

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ-КОСМОПОЛИТОВ

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC LESIONS FROM TISSUES OF COSMOPOLITAN PLANTS

Zu. Bisultanova
Za. Bisultanova
L. Dodnaeva
P. Dzhambetova

Summary. Target. Isolation and identification of endophytic activities from the cosmopolitan medicinal plants Chicory, Dandelion officinalis, Plantain and Chamomile, growing in the mountainous zone of the Chechen Republic.

Methods. For identification, standard methods of isolation from different parts of plants are used using a semi-automatic bacteriological analyzer AutoScan 4 (Siemens, Germany).

Results. Isolates from chicory flowers and dandelion leaves are gram(+) bacteria, mainly *Staphylococcus sciuri*. Isolates from leaves and flowers of chamomile, from stems of chicory, plantain and dandelion are represented by gram(-) bacteria of the genera *Pantoea* and *Enterobacter*. *Pantoea agglomerans* was most often sown. *En* was isolated in the stems of chicory and plantain. *agglomerans*, while in the stems of *Cichorium intybus*, the species was identified in English. *carcinogenic*. *En.r cloacae* and *P. agglomerans* were found in daisy leaves. The greatest diversity of endophytes was observed in *plantago major* stem isolates (five species). Of the unique species, it is worth noting *Cedecea neteri*, found in the leaves of *Matricaria chamomilla*, a rare human pathogen that can harbor bacteremia.

Keywords: endophytic microorganisms, cosmopolitan plants, endophytes, isolates.

Бисултанова Зура Исановна

Старший преподаватель, Чеченский государственный университет им. А.А. Кадырова, г. Грозный
Zura_sun@mail.ru

Бисултанова Зарина Руслановна

Лаборант-исследователь, Чеченский государственный университет им. А.А. Кадырова, г. Грозный
bis-zarina@yandex.ru

Доднаева Лайла Рамзановна

Лаборант-исследователь, Чеченский государственный университет им. А.А. Кадырова, г. Грозный
dodnaeva.leila@mail.ru

Джамбетова Петимат Махмудовна

Док-р биол. наук, профессор,
Комплексный НИИ им. Х.И. Ибрагимова РАН, г. Грозный
Petimat-Ig@rambler.ru

Аннотация. Цель. Выделение и идентификация эндофитных микроорганизмов из лекарственных растений космополитов Цикория обыкновенного, Одуванчика лекарственного, Подорожника большого и Ромашки аптечной, произрастающих в горной зоне Чеченской Республики.

Методы. Стандартными методами выделяли изоляты из разных частей растений для последующей идентификации с помощью полуавтоматического бактериологического анализатора AutoScan 4 (Siemens, Германия).

Результаты. Изоляты из цветков цикория и из листьев одуванчика были представлены Грам(+) бактериями, в основном *Staphylococcus sciuri*. Изоляты из листьев и цветков ромашки, из стеблей цикория, подорожника и одуванчика представлены Грам(-) бактериями родов *Pantoea* и *Enterobacter*. Чаще всего высевалась *Pantoea agglomerans*. В стеблях цикория и подорожника выделен *En. agglomerans*, в то время как в стеблях *Cichorium intybus* доминирующим видом был определен *En. cancerogenus*. В листьях ромашки были обнаружены *En.r cloacae* и *P. agglomerans*. Наибольшее разнообразие эндофитов обнаружено в изолятах стеблей *Plantago major* (пять видов). Из уникальных видов стоит отметить *Cedecea neteri*, обнаруженный в листьях *Matricaria chamomilla*, редкий патоген человека, который может вызывать бактериемию.

Ключевые слова: эндофитные микроорганизмы, растения космополиты, эндофиты, изоляты.

Введение

Растения являются хозяевами сложных сообществ эндофитных бактерий, которые колонизируют внутреннюю часть как подземных, так и надземных тканей и которые могут обеспечивать многочисленные преимущества для растений-хозяев, адаптируя их к естественной среде обитания [3]. У микроорганизмов, в свою очередь, сформировались особые механизмы адаптации к растениям как к специфической экологической нише. [1, 10]. Доказано, что почти все растения содержат

в себе эндофиты. К настоящему времени только около 1–2 % от всего спектра из 300 000 известных растений изучены на предмет их эндофитного состава [19]. Микроорганизмы — эндофиты способствуют росту растений-хозяев. По данным ряда исследователей полезные эффекты эндофитных микроорганизмов оказываются сильнее, чем у многих ризосферных бактерий, особенно в стрессовых условиях. О благоприятном влиянии эндофитных бактерий на рост и развитие растений, в частности пшеницы, риса, рапса, картофеля, томатов и др. сельскохозяйственных культур сообщалось в многочис-

ленных исследованиях [14, 16]. Эндوفитная популяция в значительной степени зависит от климатических условий и места произрастания растения-хозяина.

Чеченская Республика (ЧР) характеризуется своеобразием природных ландшафтов и природных условий, что способствует формированию здесь особого почвенно-растительного покрова с богатым видовым разнообразием [2]. Однако растения ЧР практически не изучены на предмет эндوفитных микроорганизмов.

Целью настоящего исследования является выделение эндوفитных микроорганизмов из растений космополитов Чеченской Республики.

Колонии бактерий дифференцировали на грамположительные и грамотрицательные стандартными методами для последующей идентификации с помощью полупавтоматического бактериологического анализатора AutoScan 4 (Siemens, Германия).

Результаты исследования

Результаты проведенного исследования представлены в таблице 1. В данном исследовании изучались только те изоляты, которые показали рост в условиях *in vitro*. Все найденные морфологически различные изоляты были отобраны для идентификации. Было определены эндифиты, отнесенные к 17 морфологическим видам (табл. 1).

Таблица 1.

Качественный состав бактерий-эндифитов растений-космополитов ЧР

Название растения	Части растений	грамположительные	грамотрицательные
<i>Taraxacum officinale</i>	листья	<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> (80,91 %), <i>E. amnigenus</i> (17,61 %), <i>E. intermedius</i> (1,48 %)
<i>Plantago major</i>	стебель	—	<i>Pantoea agglomerans</i> (86,63 %) <i>E. amnigenus</i> (6,93 %) <i>E. cloacae</i> (3,93 %), <i>E. cancerogenous</i> (2,51 %), <i>E. sakazakii</i> (2,12 %)
<i>Cichorium intybus</i>	стебель	—	<i>Enterobacter cancerogenous</i> (79,77 %) <i>E. cloacae</i> (13,58 %), <i>P. agglomerans</i> (4,53 %), <i>E. sakazakii</i> (2,12 %)
<i>Cichorium intybus</i>	цветки	<i>Micrococcus</i> spp. (96,35 %) <i>Staphylococcus auricularis</i> (3,65 %)	

Название растения	Части растений	грамположительные	грамотрицательные
<i>Matricaria chamomilla</i>	листья	—	<i>Enterobacter cloacae</i> (68,04 %), <i>P. agglomerans</i> (24,45 %), <i>Cedecea neteri</i> (7,51 %)
<i>Matricaria chamomilla</i>	цветки	—	<i>Enterobacter cloacae</i> (99,99 %)

Изоляты из цветков цикория и из листьев одуванчика были определены как грамположительные бактерии (рис. 1). Изоляты из листьев и цветков ромашки, из стеблей цикория, подорожника и из стебля одуванчика были определены как грамотрицательные палочковидные бактерии, в основном относящиеся к родам *Pantoea* и *Enterobacter*.

Грамположительная флора листьев одуванчика была определена как *Staphylococcus sciuri*, грамотрицательная флора была представлена тремя видами *Enterobacter* и *Pantoea*, из которых доминирующим был *Pantoea agglomerans*, который обычно встречается в растениях как эписимбионт или эндифитный симбионт, часто как мутуалист. Несмотря на то, что этот вид также был идентифицирован как причина болезней у ряда культивируемых растений, штамм *Pantoea agglomerans* CPHN2, эндифит некорневых клубеньковых клубеньков, выделенный из *Cicer arietinum*, продемонстрировал множество признаков, стимулирующих рост растений [11]. Цветки и стебли одуванчика роста бактерий не дали. В цветках цикория идентифицированы актинобактерии семейства *Micrococcaceae* (табл. 2), которые считаются важным источником биологически активных соединений для разработки лекарств.

Таблица 2.

Типы бактерий-эндифитов семейства *Micrococcaceae*

Тип бактерий	Пигмент	NIT	M-OX	NT	URE
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	Оранжевый	±	+	+	+
<i>Kocuria rosea</i>	Бледно красно-оранжевый	+	—	—	—
<i>Kocuria varians</i>	Желтый	+	—	—	+
<i>Micrococcus luteus</i>	Желтый.	—	+	+	±
<i>Micrococcus lylae</i>	Кремевый	—	+	—	—

NIT — восстановление нитрата до нитрита; M-OX — модифицированная оксидаза; NT — рост на неорганическом азотном агаре; URE — уреаза

Стебли *Cichorium intybus* как и в стебли *Plantago major* были в основном колонизированы *Enterobacter agglomerans*, в то время как в стеблях *Cichorium intybus* доминирующим видом был определен *Enterobacter*

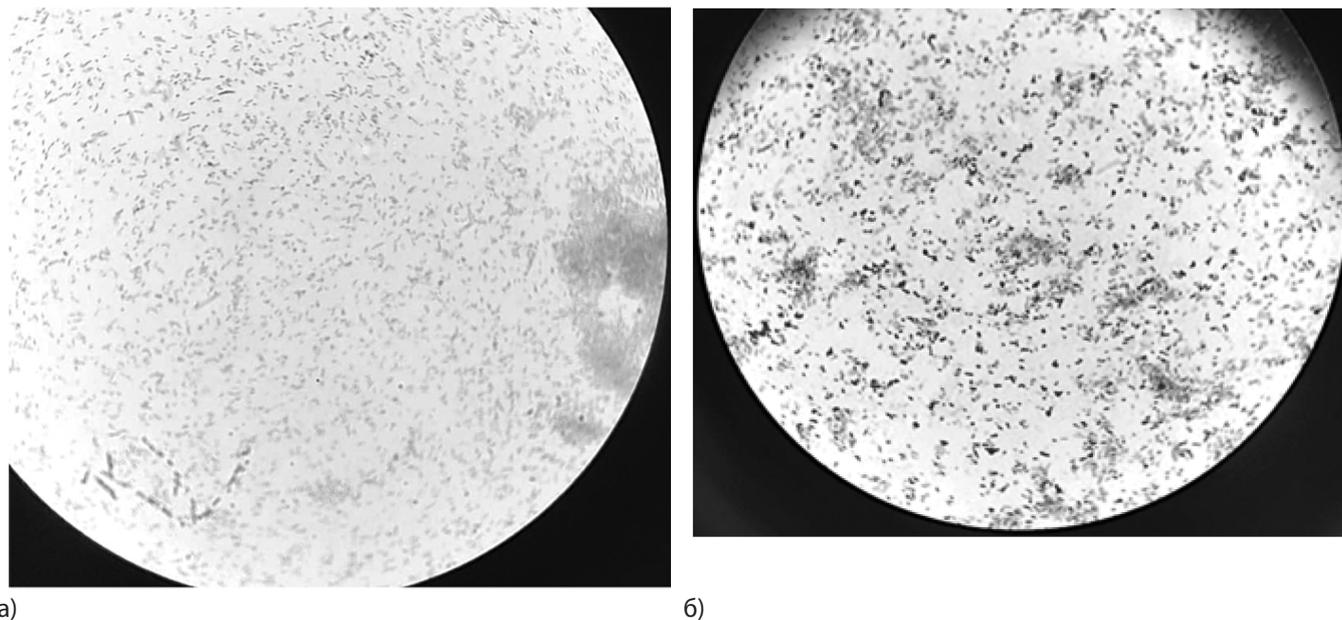


Рис. 1. Грамположительные бактерии листьев *Taraxacum officinale* (а) и цветков *Cichorium intybus* (б)

cancerogenous. В листьях *Matricaria chamomilla* были обнаружены *Enterobacter cloacae* и *P. agglomerans*, тогда как в цветках ромашки аптечной только *Enterobacter cloacae*. *Enterobacter cloacae*, считается обязательным эндофитом пыльцевых зерен средиземноморских сосен. В исследовании Macedo-Raygoza GM (2019) было показано, что *E. cloacae* защищает банановые растения от патогена черной сигатоки [15]

Наибольшее разнообразие эндофитов обнаружено в изолятах стеблей *Plantago major* (табл. 1). В этой части растения было определено до пяти видов эндофитов.

Из уникальных типов стоит отметить *Cedecea neteri*, обнаруженный в листьях *Matricaria chamomilla*, редкий патоген человека, который может вызывать бактериемию [7]. В последнее время также сообщалось о том, что он вызывает мягкую гниль на грибах *Pholiota nameko*, желтую липкую болезнь на грибах *Flammulina velutipes* и желтую гниль *P. pulmonarius* в Китае [13]. А также можно отметить *E. intermedius*, обнаруженный только в листьях одуванчика. Данных о колонизации данным типом бактерий растений в литературе не встречается, есть исследования об обнаружении в почве различных видов *Enterobacteriaceae* [9], что указывает на возможный путь колонизации внутренней среды растений.

Обсуждение

Эндофитные бактерии — это специализированная группа ризобактерий, способных внедряться во внутренние ткани растения-хозяина, включая надземные и подземные части растений и семена. Эндофитами могут быть как грибы, так и бактерии [18]. Процесс колонизации эндофитами растения хозяина, определяется

набором бактериальных признаков, называемых колонизационными признаками. Эндофиты в процессе внедрения во внутреннюю часть растений проходят этапы колонизации, которые включают как экологические, так и генетические факторы [6].

Некоторые исследователи указали, что эндофиты способствуют росту различных растений-хозяев [3]. В частности, *Bacillus altitudinis* (19RS3 и T5S-T4) из 36 эндофитных спорообразующих бактерий, выделенных из проростков Йерба мате (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), вида, произрастающего в субтропических регионах Южной Америки, оказался перспективным изолятом для использования в качестве биоинокулянта на проростках мате в исследовании американских ученых [12]. Скрининг эндофитных бактерий фармакологически важного лекарственного растения *Gloriosa superba*. способствующих росту растений, что указывает на их важность в качестве потенциальных кандидатов для разработки биоинокулянтов [17]. Заметное улучшение азотфиксации наблюдалось при одновременной вакцинации штаммов неризобияльных эндофитов и *Rhizobium* из корневых клубеньков *Vigna radiata* в недавней работе Dhole AM и его коллег (2023) [8].

Многочисленные исследования показали, что эндофиты действуют как химические синтезаторы вторичных метаболитов растения-хозяина, что позволяет рассматривать эндофиты как биопотенциал фармацевтически важных соединений природного происхождения. Например, таксол-продуцирующий эндофитный гриб *Phoma* sp., выделенный из *Calotropis gigantea*, а также *Aspergillus fumigatus*, эндофитный гриб, обнаруженный в *Moringa oleifera*, продемонстрировал эффективную антибиопленку, антимикробную и антипролиферативную активность [21]. В течение последних нескольких десяти-

тилетий оценивались антибиотические свойства органических экстрактов, полученных из различных эндофитов, с перспективой обнаружения микроорганизмов, являющихся продуцентами новых биологически активных соединений, в результате чего было найдено множество экстрактов со значениями МПК, подходящими для обоснования дальнейших исследований. Совсем недавно были обнаружены эндофиты, которые производят углеводороды, подобные тем, которые содержатся в дизельном и бензиновом топливе [19]. Эндофиты известны тем, что производят пигменты, биологически активные соединения и промышленно важные ферменты, такие как глюканаза, амилаза, лакказ и т.д. Они также играют важную роль в биоразложении и биоремедиации, которые полезны для окружающей среды и экологии [4].

Выделение и характеристика эндофитов является первым исследованием, которое было проведено в Чеченской Республике. Анализ выявил присутствие бактериальных эндофитов у всех видов изученных растений. Вместе

с тем, надо отметить, что было обнаружено несколько неизвестных биотипов. Известно, что популяции эндофитных бактерий зависят от типа питательной среды, которая сильно влияет на численность и разнообразие сообществ эндофитов, бактерий. Выделение эндофитов затруднено и отсутствием данных об их потребностях в питательных веществах, а в некоторых случаях клетки бактерий не поддаются культивированию. Поэтому в настоящее время для анализа бактериального разнообразия используют геномную ДНК (гДНК) из поверхностно стерилизованных растительных тканей и амплификации специфического генного маркера микробов, гена 16S рРНК [5]. Дальнейшие исследования с использованием молекулярных инструментов для идентификации, функциональной и экологической значимости эндофитов у растений в различных экологических и географических условиях ЧР будут иметь большое значение. Тем не менее, результаты настоящего исследования могут быть полезны в качестве основы для подобных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артамонова М.Н., Потатуркина-Нестерова Н.И., Беззубенкова О.Е. Роль бактериальных симбионтов в растительно-микробных ассоциациях // Вестник Башкирского университета. 2014. Т. 19. №1 С. 81–84.
2. Гакаев Р.А. Растительный покров высокогорных ландшафтов Чеченской Республики и его современное состояние / Р.А. Гакаев, К.Я. Зухайраева. // Молодой ученый. — 2015. — №16(96). — С.112–117.
3. Afzal, I. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants / I. Afzal, Z. Khan Shinwari, Sh. Sikandar, Sh. Shahzad // Microbiological Research. V. 221, 2019, P. 36–49, ISSN 0944-5013, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
4. Agrawal S, Bhatt A. Microbial Endophytes: Emerging Trends and Biotechnological Applications. *Curr Microbiol.* 2023 22;80(8):249. doi: 10.1007/s00284-023-03349-2.
5. Ali M, Ali Q, Sohail MA, Ashraf MF, Saleem MH, Hussain S, Zhou L. Diversity and Taxonomic Distribution of Endophytic Bacterial Community in the Rice Plant and Its Prospective. *Int J Mol Sci.* 2021 21;22(18):10165. doi: 10.3390/ijms221810165.
6. Compant S, Clément Ch, Sessitsch A Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization // *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 2010, P 669-678, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>.
7. Dalamaga, M. Cedecea: an «unknown» pathogen in the family of Enterobacteriaceae-its clinical importance, detection and identification methods. / Dalamaga M., Sotiropoulos GP, Vrioni G., Tsakris A. *Acta Microbiologica Hellenica*, 2014;59(1), 17–28.
8. Dhole AM, Shelat HN, Patel HK, Jhala YK. Evaluation of the Co-inoculation Effect of Rhizobium and Plant Growth Promoting Non-rhizobial Endophytes on *Vigna radiata*. *Curr Microbiol.* 2023 6;80(5):167. doi: 10.1007/s00284-023-03266-4.
9. Glushakova AM, Kachalkin AV, Prokof'eva TV, Lysak LV. Enterobacteriaceae in soils and atmospheric dust aerosol accumulations of Moscow city. *Curr Res Microb Sci.* 2022 4;3:100124. doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100124.
10. Haridoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 2008;16(10):463–71. doi: 10.1016/j.tim.2008.07.008.
11. Kumar P, Rani S, Dahiya P, Kumar A, Dang AS, Suneja P. Whole genome analysis for plant growth promotion profiling of *Pantoea agglomerans* CPHN2, a non-rhizobial nodule endophyte. *Front Microbiol.* 2022 Nov 7;13:998821. doi: 10.3389/fmicb.2022.998821.
12. Laczeski ME, Onetto AL, Cortese IJ, Mallozzi GY, Castrillo ML, Bich GÁ, et al. Isolation and selection of endophytic spore-forming bacteria with plant growth promoting properties isolated from *Ilex paraguariensis* St. Hil. *An Acad Bras Ciênc.* 2020;92:e20181381. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020181381>.
13. Liu ZL, Zhou S, Zhang W, Wu S, Chen X, Wang X, Hu H, Chen Q. First report of *Cedecea neteri* Causing Yellow rot Disease in *Pleurotus pulmonarius* in China. *Plant Dis.* 2020. doi: 10.1094/PDIS-09-20-1886-PDN.
14. López Ortega MP, Criollo Campos PJ, Gómez Vargas RM, Camelo Runsinque M, Estrada Bonilla G, Garrido Rubiano MF & Bonilla Buitrago R. 2013. Characterization of diazotrophic phosphate solubilizing bacteria as growth promoters of maize plants. *Rev Colomb Biotecnol* 15(2): 115–123.
15. Macedo-Raygoza GM, Valdez-Salas B, Prado FM, et al. *Enterobacter cloacae*, an endophyte that establishes a nutrient-transfer symbiosis with banana plants and protects against the Black Sigatoka pathogen. // *Microbiol.* 2019; 10:804. doi:10.3389/fmicb.2019.00804.
16. Marag PS, Suman A. Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). // *Microbiol Res.* 2018;214:101–113. doi: 10.1016/j.micres.2018.05.016.

17. Ogale S, Yadav K S, Navale Sh. Screening of endophytic bacteria from the pharmacologically important medicinal plant *Gloriosa superba* for their multiple plant growth promoting properties. *Pharma Innovation* 2018;7(1):208–214
18. Reinhold-Hurek B, Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol.* 2011 Aug;14(4):435–43. doi: 10.1016/j.pbi.2011.04.004.
19. Strobel G. The Emergence of Endophytic Microbes and Their Biological Promise. *J Fungi (Basel)*. 2018 May 16;4(2):57. doi: 10.3390/jof4020057.
20. Tizabi D, Hill RT. *Micrococcus* spp. as a promising source for drug discovery: A review, // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2023, 50(1), kuad017, <https://doi.org/10.1093/jimb/kuad017>
21. Yadav G, Meena M. Bioprospecting of endophytes in medicinal plants of Thar Desert: An attractive resource for biopharmaceuticals. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2021 24;30:e00629. doi: 10.1016/j.btre.2021.e00629

© Бисултанова Зура Исановна (Zura_sun@mail.ru); Бисултанова Зарина Руслановна (bis-zarina@yandex.ru);
Доднаева Лайла Рамзановна (dodnaeva.leila@mail.ru); Джамбетова Петимат Махмудовна (Petimat-lg@rambler.ru)
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»