

## ИНДИКАЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ У БАКТЕРИЙ ВИДА *BACILLUS MEGATERIUM*

**Сулдына Екатерина Владимировна**, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Мастиленко Андрей Владимирович**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Феоктистова Наталья Александровна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Богданов Ильгизар Исмаилович**, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел. 8(8422) 49-55-63;

Email: e.suldina2006@yandex.ru

**Ключевые слова:** *Bacillus megaterium*, полимеразно-цепная реакция, фитаза, нитрогеназа, щелочная фосфатаза, гены, ПЦР.

Микробный компонент почвы играет решающую роль в поддержании функциональности почвы, выполняя несколько незаменимых функций, таких как формирование почвы, разложение мертвых и разложившихся органических веществ, круговорот макро- и микроэлементов и преобразование токсичных химикатов в нетоксичные формы.

**Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Ульяновской области в рамках научного проекта № 19-416-730004**

### Введение

Микробный компонент почвы играет решающую роль в поддержании функциональности почвы, выполняя несколько незаменимых функций, таких как формирование почвы, разложение мертвых и разложившихся органических веществ, круговорот макро- и микроэлементов и преобразование токсичных химикатов в нетоксичные формы [1]. Свободноживущие сапрофитные бактерии, приносящие пользу для сельскохозяйственных культур, вместе называются ризобактериями (PGPR) и состоят из различных родов: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter* и др [2]. Некоторые виды рода *Bacillus*, такие как *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. azotofixans*, и т. д. относят к ризобактериям [3-4]. Различные прямые и косвенные механизмы стимулирования роста растений с помощью бактерий рода *Bacillus* включают азотфиксацию, солюбилизацию, минерализацию фосфора и других питательных веществ, производство фитогормонов, сидерофоров, антимикробных соединений и гидролитических ферментов, индуцированную системную резистентность и устойчивость к абиотическим стрессам [3].

Способность фиксировать атмосферный

азот принадлежит доменам *Eubacteria* и *Archaea*. Известно, что различные виды *Bacillus*, включая *B. megaterium*, фиксируют атмосферный азот [5-6]. Для обеспечения азотфиксации и анализа разнообразия диазотрофов наиболее широко используемым генным маркером является *nifH*, отвечающий за синтез белков нитрогеназного комплекса [6].

Фосфор является вторым по важности питательным веществом после азота, ограничивающим рост и урожай сельскохозяйственных культур. Растения могут поглощать фосфор в формах  $\text{HPO}_4^{2-}$  и  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  [7], но большая часть фосфора, присутствующего в почве, недоступна для растений. Многие почвенные микроорганизмы наделены способностью солюбилизировать недоступную форму фосфора до доступной формы и / или минерализовать органический фосфор до доступной формы фосфора [8], и все вместе они называются микроорганизмами, солюбилизующими фосфор (PSM). Некоторые виды *Bacillus*, такие как *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. coagulans*, *B. subtilis* и др. были описаны как солюбилизаторы фосфора [9-11]. Фосфатазы и фитазы - это две группы ферментов, которые катализируют превращение органических фосфатов в неорганические фосфаты. Показано, что *Bacillus megaterium* про-

являют кислотную и щелочную фосфатазную активность [12] и продуцируют фитазы [13].

Калий является третьим по важности питательным веществом для растений после азота и фосфора и играет важную роль в росте и развитии растений [14]. Неоднократно сообщалось о различных видах бактерий рода *Bacillus*, способных к солюбилизации калия, включая *B. velezensis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. megaterium* и др. [15]. Кроме того, доподлинно установлено, что KSB при совместной инокуляции с N-фиксаторами и P-солюбилизаторами могут усиливать эффект N-фиксаторов и P-солюбилизаторов [16-18].

В связи с этим целью данной работы – определить наличие генов, отвечающих за синтез ферментов фитазы, нитрогеназы и щелочной фосфатазы у штаммов ранее выделенных бактерий вида *Bacillus megaterium* методом ПЦР-РВ.

#### Материалы и методы исследований

Штаммы бактерий: в работе были использованы 16 штаммов бактерии вида *Bacillus megaterium*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновского ГАУ.

Культуры бактерий обладали типичными для данного вида культуральными, морфологическими и биохимическими свойствами [19].

Питательные среды и реактивы: 2,5x реакционная смесь в присутствии красителя EVA GREEN (Синтол, Россия), набор реагентов «ПРОБА-РАПИД» для выделения ДНК (ДНК-технологии, Россия).

Лабораторная посуда и оборудование: центрифуга Микроспин FV-2400 (BioSan, Латвия), центрифуга Eppendorf 5804, Центрифуга/вортекс для пробирок (BioSan, Польша), ламинарный бокс БМБ-II-«Ламинар-С»-1 2 (ЛамСистем, Россия), Твердотельный термостат TDB-120 (BioSan, Польша), центрифуга-встряхиватель медицинская серии CM-50M (ELMI, Польша), амплификатор детектирующий «ДТ прайм» (ДНК-технология, Россия).

#### Результаты исследований

Для определения наличия генов, кодирующих синтез ферментов фитазы, нитрогеназы и щелочной фосфатазы у *Bacillus megaterium*, проведен анализ *in-silico* аннотированных геномов данного вида бактерии, представленных в информационной базе данных NCBI, в результате чего были установлены гены, кодирующие синтез эти ферментов.

Далее был произведен подбор праймеров для скрининга целевых участков. В резуль-

тате нами были использованы следующие пары праймеров:

для детекции участка отвечающего за синтез фосфатазы

прямой (f) 5'-3' AGGAAGCAAAGGAACGCAAG;

обратный (r) 3'-5' CACATCACCTTGGCCTTCAG;

для нитрогеназы

прямой (f) TGCGAGTATGTCAGGCAACACAG;

обратный (r) 3'-5'

CAGCTCTCCATCTCCCCACGTA;

для фитазы

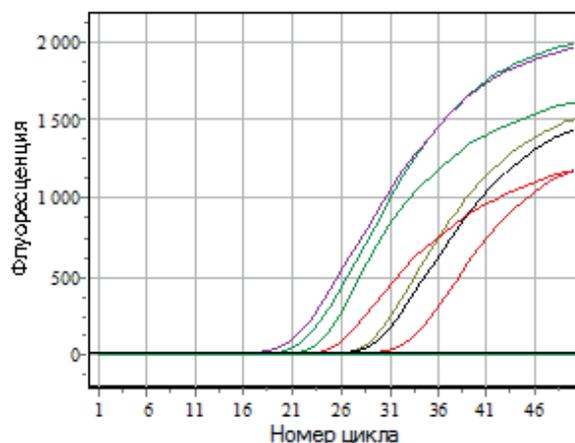
прямой (f) 5'-3' GACCCGGTTGCTTCAGGAGA

обратный (r) 3'-5'

GCAGCGGCAATGTCAATCTG.

**Таблица 1**  
**Результаты амплификации праймерной системы для детекции гена кодирующего фитазу бактерии *B. megaterium***

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ct, Fam	Результат
A1	Vm-1		-
A2	Vm-2	29,6	+
A3	Vm-3	23,0	+
A4	Vm-4		-
A5	Vm-5	21,1	+
A6	Vm-6		-
A7	Vm-7		-
A8	Vm-8		-
A9	Vm-9	26,0	+
A10	Vm-10		-
A11	Vm-11	17,3	+
A12	Vm-12	26,4	+
B1	Vm-13		-
B2	Vm-14	19,1	+
B3	Vm-15		-
B4	Vm-16		-



**Рис. 2 - Результаты амплификации праймерной системы для детекции гена кодирующего фитазу бактерии *B. megaterium***

Таблица 2

Результаты амплификации праймерной системы для детекции гена кодирующего нитрогеназу бактерии *B. megaterium*

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Результат
A1	Vm-1		-
A2	Vm-2	40,9	+
A3	Vm-3	30,4	+
A4	Vm-4		-
A5	Vm-5	41,6	+
A6	Vm-6		-
A7	Vm-7		-
A8	Vm-8		-
A9	Vm-9	23,2	+
A10	Vm-10		-
A11	Vm-11	23,5	+
A12	Vm-12	31,9	+
B1	Vm-13		-
B2	Vm-14	29,1	+
B3	Vm-15		-
B4	Vm-16		-

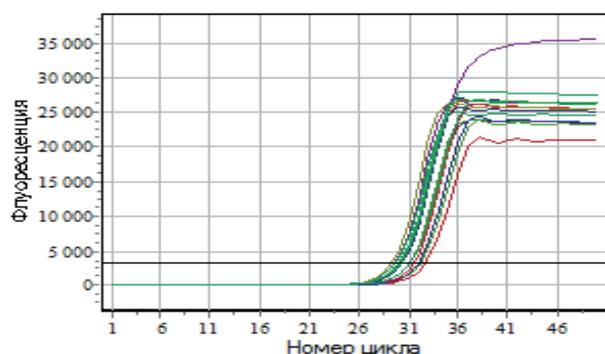


Рис. 3 - Результаты амплификации праймерной системы для детекции гена кодирующего нитрогеназу бактерии *B. megaterium*

Таблица 3

Результаты амплификации праймерной системы для детекции гена кодирующего фосфатазу бактерии *B. megaterium*

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Результат
A1	Vm-1		-
A2	Vm-2	37,5	+
A3	Vm-3	33,9	+
A4	Vm-4		-
A5	Vm-5	21,8	+
A6	Vm-6		-
A7	Vm-7		-
A8	Vm-8		-
A9	Vm-9	24,2	+
A10	Vm-10		-
A11	Vm-11	21,7	+
A12	Vm-12	38,9	+
B1	Vm-13		-
B2	Vm-14	33,2	+
B3	Vm-15		-
B4	Vm-16		-

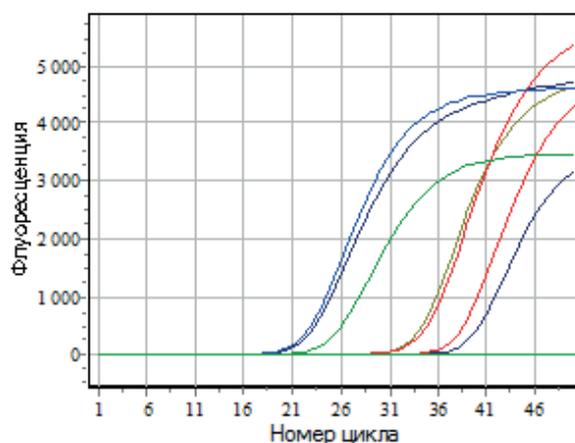


Рис. 4 - Результаты амплификации праймерной системы для детекции гена кодирующего фосфатазу бактерии *B. megaterium*

Амплификацию проводили по протоколу:

1. Предварительная денатурация -95°C в течении 5 минут, 1 цикл.
2. Денатурация - 95°C в течение 10 сек, Отжиг- 59 °C в течении 40 сек, Элонгация 72°C на 10 сек, 30 циклов.

Для проведения реакции ПЦР использовали 2,5x реакционную смесь в присутствии красителя EVA GREEN (Синтол, Россия). Детекцию результата амплификации проводили при помощи канала FAM. Результаты представлены в таблицах 1-3 и на рисунках 2-4.

По результатам проведенного исследования у 7 из 16 выделенных штаммов *B. megaterium* присутствовали все три искомые участка ДНК, отвечающие за синтез ферментов фитазы, нитрогеназы и щелочной фосфатазы.

#### Обсуждение

Бактерии рода *Bacillus* являются одними из преобладающих культивируемых почвенных бактерий на большинстве почв и хорошо известны своей способностью оказывать широкий спектр полезных эффектов на растения. Из-за своего генетического и метаболического разнообразия *Bacillus* spp. хорошо адаптированы к широкому спектру условий окружающей среды. Такая феноменальная приспособляемость к окружающей среде и множество полезных свойств делают бациллы подходящими кандидатами для их применения в качестве компонентов биоудобрения. Ряд коммерческих препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* демонстрируют различные действия по мобилизации питательных веществ и производству фитогормонов, но их применимость с точки зрения сельскохозяйственных культур и географических

регионов очень ограничена. Необходимо сосредоточить внимание на полевом применении потенциально-перспективных штаммов бацилл, которые могут применяться на различных культурах в широком диапазоне агроклиматических условий. Представители рода *Bacillus* обладают огромным потенциалом для агробиотехнологического применения благодаря своим разнообразным функциональным характеристикам. Однако сферу практического применения необходимо расширять за счет более целенаправленных исследований и испытаний в лабораторных и полевых условиях [20].

#### **Заключение**

По результатам проведенного исследования у 7 из 16 выделенных штаммов *B. megaterium* присутствовали все три искомые участка ДНК, отвечающие за синтез ферментов фитазы, нитрогеназы и щелочной фосфатазы.

В результате проведенных экспериментов были определены кандидатные бактериальные штаммы *Bacillus megaterium* для разработки биокомпозиции для повышения коэффициента усвоения минеральных компонентов удобрений.

#### **Библиографический список**

1. Modern soil microbiology / Van Elsas, Jan Dirk [et al.] // CRC press. -2006. – P. 672.
2. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013) / Y. Bashan [et al.] // Plant and soil. – 2014. – Т. 378, № 1. – P. 1-33.
3. Goswami, D. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review / D. Goswami, J. N. Thakker, P. C. Dhandhukia // Cogent Food & Agriculture. – 2016. – Т. 2, № 1. – P. 1-19.
4. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol / B. Fan [et al.] // Frontiers in microbiology. – 2018. – Т. 9. – P. 2491.
5. Spatial distribution of bacterial communities driven by multiple environmental factors in a beach wetland of the largest freshwater lake in China / X. Ding [et al.] // Frontiers in microbiology. – 2015. – Т. 6. – P. 129.
6. Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions / J. Yousuf [et al.] // Journal of basic microbiology. – 2017. – Т. 57, № 11. – P. 922-932.
7. Saeid, A. Phosphorus solubilization by *Bacillus* species / A. Saeid, E. Prochownik, J. Dobrowolska-Iwanek // Molecules. – 2018. – Т. 23, № 11. – P. 2897.
8. Bhattacharyya, P. N. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture / P. N. Bhattacharyya, D. K. Jha // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2012. – Т. 28, № 4. – P. 1327-1350.
9. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils / S. B. Sharma [et al.] // SpringerPlus. – 2013. – Т. 2, № 1. – P. 1-14.
10. Study on P solubilizing efficiencies of native PSB isolates from acid soils of Odisha / M. Pradhan [et al.] // J Pharma Phyto. - 2018. – Т. 7. - P. 1557-1566.
11. Panda, B. Phosphate solubilizing bacteria from the acidic soils of Eastern Himalayan region and their antagonistic effect on fungal pathogens / B. Panda, H. Rahman, J. Panda // Rhizosphere. - 2016. – Т. 2. - P.62-71.
12. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria exhibiting the potential for growth promotion and phosphorus nutrition improvement in maize (*Zea mays* L.) in calcareous soils of Sinaloa, Mexico / A. Ibarra-Galeana, Jesús [et al.] // Annals of Microbiology. – 2017. - Т. 67, № 12. - P. 801-811.
13. Gene cloning and characterization of a thermostable phytase from *Bacillus subtilis* US417 and assessment of its potential as a feed additive in comparison with a commercial enzyme / A. Farhat [et al.] // Molecular biotechnology. – 2008. - Т. 40, № 2. - P. 127.
14. Can we use maize (*Zea mays*) rhizobacteria as plant growth promoter / N. P. Singh [et al.] // Vegetos. – 2015. – Т. 28, № 1. – P. 86-99.
15. Assessment of genetic diversity and plant growth promoting attributes of psychrotolerant bacteria allied with wheat (*Triticum aestivum*) from the northern hills zone of India / P. Verma [et al.] // Annals of microbiology. – 2015. – Т. 65, № 4. – P. 1885-1899.
16. Basak, B. B. Co-inoculation of potassium solubilizing and nitrogen fixing bacteria on solubilization of waste mica and their effect on growth promotion and nutrient acquisition by a forage crop / B. B. Basak, D. R. Biswas // Biology and Fertility of Soils. – 2010. – Т. 46, № 6. - P. 641-648.
17. Han, H. S. Phosphate and potassium solubilizing bacteria effect on mineral uptake, soil availability and growth of eggplant / H. S. Han, K. D. Lee // Res J Agric Biol Sci. – 2005. – Т. 1, № 2. – P. 176-180.
18. Moritsuka, N. Possible processes releasing nonexchangeable potassium from the rhizosphere of maize / N. Moritsuka, J. Yanai, T. Kosaki // Plant and Soil. – 2004. – Т. 258, № 1. – С. 261-268.
19. Сульдина, Е. В. Выделение новых штам-

мов бактерий *Bacillus megaterium* и изучение их биологических свойств / Е. В. Сульдина, Н. А. Феоктистова, И. И. Богданов // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. – № 3. – С. 60-67.

20. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition / A. K. Saxena [et al.] // Journal of applied microbiology. – 2020. – Т. 128, № 6. – P. 1583-1594.

#### INDICATION OF ENZYME GENE FRAGMENTS OF *BACILLUS MEGATERIUM* BACTERIA

**Suldina E. V., Masilenko A. V., Feoktistova N. A. Bogdanov I. I.**  
FSBEI HE Ulyanovsk SAU  
432017, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1; Tel. 8 (8422) 49-55-63;  
Email: e.suldina2006@yandex.ru

**Key words:** *Bacillus megaterium*, polymerase chain reaction, phytase, nitrogenase, alkaline phosphatase, genes, PCR.

The soil microbial component plays a critical role in maintaining the soil functionality, performing several vital functions such as soil formation, decomposition of dead and decayed organic matter, circulation of macro and micro elements and transformation of toxic chemicals into non-toxic forms.

Various *Bacillus* species, including *B. megaterium*, are known to fix atmospheric nitrogen. To ensure nitrogen fixation and diversity analysis of diazotrophs, the most widely used gene marker is *nifH*, which is responsible for synthesis of proteins of the nitrogenase complex.

Various soil microorganisms, including *B. megaterium*, are endowed with the ability to solubilize phosphorus inaccessible form to accessible one and / or mineralize organic phosphorus to accessible phosphorus form. Phosphatases and phytases are two groups of enzymes that catalyze transformation of organic phosphates to inorganic ones. It was found that *Bacillus megaterium* exhibits acidic and alkaline phosphatase activity and produces phytases.

The aim of this work was to determine by RT-PCR method the presence of genes responsible for enzyme synthesis of phytase, nitrogenase, and alkaline phosphatase in strains of previously isolated bacteria of *Bacillus megaterium* species.

To specify the presence of genes encoding synthesis of the desired enzymes in *Bacillus megaterium*, an *in-silico* analysis of the annotated genomes of this bacterial species, presented in the NCBI information database, was carried out. Further on, the selection of primers for screening the target parts was made.

According to the results of the study, 7 out of 16 isolated *B. megaterium* strains contained all three required DNA parts responsible for synthesis of phytase, nitrogenase, and alkaline phosphatase enzymes.

#### Bibliography:

1. Van Elsas, Jan Dirk, et al. *Modern soil microbiology*. CRC press, 2006. - P 672
2. Bashan Y. et al. *Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013)* // *Plant and soil*. - 2014. - V. 378. - No. 1. - P. 1-33.
3. Goswami D., Thakker J. N., Dhandhukia P. C. *Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review* // *Cogent Food & Agriculture*. - 2016. - V. 2. - No. 1. - P. 1-19.
4. Fan B. et al. *Bacillus velezensis FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol* // *Frontiers in microbiology*. - 2018. -- V. 9. - P. 2491.
5. Ding X. et al. *Spatial distribution of bacterial communities driven by multiple environmental factors in a beach wetland of the largest freshwater lake in China* // *Frontiers in microbiology*. - 2015. - V. 6. - P. 129.
6. Yousuf J. et al. *Nitrogen fixing potential of various heterotrophic Bacillus strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions* // *Journal of basic microbiology*. - 2017. - V. 57. - No. 11. - P. 922-932.
7. Saaid A., Prochownik E., Dobrowolska-Iwanek J. *Phosphorus solubilization by Bacillus species* // *Molecules*. - 2018. - V. 23. - No. 11. - P. 2897.
8. Bhattacharyya P. N., Jha D. K. *Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture* // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. - 2012. - V. 28. - No. 4. - P. 1327-1350.
9. Sharma S. B. et al. *Phosphate solubilizing microbes: a sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils* // *SpringerPlus*. - 2013. - V. 2. - No. 1. - P. 1-14.
10. Pradhan, M. et al. *Study on P solubilizing efficiencies of native PSB isolates from acid soils of Odisha* // *J Pharma Phyto*. - 2018. - V.7. - P.1557-1566.
11. Panda, B., Rahman, H., Panda, J. *Phosphate solubilizing bacteria from the acidic soils of Eastern Himalayan region and their antagonistic effect on fungal pathogens* // *Rhizosphere*. - 2016. - V.2. - P.62-71.
12. Ibarra-Galeana, Jesús A., et al. *Characterization of phosphate-solubilizing bacteria exhibiting the potential for growth promotion and phosphorus nutrition improvement in maize (*Zea mays* L.) in calcareous soils of Sinaloa, Mexico* // *Annals of Microbiology*. - 2017. - V.67. - No. 12. - P. 801-811.
13. Farhat, A. et al. *Gene cloning and characterization of a thermostable phytase from Bacillus subtilis US417 and assessment of its potential as a feed additive in comparison with a commercial enzyme* // *Molecular biotechnology*. - 2008. - V.40. - No. 2. - P.127.
14. Singh, N. P., et al. *Can we use maize (*Zea mays*) rhizobacteria as plant growth promoter* // *Vegetos*. - 2015. - V.28. - №1. - P. 86-99.
15. Verma, P. et al. *Assessment of genetic diversity and plant growth promoting attributes of psychrotolerant bacteria allied with wheat (*Triticum aestivum*) from the northern hills zone of India* // *Annals of microbiology*. - 2015. - V. 65. - No. 4. - P. 1885-1899.
16. Basak, B.B., Biswas, D.R. *Co-inoculation of potassium solubilizing and nitrogen fixing bacteria on solubilization of waste mica and their effect on growth promotion and nutrient acquisition by a forage crop* // *Biology and Fertility of Soils*. - 2010. - V.46. - No. 6. - P.641-648.
17. Han H. S., Lee K. D. *Phosphate and potassium solubilizing bacteria effect on mineral uptake, soil availability and growth of eggplant* // *Res J Agric Biol Sci*. - 2005. - V. 1. - no. 2. - P. 176-180.
18. Moritsuka N., Yanai J., Kosaki T. *Possible processes releasing nonexchangeable potassium from the rhizosphere of maize* // *Plant and Soil*. - 2004. - V. 258. - No. 1. - P. 261-268.
19. Suldina E.V., Feoktistova N.A., Bogdanov I.I. *Isolation of new strains of Bacillus megaterium bacteria and study of their biological properties* // *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. - 2020. - No. 3. - P. 60-67.
20. Saxena A. K. et al. *Bacillus species in soil as a natural resource for plant health and nutrition* // *Journal of applied microbiology*. - 2020. - V. 128. - No. 6. - P. 1583-1594.