаммов *Pseudomonas* sp. 17 HM, 65 HM и 67 HM к биоуплотнению

Табл.1. Максимальные толерантные концентрации (МТК) тяжелых металлов исследованных штаммов бактерий

Штамм <i>Pseudomonas</i> sp.	МТК, мМ			
	Cd	Ni	Pb	Zn
17 HM	1	7	5	1
65 HM	1.5	9	5	1
67 HM	1	7	4	1

образованию в различных средах на инертных поверхностях. Исследования показали, что все три штамма почвенных псевдомонад формировали зрелые биопленки на поверхности пластиковых планшетов как в богатых, так и в бедных питательных средах (рис. 3).

Также, применение бактериального препарата на основе резистентных к ТМ PGPR штаммов для фиторемедиации или в качестве биоудобрения будет значительно эффективнее при активной колонизации данными бактериями корневой поверхности растения, сопровождающейся образованием биопленок.

Анализ колонизации корней 7-дневных проростков люцерны после суток совместного инкубирования с флуоресцентными штаммами *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ, 67 НМ показал успешное формирование биопленок на корневой поверхности, а также на корневых волосках растений (рис.4).

Исследование PGPR свойств штаммов псевдомонад. К механизмам прямого положительного влияния PGPR бактерий на растения относится способность синтезировать фитогормоны и улучшать фосфорное питание растений, за счет повышения доступности в ризосфере соединений фосфора (Raklami *et al.*, 2022).

Одним из известных регуляторов роста, вырабатываемых псевдомонадами, является индолил-3-уксусная кислота (ИУК), которая стимулирует рост и развитие корневой системы, а также может влиять на поглощение и транслокацию ТМ растениями (Chen *et al.*, 2017). У всех проанализированных штаммов *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ, 67 НМ, была выявлена способность к синтезу ауксинов, соответствующая значению 5 мкг/мл.

Исследование способности растворять неорганический фосфат в виде фосфата кальция в питательной среде показало, что штаммы *Pseudomonas* sp.

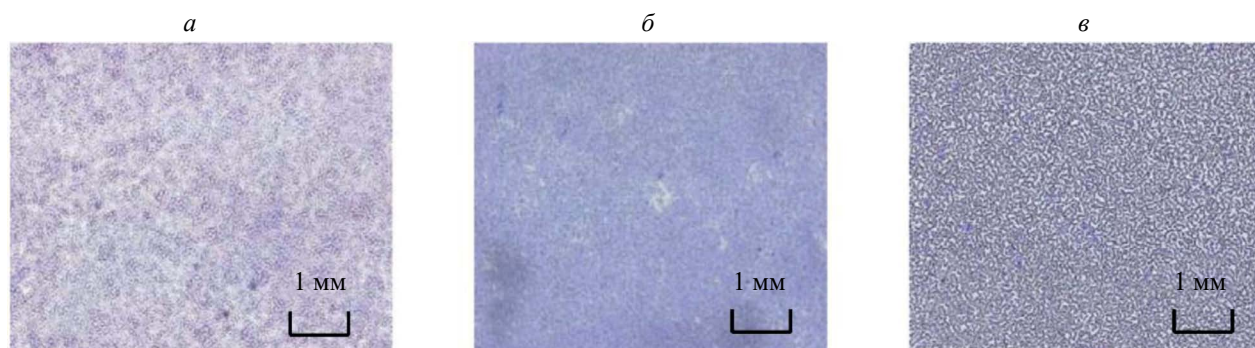


Рис. 3. Биопленки, образуемые штаммами *Pseudomonas* sp. на поверхности планшета через 7 дней культивирования: а – *Pseudomonas* sp. 17 НМ, среда LB; б – *Pseudomonas* sp. 65 НМ, среда YM; в – *Pseudomonas* sp. 67 НМ, среда MH.

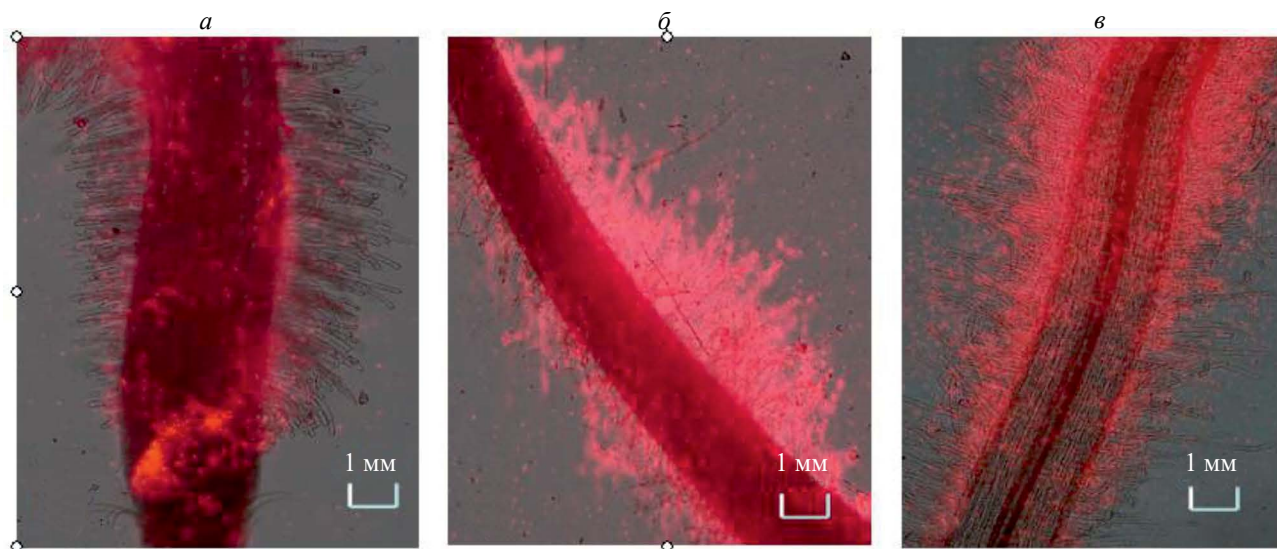


Рис. 4. Образование биопленок на поверхности корней проростков люцерны через 24 ч совместного культивирования: а – *Pseudomonas* sp. 17 НМ; б – *Pseudomonas* sp. 65 НМ; в – *Pseudomonas* sp. 67 НМ.

17 НМ, 65 НМ, 67 НМ обладают фосфатмобилизующей активностью. Причем лучшая мобилизация $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ наблюдалась у штамма *Pseudomonas* sp. 17 НМ (рис. 5).

К непрямым механизмам положительного воздействия бактерий на растения можно отнести продукцию сидерофоров, низкомолекулярных соединений, эффективно связывающих трехвалентное железо (Fe^{3+}) из почвы в комплексы, которые далее поступают в клетки бактерий. Таким образом, сидерофор-продуцирующие ризосферные бактерии, конкурируя за железо, замедляют рост фитопатогенных грибов и улучшают рост растения (Maslennikova *et al.*, 2022). Сидерофорная активность была выявлена у штаммов *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ, 67 НМ.

Влияние штаммов псевдомонад на ростовые показатели и содержание фотосинтетических пигментов в листьях люцерны посевной в нормальных условиях и в присутствии кадмия. Люцерна является важной бобовой кормовой культурой, отличающейся высокой урожайностью, пищевой ценностью и способностью к повышению продуктивности почвы. Поэтому большое значение имеет исследование способов снижения токсического действия ТМ на данное растение.

Кадмий считается одним из наиболее токсичных ТМ, действие которого в отношении растений проявляется в ингибировании роста, фотосинтеза, снижении урожайности (Khanna *et al.*, 2019). Ранее нами было показано, что Cd^{2+} в концентрации 0.5 мМ оказывал выраженный токсический эффект на проростки люцерны и гороха, тогда как обработка семян штаммом *Pseudomonas* sp. 2.4.1 снижала влияние кадмиевого стресса у инокулированных растений (Khakimova *et al.*, 2023; Хакимова и др., 2022).

В нашем исследовании обработка семян люцерны посевной штаммами *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ, 67 НМ в нормальных условиях приводила к прибавке сухой массы в 20–22% относительно контрольных, необработанных растений (рис. 6а).

Анализ сухой биомассы 7 суточных растений люцерны показал, что кадмиевый стресс закономерно снижал сухую биомассу растений почти в 2 раза по сравнению с нормальными условиями роста. Предобработка штаммами псевдомонад в стрессовых условиях приводила к повышению сухой биомассы люцерны на 25–40 % относительно необработанного контроля (рис. 6б).

Обработка семян штаммами *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ, 67 НМ в нормальных условиях привела к сбалансированному увеличению содержания хлорофилла *a* (Хл *a*) на 5–9% и хлорофилла *b* (Хл *b*) на 14–21 % в листьях люцерны, а сумма данных пигментов в этих растениях была на 7–11% выше уровня контрольных необработанных растений (табл. 2).

В условиях кадмиевого загрязнения в обработанных растениях содержание Хл *a* было на 31–38%, а Хл *b* на 10–30% выше уровня контрольного

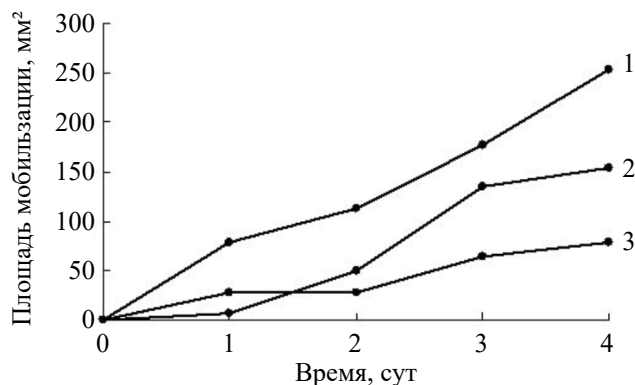


Рис. 5. Динамика мобилизации неорганического фосфата штаммами *Pseudomonas* sp.: 1 — 17 НМ; 2 — 67 НМ; 3 — 65 НМ. По оси абсцисс — сутки, на которые измеряли площадь мобилизации фосфата; по оси ординат — значения площади зон мобилизации фосфата в мм².

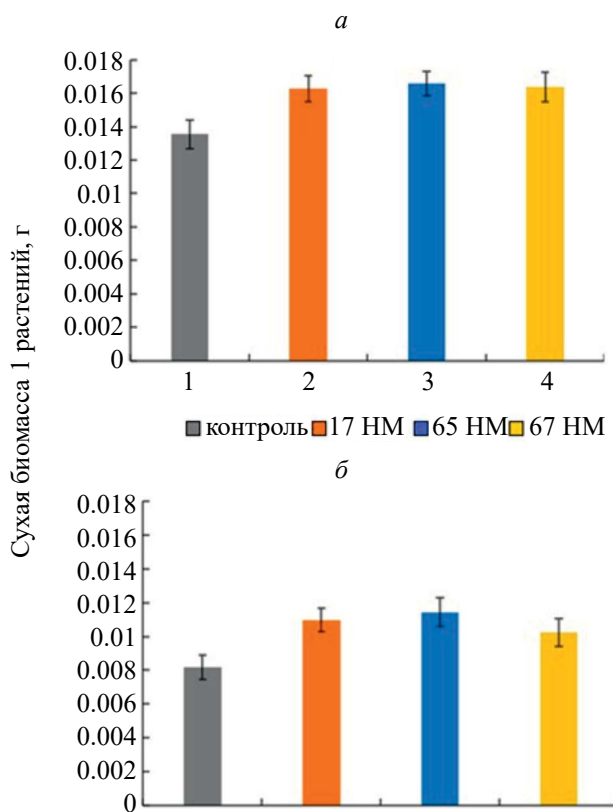


Рис. 6. Влияние штаммов *Pseudomonas* sp. на сухую биомассу растений люцерны посевной (по оси ординат изменение сухой биомассы растений в г при нормальных условиях (а) и в условиях кадмиевого стресса (б). Обозначения штаммов *Pseudomonas* sp. (1–4): 1 — контроль; 2 — 17 НМ; 3 — 65 НМ; 4 — 67 НМ.

стрессового варианта опыта. Сумма Хл *a* и *b* у инокулированных растений была выше соответствующего значения необработанных контрольных стрессовых растений на 25–33% (табл. 2).

Табл. 2. Содержание пигментов (мг/г сырой массы) в листьях растений ($P \leq 0.05$)

	Вариант	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Хлорофилл <i>a</i> + хлорофилл <i>b</i>
Нормальные условия	Контроль	0.54±0.018	0.14±0.010	0.68±0.020
	<i>Pseudomonas</i> sp. 17 НМ	0.58±0.019	0.16±0.013	0.74±0.021
	<i>Pseudomonas</i> sp. 65 НМ	0.59±0.017	0.17±0.011	0.76±0.022
	<i>Pseudomonas</i> sp. 67 НМ	0.57±0.016	0.16±0.012	0.73±0.020
0.5 мМ Cd ²⁺	Контроль	0.26±0.015	0.10±0.009	0.36±0.014
	<i>Pseudomonas</i> sp. 17	0.35±0.017	0.13±0.011	0.47±0.015
	<i>Pseudomonas</i> sp. 65 НМ	0.36±0.016	0.12±0.012	0.48±0.017
	<i>Pseudomonas</i> sp. 67 НМ	0.34±0.019	0.11±0.009	0.45±0.019

Одним из важнейших процессов, обеспечивающим накопление сухой биомассы и в целом продуктивность растений является фотосинтез. Пигментный состав считается основным индикатором, характеризующим работу фотосинтетического аппарата (Khanna *et al.*, 2019; Maslennikova *et al.*, 2022). Обработка семян люцерны штаммами *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ увеличивала содержание Хл *a* и Хл *b* в проростках, что свидетельствовало о повышении интенсивности фотосинтеза в листьях инокулированных растений (табл. 2).

Бактериальная обработка семян увеличивала сухую биомассу растений в присутствии Cd относительно неинокулированного контроля (рис. 6б). В эксперименте Cd привел к истощению Хл *a* и Хл *b*, а также к двукратному снижению суммы хлорофиллов в стрессированных растениях относительно нормальных условий роста. Предобработка штаммами псевдомонад влияла на содержание пигментов в листьях проростков в условиях кадмиевого стресса.

Результаты нашего исследования согласуются с данными работ, в которых показана способность устойчивых к ТМ PGPR штаммов бактерий снижать влияние стресса, вызванного загрязнением ТМ у люцерны посевной. Так, обработка растений люцерны, выросших в почве, загрязненной Cd, почвенными бактериями *Sinorhizobium meliloti*, устойчивыми к ТМ, способствовала увеличению накопления растительной биомассы и улучшению усвоения питательных веществ по сравнению с неинокулированными растениями (Ghnaуа *et al.*, 2015). Сообщалось, что ИУК продуцирующие штаммы *Bacillus filamentosus* и *Bacillus cereus* стимулировали рост корней и побегов у проростков люцерны, в условиях загрязнения среды Zn и Pb, что снижало токсическое действие данных ТМ на растения (Jócsák *et al.*, 2022).

штамма псевдомонад *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ. Исследование показало, что штаммы обладают различным уровнем резистентности к ТМ. Для штаммов *Pseudomonas* sp. 17 НМ, 65 НМ и 67 НМ, значения МТК составили, соответственно; Cd – 1, 1.5, 1 мМ, Pb – 5, 5, 4 мМ, Ni – 7, 9, 7 мМ, Zn – 1 мМ. Для всех штаммов показано наличие фосфатмобилизующей активности и способность к синтезу ИУК и сидерофоров. Предпосевная обработка семян люцерны данными штаммами псевдомонад приводила к увеличению значений сухой биомассы и фотосинтетических пигментов проростков как в нормальных условиях, так и в присутствии Cd. Данный факт демонстрирует наличие ростстимулирующего и защитного эффектов исследуемых бактерий на растения люцерны в условиях кадмиевого загрязнения на начальном этапе роста. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что описанные PGPR штаммы псевдомонад могут обладать перспективой применения в качестве биоудобрения в нормальных условиях и для повышения устойчивости к стрессу люцерны посевной, вызванного загрязнением Cd. При этом необходимы вегетационные и полевые эксперименты для оценки полного потенциала данных штаммов в снижении токсического действия ТМ на растения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена в рамках госзадания (тема № 122041400162-3) с привлечением приборного парка ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе из загрязненных почв были выделены и идентифицированы три новых

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баймиев Ан.Х., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Благова Д.К., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Получение флуоресцентно меченных штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции *in vivo* и *in vitro* // Мол. биология. 2011. № 6. С. 984–991.
- Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Мурысова А.Р., Симороз Е.В., Чумакова А.К., Вершинина З.Р. Влияние *Pseudomonas* spp. на растения люцерны *Medicago sativa* при ингибирующем действии солей кадмия // Таврический вестник аграрной науки. 2022. № 2. С. 155–163.
- Чубукова О.В., Хакимова Л.Р., Акимова Е.С., Вершинина З.Р. Филотения и свойства новых штаммов *Pseudomonas* sp. из ризосферы бобовых растений Южного Урала // Микробиология. 2022. № 5. С. 537–546.
- Akinbowale O.L., Peng H., Grant P., Barton M.D. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia // Int. J. Antimicrob. Agents. 2007. V. 30. P. 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.03.012>
- Berendsen R.L., van Verk M.C., Stringlis I.A., Zamioudis C., Tommassen J., Pieterse C.M., Bakker P.A. Unearthing the genomes of plant-beneficial *Pseudomonas* model strains WCS358, WCS374 and WCS417 // BMC Genomics. 2015. V. 16. P. 539. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1632-z>.
- Chen B., Luo S., Wu Y., Ye J., Wang Q., Xu X., Pan F., Khan K.Y., Feng Y., Yang X. The effects of the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Sasm05 and IAA on the plant growth and cadmium uptake of *Sedum alfredii* Hance // Front Microbiol. 2017. V. 8. P. 2538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02538>
- Choudhury S., Chatterjee A. Microbial application in remediation of heavy metals: an overview // Arch. Microbiol. 2022. V. 204. P. 268. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02874-1>
- Desoky E.S.M., Merwad A.R. M., Semida W.M., Ibrahim S.A., El-Saadony M. T., Rady M.M. Heavy metals-resistant bacteria (HM-RB): Potential bioremediators of heavy metals-stressed *Spinacia oleracea* plant // Ecotoxicol. Environ. Saf. // 2020. V. 198. P. 110685. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110685>
- Ghnaya T., Mnassri M., Ghabriche R., Wali M., Poschenrieder C., Lutts S., Abdelly C. Nodulation by *Sinorhizobium meliloti* originated from a mining soil alleviates Cd toxicity and increases Cd-phytoextraction in *Medicago sativa* L. // Front. Plant 2015. V. 6. P. 863. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.0086>
- Girard L., Lood C., Rokni-Zadh H., van Noort V., Lavigne R., De Mot R. Reliable identification of environmental *Pseudomonas* isolates using the *rpoD* gene // Microorganisms. 2020. V. 8. P. 1166. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081166>
- Gu Y., Ma Y.N., Wang J., Xia Z., Wei H.L. Genomic insights into a plant growth-promoting *Pseudomonas koreensis* strain with cyclic lipopeptide-mediated antifungal activity // Microbiology. 2020. V. 9. e1092. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1092>
- Jócsák I., Knolmayer B., Szarvas M., Rabnecz G., Pál-Fám F. Literature review on the effects of heavy metal stress and alleviating possibilities through exogenously applied agents in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Plants (Basel). 2022. V.11. P. 2161. <https://doi.org/10.3390/plants11162161>
- Khakimova L., Chubukova O., Vershinina Z., Maslennikova D. Effects of *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 on growth and tolerance to cadmium stress in *Pisum sativum* L. // BioTech (Basel). 2023. V. 12. P. 5. <https://doi.org/10.3390/biotech12010005>.
- Kaminski M.A., Furmanczyk E.M., Sobczak A., Dziembowski A., Lipinski L. *Pseudomonas silesiensis* sp. nov. strain A3^T isolated from a biological pesticide sewage treatment plant and analysis of the complete genome sequence // Syst. Appl. Microbiol. 2018. V. 41. P. 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.002>
- Khanna K., Jamwal V.L., Gandhi S.G., Ohri P., Bhardwaj R. Metal resistant PGPR lowered Cd uptake and expression of metal transporter genes with improved growth and photosynthetic pigments in *Lycopersicon esculentum* under metal toxicity // Scientific reports. 2019. V. 9. 5855. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41899-3>
- Lalucat J., Mulet M., Gomila M., García-Valdés E. Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas* // Genes (Basel). 2020. V. 11. P. 139. <https://doi.org/10.3390/genes11020139>
- Li D., Xu X., Yu H., Han X. Characterization of Pb²⁺ biosorption by psychrotrophic strain *Pseudomonas* sp. I3 isolated from permafrost soil of Mohe wetland in Northeast China // J. Environ. Manage. 2017. V. 196. P. 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.02.076>
- Maslennikova D., Nasyrova K., Chubukova O., Akimova E., Baymiev A., Blagova D., Ibragimov A., Lastochkina O. Effects of *Rhizobium leguminosarum* Thy2 on the growth and tolerance to cadmium stress of wheat plants // Life (Basel). 2022. V. 12. P. 1675. <https://doi.org/10.3390/life12101675>
- Mtengai K., Ramasamy S., Msimuko P., Mzula A., Mweiga E.D. Existence of a novel heavy metal-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain Zambia SZK-17 Kabwe 1: the potential bioremediation agent in the heavy metal-contaminated area // Environ. Monit. Assess. 2022. V. 194. P. 887. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10565-z>
- Mulet M., Bennasar A., Lalucat J., Garcia-Valdes E. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification

- of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples // *Mol. Cell Probes*. 2009. V. 23. P. 140–147.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.02.001>
- Mulet M., Lalucat J., García-Valdés E. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species // *Environ. Microbiol.* 2010. V. 12. P. 1513–1530.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x>
- Manzoor M., Abid R., Rathinasabapathi B., De Oliveira L.M., da Silva E., Deng F., Rensing C., Arshad M., Gul I., Xian P., Ma L.Q. Metal tolerance of arsenic-resistant bacteria and their ability to promote plant growth of *Pteris vittata* in Pb-contaminated soil // *Sci Total Environ.* 2019. V. 660. P. 18–24.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.013>
- Narancic T., Salvador, M., Hughes, G. M., Beagan, N., Abdulmutalib, U., Kenny, S. T., Jimenez, J. I. Genome analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas umsongensis* GO16: the genetic basis for PET monomer upcycling into polyhydroxyalkanoates // *Microb. Biotechnol.* 2021. V. 14. P. 2463–2480.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13712>
- Pande V., Pandey S.C., Sati D., Bhatt P., Samant M. Microbial interventions in bioremediation of heavy metal contaminants in agroecosystem // *Front. Microbiol.* 2022. V. 6. P. 824084.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.824084>
- Patel J.S., Patel P.C., Kalra K. Isolation and characterization of nickel uptake by nickel resistant bacterial isolate (NiR-BI) // *Biomed. Environ. Sci.* 2006. V. 19 P. 297–301.
- Raklami A., Meddich A., Oufdou K., Baslam M. Plants-microorganisms-based bioremediation for heavy metal cleanup: recent developments, phytoremediation techniques, regulation mechanisms, and molecular responses // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 5031.
<https://doi.org/10.3390/ijms23095031>
- Saif S., Khan M.S. Assessment of heavy metals toxicity on plant growth promoting rhizobacteria and seedling characteristics of *Pseudomonas putida* SFB3 inoculated greengram // *Acta Scientific Agriculture.* 2017. V. 1. P. 47–56.
- Singh P., Singh R.K., Zhou Y., Wang J., Jiang Y., Shen N., Jiang M. Unlocking the strength of plant growth promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal and challenging environments: a review // *J. Plant Interac.* 2022. V. 17. P. 220–238.
<https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2029963>
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
- Wang Y., Narayanan M., Shi X., Chen X., Li Z., Natarajan D., Ma Y. Plant growth-promoting bacteria in metal-contaminated soil: Current perspectives on remediation mechanisms // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. P. 966226.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.966226>

Heavy metals-resistant PGPR strains of *Pseudomonas* sp. stimulating the growth of alfalfa under cadmium stress

O. V. Chubukova^{1, #}, L. R. Khakimova¹, R. T. Matnyazov¹, Z. R. Vershinina^{1, 2}

¹Institute of Biochemistry and Genetics—Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
 of the Russian Academy of Sciences, st. Prospect Oktyabrya, 71, Ufa, 450054 Russia

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Ufa State Petroleum Technological University”,
 st. Kosmonavtov, 1, Ufa, 450000 Russia

[#]E-mail: chubukova@bk.ru

Three bacteria strains of *Pseudomonas* sp. resistant to heavy metals were isolated from the chemically contaminated soil. According to the results on the nucleotide sequences of the 16S rRNA and *rpoD* genes, strain *Pseudomonas* sp. 17 HM was identified as *Pseudomonas capeferrum*, and the strains of *Pseudomonas* sp. 65 HM и 67 HM were most closely related to the type strain of *Pseudomonas silesiensis* и *Pseudomonas umsongensis*, respectively. It has been shown that strains of *Pseudomonas* sp. 17 HM, 65 HM, 67 HM are characterized by different levels of resistance of heavy metals: maximum tolerance concentration (MTC) of zinc was 1 mM for all strains, cadmium 1, 1.5, 1 mM, lead 5, 5, 4 mM, nickel 7, 9, 7 mM, respectively. All pseudomonad strains can form biofilms and have the properties of PGPR bacteria. Treatment of alfalfa seeds (*Medicago sativa* L.) with strains *Pseudomonas* sp. 17 HM, 65 HM, 67 HM under cadmium stress led to an increase in the dry weight of alfalfa seedling up to 40 % and the content of chlorophyll *a* and *b* in the leaves by 25–33% relative to the control.

Key words: PGPR strains, *Pseudomonas* sp., 16S rRNA gene, *rpoD* gene, cadmium stress, maximum tolerant concentration, heavy metals