

Введение Почва – главный резервуар и естественная среда обитания микроорганизмов, принимающих участие в процессах ее формирования и самоочищения, а также в круговороте веществ (азота, углерода, серы, железа) в природе. Помимо неорганических веществ, почва состоит из органических соединений, образующихся в результате гибели и разложения живых существ [1]. Некоторые ризобактерии способны переводить фосфор в доступное для растений состояние путем растворения неорганических фосфатов или минерализации органического фосфора. Фосфат-растворяющие микроорганизмы (Phosphate solubilizing bacteria - PSB) способствуют переводу малодоступных форм фосфора (фитаты, фосфаты кальция) в доступные. PSB привлекли внимание микробиологов и агрономов как биотехнологический инструмент для улучшения роста и урожайности растений [5]. Современная биотехнология ставит задачи, реализация которых требует максимально полезного и эффективного использования объектов. В течение последних лет функциональные наноструктуры привлекают все больший интерес ученых благодаря уникальным свойствам и возможности их широкого применения в различных областях. Применение наноматериалов в сочетании с биологическими макромолекулами позволяет создавать новые методы изучения и разрабатывать новые биологически совместимые материалы с необычными свойствами [2, 3].

Одной из наиболее часто встречающихся форм органического фосфора в почве является фитиновая кислота. Несмотря на то, что растения обладают механизмами для увеличения доступности фосфора почвы, утилизация растениями фосфора из почвенных фитатов незначительна, что связано с низкой фитазной активностью в ризосфере растений. Уникальную роль в разрушении этих соединений в окружающей среде выполняют микроорганизмы [7]. Почвенные микроорганизмы способны модифицировать ресурсы почвы в окружающей среде с помощью ферментов гидролиза. Фитаза – особая группа фосфомоноэстераз, способных гидролизовать фитат на более доступные фосфатсодержащие соединения. Фитаза играет решающую роль в утилизации фитатного фосфора в биосфере. Почвенные бактерии, продуцирующие фитазу, рассматривают как ризобактерии, способствующие росту растений в почвах с высоким содержанием фитата. Фитат является доминирующей формой органического фосфата в почве, гидролиз которого необходим для питания растений [6].

Экспериментальная часть 1. Отбор и скрининг почвенных образцов

Из различных образцов почв Республики Татарстан выделен и идентифицирован штамм почвенных микроорганизмов, обладающих способностью гидролизовать фитат и трифосфат кальция. Из полученных изолятов максимальной активностью из всех выделенных изолятов обладал штамм М2.11, выделенный из почвы Агрокомбината «Майский», г. Казань. Данный штамм был проанализирован и определен как грамположительная бактерия с высокой фитатгидролизующей активностью, на основе гомологии генов 16S рРНК штамм

идентифицирован как представитель рода *Bacillus*. 2. Среда и условия культивирования. Культивирование бактерий проводили на среде LB (%): триптон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; NaCl – 0,5; pH 8.5 [8]. Агаризованная среда LB включала дополнительно 2% агара. Селекцию фитат-гидролизующих штаммов проводили на среде PSM (phytase screening medium) (%): глюкоза – 2, фитат натрия – 0.4, CaCl₂ – 0.2, NH₄NO₃ – 0.5, KCl – 0.05, MgSO₄·7H₂O – 0.05, FeSO₄·7H₂O – 0.001, MnSO₄·H₂O – 0.001, pH 7.0. Агаризованная среда PSM включала дополнительно 3% агара. Для анализа потребления бактериями нерастворимых фосфорных соединений использовали среду NBRIP (%): глюкоза – 10, Ca₃PO₄ – 5, MgCl₂·6H₂O – 5, MgSO₄·7H₂O – 0.25, KCl – 0.2, (NH₄)₂SO₄ – 0.1. Агаризованная среда NBRIP включала дополнительно 2% агара. При анализе способности штамма утилизировать сахара использовали среды Гисса. Среда содержали пептон, индикатор и соответствующий углевод (г/л): глюкозу – 16; лактозу – 20; маннит – 20; мальтозу – 20. Посев культуры проводили «уколом» в пробирки с 5 мл среды. Контроль за ростом культур осуществляли по изменению окраски питательной среды. Соотношение объёма среды к объёму колбы составляло 1:7. Культивирование проводили при 37°C на вибростенде (Multitron, InforsHT) с интенсивностью качания 200 об/мин. Посевным материалом служил 16-часовой инокулят, который разводили до значения оптической плотности – 0.1 (OD₅₉₀). Рост бактерий контролировали по изменению оптической плотности культуры на фотоэлектрокалориметре КФК-2 при λ=590 нм. Количество биомассы выражали в единицах оптической плотности. 3. Определение фитазной активности. Активность штамма определяли по количеству высвободившегося фосфора при гидролизе фосфор содержащих субстратов по методу Грайнера [4]. Реакционная смесь включала 250 мкл 0.1М ацетата натрия pH 5.5, 100 мкл субстрата (10 мМ фитат натрия в 0.1М ацетате натрия pH 5.5) и 10 мкл ферментного раствора. Смесь инкубировали 30 мин при температуре 37°C, реакцию останавливали добавлением 1.5 мл раствора (1 М C₃H₆O, 5 Н Н₂SO₄, 10 мМ (NH₄)₂MoO₄). Далее в смесь добавляли 100 мкл 1 М лимонной кислоты и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре SmartSpecPlus (BioRad, USA) опытной пробы и контрольной пробы при 355 нм в 1 см кювете. В контрольную пробу, содержащую 250 мкл 0.1 М ацетата натрия и 100 мкл субстрата, вносили 10 мкл фермента после инкубации при 37°C. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мМ субстрата за 1 мин. Удельную активность выражали в ед/мг белка. 4. Иммобилизация наноматериалов на поверхности клеток. В работе использовали наноструктуры, обладающие магнитными свойствами. Иммобилизация клеток *Bacillus* sp. M2.11 включала несколько этапов. Брали 1.2 мл 18-ти часовой культуральной жидкости бацилл, центрифугировали и промывали три раза водой, затем ресуспендировали в 200 мл стерильной воды. В суспензию добавляли 1 мл заранее приготовленного раствора наночастиц и встряхивали в течение 15 мин.

Затем клетки, покрытые магнитными наночастицами, отделяли от несвязанных с наночастицами клеток с помощью магнита. Отделенный раствор клеток с магнитными частицами промывали три раза водой. Намагниченные бактериальные клетки ресуспендировали в 0.85% растворе хлорида натрия и использовали в дальнейших экспериментах. Характеристику намагниченных клеток бактерий определяли с использованием микроскопии. Жизнеспособность модифицированных клеток относительно контроля определяли электронной микроскопией, измерением разложения фосфата в твердой и жидкой среде NBRIP, содержащую в качестве источника фосфора $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, и определением концентрации разложившегося фосфора. Намагниченные и нативные клетки высевали на среды Гисса, LA для подсчета КОЕ и описания колоний.

5. Математическая обработка результатов Для статистического анализа экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel, путём расчёта среднеквадратичного отклонения (σ). Результаты считали достоверными при $\sigma \leq 10\%$. При расчёте достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0.05$ за достоверный уровень значимости. Результаты и обсуждение Из образцов почв методом посева на селективную питательную среду PSM и NBRIPнами выделены микроорганизмы, гидролизующие фитат и трифосфат кальция. Среда PSM содержит нерастворимый фитат кальция в качестве единственного источника фосфора, следовательно, микроорганизмы, способные расти на ней, обладают способностью гидролизовать фитат. Питательная среда NBRIPв качестве единственного и трудно разлагаемого субстрата содержит фосфат кальция. Проводили магнетизацию клеток *Bacillus* sp. M2.11 (рис. 1), способных расти на вышеперечисленных средах, клетки подвергали намагничиванию на 72 час роста. Подсчет клеток в камере Горяева выявил наличие $2,240 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Сравнивали морфологические признаки колоний нативных и обработанных наночастицами штаммов (рис. 2). Результаты приведены в табл. 1. Установили, что наночастицы не меняют структуры колонии штамма, но влияют на цвет колонии и ее размер.

Рис. 1 – Клетки *Bacillus* sp. M2.11, покрытые магнитными наночастицами

Таблица 1 - Описание колоний нативного и намагниченного штаммов

Описание	Нативная колония	Колония с наночастицами
Диаметр	7.3 мм	8.3 мм
Форма колонии	Неправильная	Неправильная
Поверхность	Шероховатая	Шероховатая
Профиль	Плоский	Плоский
Блеск	Блеск	Блеск
прозрачность	Лучистая по краям	Лучистая по краям
Цвет	Бесцветная (белесые края)	Бесцветная (центр темнее)
Размер	Крупная	Крупная
Край колонии	Лопастной	Лопастной
Структура	Однородная, крупнозернистая	Однородная, крупнозернистая
Консистенция	Легко снимается с агара, плотная, кашеобразная	Легко снимается с агара, плотная, кашеобразная
Разведение в 105	128 клеток	112 клеток
Разведение в 107	20 клеток	15 клеток

Вероятно, это связано с тем, что сами наночастицы имели тёмно-коричневый окрас и, покрывая клетки по поверхности,

как результат изменяли цвет клеточной популяции. Изучали рост штамма на среде с трифосфатом кальция. После замера на ФЭКе было обнаружено 1.9 опт.ед. На рисунке 3 видно, что при намагничивании клетки бактерий не теряют своего свойства расщеплять труднорастворимые соединения, такие как $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. В качестве контроля использовали штамм, не способный к расщеплению труднорастворимых соединений *Bacillus* sp.A1. Для того, чтобы определить влияние наночастиц на функции клеток, провели посев намагниченных и нативных клеток на среды Гисса. Установлено, что наличие наночастиц не оказывало влияния на способность бациллярных клеток расщеплять углеводы. 1 2 3 Рис. 2 – Разложение фосфата кальция намагниченными и нативными клетками *Bacillus* sp. M2.11; 1 – контрольный штамм *Bacillus* sp.A1, 2 – *Bacillus* sp.M2.11, 3 – клетки *Bacillus* sp.M2.11 обработанные наночастицами. Проводили эксперимент на способность разложения клетками без наночастиц и обработанными магнитными наночастицами труднодоступных субстратов и высвобождение фосфата в окружающую среду. Показано (рисунок 3), что наличие наночастиц не влияет на свойства клеток бацилл расщеплять трудноразлагаемые соединения почвы, такие как $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Рис. 3 – Высвобождение фосфатов на разные часы роста клетками бацилл: намагниченными и нативными. Таким образом, в результате исследования с использованием магнитизированных наночастиц установлено, что наноматериалы не оказывали влияния на профиль роста, основные свойства клеток бацилл и способность расщеплять труднодоступные соединения, но влияли на морфологию колоний и клеток, изменяя их цвет. Функциональные наноструктуры привлекают все больший интерес ученых, среди них магнитные наночастицы рассматриваются как перспективные модификаторы поверхностных структур клеток. Установлено, что наночастицы не оказывают влияния на жизнеспособность и фитат-гидролизующую функцию клеток бацилл. Этот результат может быть положительным критерием в случае использования штамма *Bacillus* sp. M2.11 в качестве биотехнологического объекта. Изолят не проявлял токсических свойств относительно клеток листьев табака и стимулировал рост и развитие картофеля. Изучение способностей иммобилизованного штамма позволит определить спектр областей его практического использования. В связи с этим, исследование нативного и иммобилизованного штамма *Bacillus* sp. M2.11 представляет высокий научный интерес.