

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОРНЕЙ *IPOMOEA PES-CAPRAE* (L.)

### Нгуен Ван Жанг

к.с.-х.н., доцент, преподаватель, кафедра микробиологической биотехнологии, факультет биотехнологии, Вьетнамский национальный сельскохозяйственный университет (г. Ханой, Вьетнам)  
E-mail: nvgiang@vnua.edu.vn

### Нгуен Тхи Тьу

магистр, кафедра микробиологической биотехнологии, факультет биотехнологии, Вьетнамский национальный сельскохозяйственный университет (г. Ханой, Вьетнам)  
E-mail: thunguyenntc@gmail.com

### Ву Ть Линь

магистр, кафедра микробиологической биотехнологии, факультет биотехнологии, Вьетнамский национальный сельскохозяйственный университет (г. Ханой, Вьетнам)  
E-mail: linhvt030899@gmail.com

### Е.А. Калашникова

д.б.н., профессор, зав. кафедрой биотехнологии, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, Россия)  
E-mail: kalash0407@mail.ru

### Р.Н. Киракосян

к.б.н., кафедра биотехнологии, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, Россия)  
E-mail: mia41291@mail.ru

**Актуальность.** Эндوفитные бактерии распространены во внутренних тканях здоровых растений и не оказывают никакого вреда для растения-хозяина. Наоборот, они положительно влияют на рост и развитие растений, а также помогают им поглощать питательные вещества из окружающей среды. Установлено, что эндوفитные бактерии защищают растения от различных фитопатогенов, синтезируя фитогормоны, а также способствуют переводу нерастворимых минеральных солей в доступную для растений форму. Исследования эндوفитных бактерий из *Ipomoea pes-caprae* (L.) во Вьетнаме не многочисленны.

**Цель исследования** – выделить и изучить эндوفитные бактерии из корней *Ipomoea pes-caprae* (L.) и определить перспективные штаммы.

**Материал и методы.** Объектом исследования служили корни *I. pes-caprae*, изолированные с растений, собранных в деревне Тханг Хай, коммуна Тинь Хай, района Тинь Гиа, провинции Тхань Хоа. Перед выделением штаммов эндوفитных бактерий, корневые образцы тщательно промывали дистиллированной водой и стерилизовали раствором сулемы в течение 5 мин. Гомогенат культивировали на питательной среде Лурия–Бертани. Концентрацию индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) из бактериальных штаммов определяли по методике Glückmann и Dessaux (1995). Количественное определение фосфатрастворяющей активности осуществляли в растворе, в котором культивировали исследуемые штаммы.

**Результаты.** Выделено 15 штаммов эндوفитных ИУК-продуцирующих бактерий на питательной среде LB с добавлением L-триптофана, из которых были выбраны три штамма (ТН10R, ТН11Т и ТН13Т) с высокой ИУК-синтезирующей способностью (от 2,53 до 4,19 мкг/мл). Кроме ИУК-синтезирующей способности, в работе оценивалась фосфатрастворяющая активность этих изолятов. Показано, что выделенными изолятами освобождается фосфата в количестве от 1,06 до 3,64 мг/л.

**Выводы.** Штамм ТН10R по способности синтезировать ИУК и фосфатрастворимости превосходил остальные штаммы и был идентифицирован как *Bacillus mycoides* и назван *Bacillus mycoides* ТН10R.

**Ключевые слова:** ипомея двулопастная (*Ipomoea pes-caprae*), сидерофоры, фосфатрастворяющие бактерии, эндوفитные бактерии.

**Для цитирования:** Нгуен Ван Жанг, Нгуен Тхи Тьу, Ву Ть Линь, Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н. Характеристика эндوفитных бактерий, выделенных из корней *Ipomoea pes-caprae* (L.). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(1):28–33. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-01-04>

В настоящее время известно много видов бактерий, которые ассоциируются с растениями и помогают им поглощать питательные вещества из окружающей среды, а также эффективно бороться

с патогенами растений. Взамен они получают витамины и другие необходимые элементы из корневых выделений. Бактерии, которые способны усиливать рост и развитие растений за счет синте-

за необходимых фитогормонов и витаминов, фиксировать молекулярный азот, осуществлять биоконтроль фитопатогенных заболеваний, относят к группе ризобактерии (от англ. plant growth-promoting rhizobacteria/ PGPR). Эндофитные бактерии, вступающие в симбиотические отношения с растениями, занимают значительное место внутри группы PGPR. Эти бактерии распространены во внутренних тканях здоровых растений и не оказывают никакого вреда для растения-хозяина. Наоборот, они положительно влияют на рост и развитие растений. Особенностью эндофитных микроорганизмов является то, что они не оказывают влияние на формирование анатомических структур, например, клубеньков и галлов. Это и отличает их от симбиотических и некоторых патогенных микроорганизмов. Эндофитные бактерии являются перспективными микроорганизмами для создания, например, биопрепаратов пролонгирующего действия против фитопатогенов, так как они способны стимулировать рост растений, улучшать их питание, повышать системную индуцированную устойчивость (ISR), снижать заражение растений патогенами [1].

Ипомея двулопастная (*Ipomoea pes-caprae* (Linn)) – это цветковое растение из рода *Ipomoea*, семейства Convolvulaceae, растет на песчаных или прибрежных берегах. Листья растения очень плотные, сочные, кожистые. Цветы лиловые, довольно устойчивые к ветрам. *I. pes-caprae* является лекарственным растением и широко применяется в народной медицине. Например, сок, выжатый из растения, используют в Малайзии для лечения рыбьих укусов и язвы желудка, листья используют в Индонезии для ускорения заживления фурункулов и ревматизма, а семена, вместе с кожурой, принимают при болях в животе и спазмах. Исследований об эндофитных бактериях, выделенных из *I. pes-caprae*, во Вьетнаме не много. Поэтому выделение и изучение эндофитных бактерий из данного вида ипомеи имеет важное научное и практическое значение.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Объект исследования.** Корни *I. pes-caprae*, изолировали с растений, собранных в деревне Тханг Хай, коммуна Тинь Хай, района Тинь Гиа, провинции Тхань Хоа. Все образцы были взяты со здоровых растений без симптомов болезни. Образцы хранили при 4 °С до момента выделения эндофитных бактерий.

**Методы исследования.** Перед выделением штаммов эндофитных бактерий, корневые образцы тщательно промывали дистиллированной водой с целью удаления поверхностного загрязнения. После промывания, образцы погружали на 5 мин в 70%-ный раствор этанола и на 1 мин – в 0,1%-ный раствор сулемы (хлорида ртути  $HgCl_2$ ), а затем отмывали трижды стерильной дистиллированной водой [2]. Для приготовления исходного раствора брали 5 г корней и гомогенизировали в 50 мл дистиллированной воды. Полученный раствор гомогената методом последовательных серийных разведений высевали в чашки Петри на агаризованную питательную среду Лурия–Бертани (LB). Для контроля качества поверхностной стерилизации корневых образцов, 100 мкл жидкости последней промывки также высевали в чашки Петри на агаризованную питательную среду LB. Опытные и контрольные посеы инкубировали в термостате при температуре 30 °С в течение 48 ч. Если в контрольных чашках Петри не было обнаружено ни одной колонии, то считалось, что в опытных чашках Петри находятся бактерии-эндофиты. Из опытных чашек Петри в процессе штриховки были выделены чистые колонии.

Концентрацию ИУК из бактериальных штаммов определяли по методике Glickmann и Dessaux (1995) [3]. Исследуемые бактериальные штаммы выращивали в жидкой питательной среде LB с добавлением 100 мг/л L-триптофана, на качалке при скорости ее вращения 200 об/мин. После 96 ч инкубации культуральную жидкость центрифугировали в течение 10 мин при температуре 4 °С со скоростью вращения 5500 об/мин. Затем 1 мл супернатанта энергично перемешивали с 4 мл реагента Салковского (150 мл концентрированной  $H_2SO_4$  + 250 мл дистиллированной  $H_2O$  + 7,5 мл 0,5 М  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) и оставляли в стационарном положении на 20 мин при комнатной температуре до измерения показаний на спектрофотометре. Оптическую плотность раствора определяли при длине волны 530 нм. Концентрацию ИУК в каждой пробе (варианте) устанавливали путем сравнения с калибровочной кривой. Калибровочную кривую для определения концентрации ИУК строили на основе содержания данного гормона в стандартных растворах. Концентрация ИУК в этих растворах составляла: 0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 и 80 мг/мл.

Фосфатрастворяющую активность выделенных штаммов выявляли путем учета образования зон просветления вокруг колоний на агаризован-

ной питательной среде, содержащей нерастворимый фосфат  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , по общепринятой методике. Затем осуществляли количественное определение фосфатрастворяющей активности, измеряя накопление фосфата в растворе, в котором культивировали исследуемые штаммы. Отдельные колонии выделенного штамма культивировали в колбах Erlenmeyer, содержащих 100 мл жидкой питательной среды NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium), в состав которой входят (г/л): глюкоза – 10;  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  – 5;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,25;  $\text{KCl}$  – 0,2;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,1; агар 2%; pH среды 7,0. Культивирование проводили при температуре  $28 \pm 2$  °C в течение 72 ч на качалке со скоростью вращения 180 об/мин. Среду без инокулята использовали в качестве контроля. После 72 ч культивирования, осуществляли центрифугирование всей жидкости каждой колбы при 13000 об/мин в течение 10 мин. Полученную жидкость использовали для определения концентрации фосфора в каждой колбе, которую устанавливали по интенсивности окраски его молибденового комплекса при длине волны 690 нм. Концентрацию  $\text{PO}_4^{3-}$  определяли с помощью калибровочной кривой, построенной с использованием раствора дигидрофосфата калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 мг  $\text{PO}_4^{3-}$ /мл. При отсутствии фосфатазной активности окраска не проявлялась [4].

Качественный анализ продукции сидерофоров выполняли с использованием раствора хромазуrolа (Chromazurolo S medium (CAS-medium)). Известно, что при выращивании изучаемых штаммов на питательной среде, содержащей раствор хромазуrolа (CAS-medium), наблюдается появление оранжевых светлых зон вокруг колоний при условии, если данные штаммы синтезируют и выделяют сидерофор (соединение, которое помогает микроорганизмам усваивать железо из внешней среды). Этот эксперимент проводили по методике, описанной Schwyn и Neilands (1987) [5]. Каждый изолят высевали на поверхность агаризованной среды CAS-medium и инкубировали при комнатной температуре в течение 1–3 суток, после чего отмечали появление или отсутствие оранжевых зон вокруг колоний после инкубаций.

Для идентификации наиболее эффективного бактериального штамма (штамм TH10R), было проведено секвенирование нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA с применением праймера 17F(5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG'). ПЦР-

анализ осуществляли в молекулярной лаборатории кафедры молекулярной биологии и прикладной биотехнологии Вьетнамского национального сельскохозяйственного университета. Полученную нуклеотидную последовательность гена 16S rRNA штамма RE3 сравнили с нуклеотидными последовательностями 16S rRNA в GenBank.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После поверхностной стерилизации корневых образцов *I. pes-caprae* и посева их на питательную среду LB, наблюдали образование колоний клеток, различных по морфологии. В результате ряда посевов методом штрихования было выделено 15 штаммов (TH01T, TH02R, TH03T, TH04R, TH05L, TH06T, TH07T, TH08T, TH09R, TH10R, TH11T, TH12T, TH13T, TH14L и TH15T), среди которых были отобраны 3 штамма (TH10R, TH11T и TH13T), в которых определяли концентрацию индол-3-уксусной кислоты (ИУК).

Количество ИУК, продуцируемое исследуемыми штаммами, определяли путем измерения оптической плотности раствора, как описано в разделе «Методы исследований». Чем выше значение оптической плотности, тем выше содержание синтезированной ИУК. Исследования показали, что во всех трех исследуемых штаммах концентрация ИУК, находилась в пределах от 2,53 до 4,19 мкг/мл (рис. 1).



Рис. 1. Концентрация ИУК в исследуемых штаммах бактерий-эндофитов

Полученные данные по концентрации ИУК, продуцируемой бактериальными штаммами, согласуются с результатами, представленными другими исследователями. Например, в работе Bulti Nayak с соавторами (2016) [6] показано, что штамм *Stenotrophomonas maltophilia* strain BN1, выделенный из ризосферы *I. pes-caprae*, продуци-

рует ИУК в пределах от 3 до 5,7 мкг/мл. Авторами сообщается, что бактерии продуцируют ИУК, которая оказывает стимулирующее действие на рост растений, влияет на формирование тканей ксилемы и флоэмы, а также оказывает влияние на рост корней [7, 8]. Нгуен Ван Жанг с соавторами (2020) [2] выделили из корней растений чайного куста (*Camelia sinensis* (L.) Kuntze) некоторые штаммы-эндофиты, характеризующиеся различной ИУК-синтезирующей активностью (от 2,84 мкг/мл до 18,31 мкг/мл). Nath с соавторами (2013) [9] и Tariq с коллегами (2014) [10] сообщили что, бактериальные штаммы, выделенные из сахарного тростника и гороха, синтезировали ИУК 4,8–9,0 мкг/мл и 0,86–16,16 соответственно. Основываясь на результатах наших исследований и экспериментах других авторов по ИУК-синтезирующей активности эндофитов, можно сделать вывод, что концентрация ИУК, продуцированная разными штаммами бактерий, различается, и это зависит от применяемых субстратов.

В следующей серии экспериментов определяли фосфатрастворяющую активность исследуемых штаммов. Исследования показали, что данный показатель изменяется от 1,06 до 3,64 мг/л (рис. 2). Эти результаты согласуются с результатами других исследователей. Например, эндофитные бактерии, выделенные из корней чайного куста (*C. sinensis* (L.) Kuntze), освобождают в культуральную жидкость от 0,71 до 2,74 мг/л  $PO_4^{3-}$  [2]. В работе Vulti Nayak с соавторами (2016) [6] для штамма *S. maltophilia* strain BN1, выделенного из

ризосферы *I. pes-caprae*, показана фосфатрастворяющая способность.

Для доказательства способности выделенных штаммов синтезировать и выделять сидерофор, который помогает микроорганизмам усваивать железо из внешней среды, все изучаемые эндофитные штаммы высевали на агаризованную питательную среду с добавлением хромазуrolа (CAS-medium). После трех суток культивирования наблюдали появление оранжевых зон и просветления вокруг колоний (рис. 3). Причем все три исследуемые штаммы эндофитных бактерий образовывали оранжевые зоны с просветлениями с различной интенсивностью, что свидетельствует о их разной способности синтезировать и выделять сидерофор. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей [2, 6].

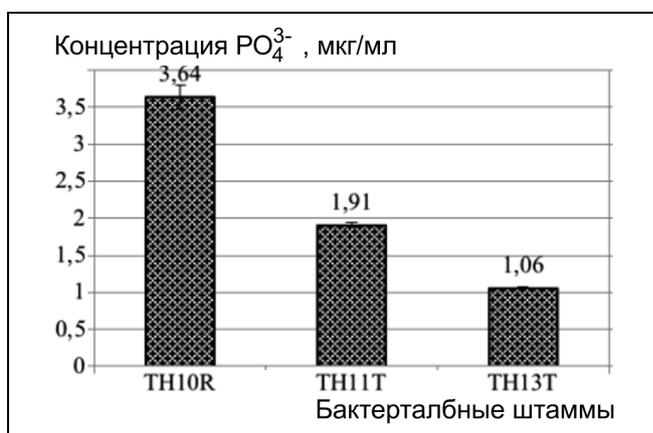


Рис. 2. Фосфатрастворяющая способность исследуемых штаммов эндофитных бактерий

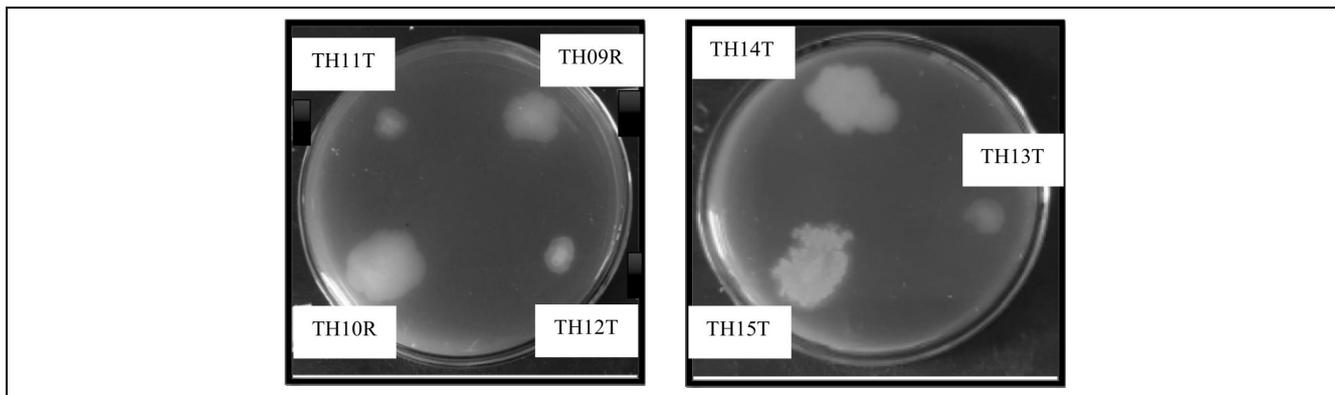


Рис. 3. Сидерофор-продуцирующая способность выделенных штаммов эндофитных бактерий

Таким образом, из всех трех исследуемых штаммов, только штамм TH10R имеет комплексную способность синтезировать ИУК, сидерофор и обладает фосфатрастворяющей способностью. Этот штамм был отправлен в молекулярную лабораторию

кафедры молекулярной биологии и прикладной биотехнологии Вьетнамского национального сельскохозяйственного университета для секвенирования его нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA и последующей видовой идентификации

по этому признаку. После сравнения нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA штамма TH10R с нуклеотидной последовательностью гена 16S rRNA бактерий в генбанке с использованием программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) был получен результат филогенетического анализа, представленный на рис. 4.

Нуклеотидная последовательность гена 16S rRNA штамма TH10R показывает самое близкое положение к штамму *Bacillus mycoides*. На этом основании штамм TH10R был назван *Bacillus mycoides* TH10R.

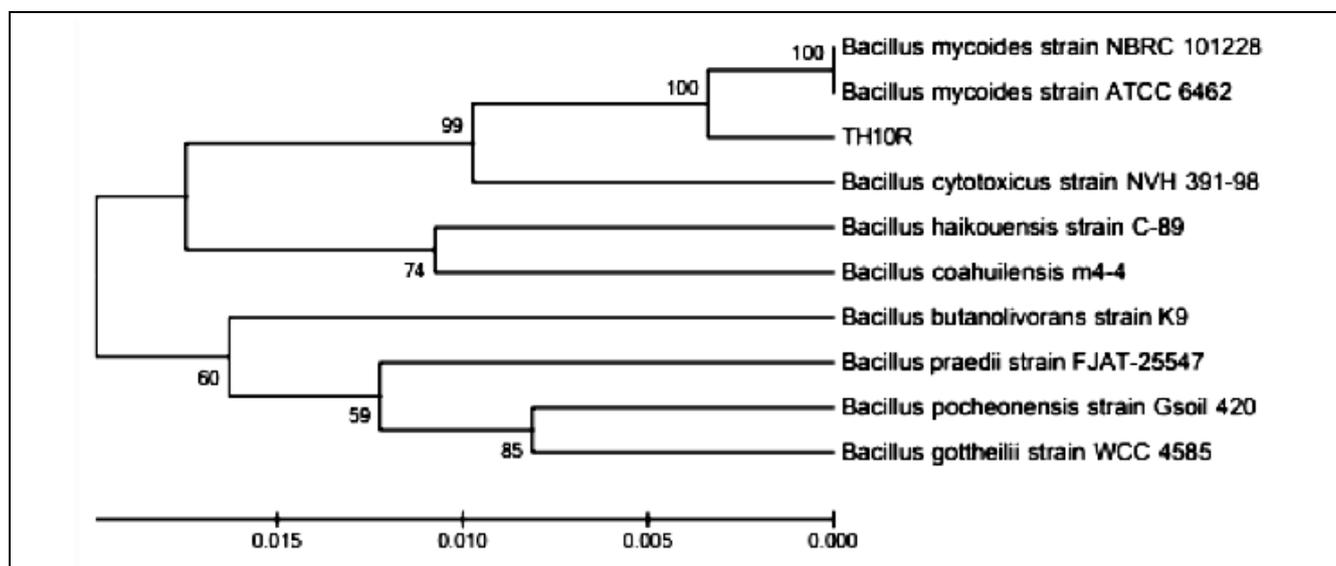


Рис. 4. Филогенетический анализ 16S rRNA штамма TH10R

## ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований установлено, что эндофитные штаммы TH10R, TH11T и TH13T, выделенные из корней *Ipomoea pes-caprae*, способны с высокой эффективностью синтезировать ИУК (2,53 до 4,19 мкг/мл) и обладают фосфатрастворяющей активностью (1,06–3,64 мг/л). Среди трех штаммов был выделен один – TH10R, являющийся наиболее активным по комплексу свойств. Кроме того, нуклеотидная последовательность гена 16S rRNA штамма TH10R показала самое близкое его положение к штамму *Bacillus mycoides*. Поэтому штамм был назван *Bacillus mycoides* TH10R. Этот штамм может применяться в производстве биоудобрения и использоваться в качестве стимулятора роста растений, за счет способности синтезировать высокие концентрации гормона ИУК, контролирующего процессы роста и развития растений в онтогенезе.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Chebotar V.K. Endophytic bacteria in microbial drugs that improve plant development. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2015; 51(3): 271–277.
2. Нгуен Ван Жанг, Ле Динь Туан, Фам Хань Хуен, Пыльнев В.В., Попченко М.И. Выделение эффективных штаммов эндофитных бактерий из корней растений чайного куста (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). *Владимирский сельскохозяйственный журнал*. 2020; 4(94): 40–46. doi: 10.24411/2225-2584-2020-10144 (Nguen Van Zhang, Le Din' Tuan, Fam Han' Huen, Pyln'nev V.V., Popchenko M.I. Vydelenie jeffektivnyh shtammov jendofitnyh bakterij iz kornej rastenij chajnogo kusta (*Samellia sinensis* (L.) Kuntze). *Vladimirskij zeled'elec'*. 2020; 4(94): 40–46. doi: 10.24411/2225-2584-2020-10144).
3. Glickmann E., Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 1995; 61: 793–796.
4. Maiti S.K. Water and waste water analysis. *Handbook of methods in environmental studies*. 2004; 1. Jaipur: ABD Publishers. 321 p.
5. Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 1987; 160(1). P. 47–56.
6. Nayak B., Roy S., Mitra A., Roy M. Isolation of Multiple Drug Resistant and Heavy Metal Resistant *Stenotrophomonas maltophilia* strain BN1, a Plant Growth Promoting Rhizobacteria, from Mangrove Associate *Ipomoea pes-caprae* of Indian Sundarbans. *Journal of pure and applied microbiology*. 2016; 10(4): 3131–3139.
7. Zhao Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol*. 2010; 61: 49–64. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112308.

8. *Shih-Feng Fu, Jyuan-Yu Wei, Hung-Wei Chen, Yen-Yu Liu, Hsueh-Yu Lu, Jui-Yu Chou.* Indole-3-acetic acid: A wide-spread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signaling & Behavior.* 2015; 10: 8. e1048052.
9. *Nath R., Sharma G.D., Barooah M.* Screening of endophytic bacterial isolates of tea (*Camellia sinensis* L.) roots for their multiple plant growth promoting activities. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology.* 2013; 6: 211–215.
10. *Tariq M., Hameed S., Yasmeeen T., Zahid M., Zafar M.* Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). *World journal of microbiology and biotechnology.* 2014; 30: 719–725.

Поступила после доработки 3 декабря 2021 г.

## CHARACTERISTICS OF ENDOPHYTIC BACTERIA, ISOLATED FROM THE ROOTS OF *IPOMOEA PES-CAPRAE* (L.)

© Authors, 2022

### Nguyen Van Giang

Associate Professor, Lecturer of the Microbial Department, Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture (Ha Noi, Viet Nam)  
E-mail: nvgiang@vnua.edu.vn

### Nguyen Thi Thu

Mc.S. of the Microbial Department, Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture (Ha Noi, Viet Nam)  
E-mail: thunguyenntc@gmail.com

### Vu Thi Linh

Mc.S. of the Microbial Department, Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture (Ha Noi, Viet Nam)  
E-mail: linhvt030899@gmail.com

### E.A. Kalashnikova

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Head of Department of Biotechnology, Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazeva (Moscow, Russia)  
E-mail: kalash0407@mail.ru

### R.N. Kirakosyan

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Head of Department of Biotechnology, Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazeva (Moscow, Russia)  
E-mail: mia41291@mail.ru

**Relevance.** Endophytic bacteria live in the internal tissues of healthy plants and do not cause any harm to the host plant. They positively affect plants' growth and development and help them absorb nutrients from the environment. Endophytic bacteria protect plants from various phytopathogens due to the synthesis of phytohormones and contribute to converting insoluble mineral salts into a form accessible to plants. Studies on endophytic bacteria isolated from *I. pes-caprae* in Vietnam are not yet numerous.

**Purpose of the study.** Isolate and characterize endophytic bacteria from the roots of *Ipomoea pes-caprae*. Identify promising strains.

**Material and methods.** The objects of the study were *I. pes-caprae* roots isolated from plants collected in Thang Hai village, Tinh Hai commune, Tinh Gia district, Thanh Hoa province. Before isolating endophytic bacteria strains, root samples were thoroughly washed with distilled water and sterilized with mercuric chloride solution for 5 minutes. The homogenate was cultivated on Luria-Bertani nutrient medium. The IAA concentration from bacterial strains was determined by the method of Glickmann and Dessaux (1995). A quantitative determination of phosphate-dissolving activity was carried out by measuring the phosphate accumulation in the solution in which the strains under study were cultivated.

**Results.** Fifteen strains of endophytic IAA-producing bacteria were isolated on LB nutrient medium supplemented with L-tryptophan. Three (TH10R, TH11T, and TH13T) strains with high IAA synthesizing ability (from 2.53 to 4.19 µg / ml) were selected. The phosphate-dissolving activity of these isolates ranged from 1.06 mg / L to 3.64 mg / L. The TH10R strain was superior to other strains in its ability to synthesize IAA and phosphate solubility and was identified as *Bacillus mycoides* and named *Bacillus mycoides* TH10R.

**Key words:** *Ipomoea pes-caprae*, siderophore, phosphate solubilizing, IAA production.

**For citation:** Nguyen Van Giang, Nguyen Thi Thu, Vu Thi Linh, Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N. Characteristics of endophytic bacteria, isolated from the roots of *Ipomoea pes-caprae* (L.). *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry.* 2022;25(1):28–33. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-01-04>