

Сизенцов А.Н., Галактионова Л.В. Влияние солей железа на ростовые характеристики и антагонистическую активность почвенных изолятов *Bacillus cereus*

Электронный научно-производственный журнал  
«АгроЭкоИнфо»

УДК: 57.044, 57.047 + 579.262

## Влияние солей железа на ростовые характеристики и антагонистическую активность почвенных изолятов *Bacillus cereus*

Сизенцов А.Н., Галактионова Л.В.

Оренбургский государственный университет

### Аннотация

Исследование посвящено изучению влияния солей железа на ростовые характеристики и антагонистическую активность по отношению к *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella typhimurium* бактерий *Bacillus cereus*. В качестве объектов исследования использовали 9 штаммов бактерий *B. cereus*, предварительно выделенных из почв, которые проявили различную устойчивость к растворам солей железа в диапазоне концентраций от 1 М/л до 0,031 М/л. В ходе работы использовались методы: серийных разведений, посева и культивирования бактерий на питательных средах, MALDI ToF MS, агаровых лунок и нефелометрический. Максимальные значения показателей толерантности и роста зарегистрированы у штамма *B. cereus* ОСТ2022.6, которому незначительно уступали ОСТ2022.2 и ОСТ2022.9, проявляющие относительную резистентность как к нитрату, так и сульфату железа. Выраженные антагонистические свойства штаммов проявились на фоне предварительного инкубирования с нитратом железа по отношению к *E. coli* и *P. aeruginosa*, а в варианте с сульфатом подавление отмечено только для 3 штаммов в отношении *P. aeruginosa*. Сульфат железа обладает более выраженным токсическим действием на рост тестируемых изолятов *B. cereus*. Штамм ОСТ2022.6 обладал наибольшей резистентностью в отношении нитрата железа и способностью к подавлению условно-патогенных микроорганизмов.

**Ключевые слова:** BACILLUS CEREBUS, ЖЕЛЕЗО, ТОЛЕРАНТНОСТЬ, АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, СУПРЕССИВНОСТЬ

## Введение

Почвенные микроорганизмы играют важную роль в повышении плодородия почвы и здоровья растений. Арбускулярные микоризные грибы и ризобактерии, способствующие росту растений, составляют ключевой компонент почвенной микробной популяции. Они образуют симбиотическую ассоциацию с большинством сельскохозяйственных растений, помогают растениям в питании фосфором и защищают их от биотических и абиотических стрессов, в то время как многие виды *Bacillus* sp., встречающиеся в почве, способствуют росту растений за счет растворения фосфатов, производства фитогормонов и защиты от биотических и абиотических стрессов [1]. Кроме того, новые данные о микробиоме корней, клубеньков, ризосферы и семян растений указывают на стратегии, которые можно использовать для разработки новых поколений биоудобрений, с учетом роли микроорганизмов в повышении продуктивности агроэкосистем [2].

Комплексный анализ последствий микробных инокулянтов является способом разработки биоудобрений на основе консорциума. Биоудобрения на основе консорциума показывают более эффективное влияние на рост растений, количество и качество урожая, чем биоудобрения на основе отдельных штаммов [3].

В современной литературе представлен значительный массив экспериментальных данных по изучению влияния тяжелых металлов на сельскохозяйственные культуры и современных методов корректирования негативного влияния тяжелых металлов на растения [4]. Перспективным подходом в решении данной проблемы является использование почвенных микроорганизмов с выраженными сорбционными характеристиками. Отметим, что предпочтение в большинстве проводимых исследований отводится представителям *Bacillus* spp., так как наряду с высокими накопительными характеристиками в отношении различных металлов, они выступают в качестве стимуляторов роста растений, за счет различных метаболических и фитохимических механизмов взаимодействия с последними [5, 6].

Микробная ремедиация почв является важным методом решения проблем, связанных с загрязнением окружающей среды. Так, например в исследованиях проводимых Üreyen Esertaş Ü.Z. с соавторами (2020) с использованием ризоидной бактерии (*Bacillus* sp. 5O5Y11), выделенной из орхидей, растущих на плато Овит, было установлено, что данный штамм обладает высокой устойчивостью к солям в концентрации до 15 % в широком диапазоне температур (10-45 °C) и pH (pH 4,5-8,0), а

также выраженной лецитиназной, желатиназной активностью и способностью к восстановлению нитратов. В модельных экспериментах *in vitro* регистрировалось повышенное образование сидерофоров и аммония. Также установлена высокая уровня толерантность к ряду тяжелых металлов (напр. Fe, Cu, Pb, Ag, Zn) [7].

Традиционные методы удаления примесей железа из каолина обычно связаны с высоким уровнем воздействия на окружающую среду и высокими затратами. Большинство альтернативных методов сосредоточены на использовании биовыщелачивания, при котором железо в каолине восстанавливается микроорганизмами. Проводимые Yong S.N. с соавторами (2023) эксперименты по биологическому выщелачиванию с использованием трех представителей *Bacillus* sp. позволили установить, что все тестируемые штаммы имели общую тенденцию к удалению железа до 65,3 %, так же установлено, что при биовыщелачивании *Bacillus* sp. производятся различные органические кислоты, такие как молочная кислота, муравьиная кислота, яблочная кислота, уксусная кислота и янтарная кислота [8]. Металлорегуляторные белки позволяют клеткам воспринимать ионы металлов и соответствующим образом регулировать экспрессию путей поглощения, хранения и оттока металлов [9].

*Bacillus cereus* демонстрирует большое разнообразие жизненных стратегий и способность адаптироваться к контрастным по условиям экологическим нишам. Эти штаммы широко распространены в окружающей среде, встречаются как на минеральных, так и на органических поверхностях. Существует предположение, что ключевую роль в этом повсеместном распространении и устойчивости играют биопленки. *B. cereus* способен к образованию биопленок, внутри которых бактериальные клетки существуют в различных физиологических состояниях и способны генерировать высокорезистентные и клейкие споры, которые сами по себе повышают устойчивость бактерии к бактерицидным факторам воздействия [10, 11].

Исходя из вышеизложенного, целью исследования являлась оценка влияния соединений железа на ростовые и антагонистические характеристики почвенных изолятов *B. cereus*.

### **Материал и методы исследования**

Для реализации поставленной цели в качестве объектов исследования в модельном

эксперименте *in vitro* использовались выделенные и идентифицированные штаммы *Bacillus cereus*. Изолированные штаммы были выделены из агрочернозема, участок отбора находился на территории садового товарищества «Импульс» (окрестности г. Оренбурга, Оренбургская область). Отбор образцов почв производился согласно ГОСТу 17.4.4.02-84 из корнеобитаемого слоя 0–30 см [12].

Предварительная пробоподготовка почвенных образцов включала перенос образца навеской  $50,0 \pm 1,0$  г в стерильные колбы и выдерживание на водяной бане в течение 1,5 часов при температуре 95 °С. Идентификацию выделенных культур бактерий проводили с использованием метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролётной масс-спектрометрией (MALDI ToF MS).

Оценку уровня биотоксичности железа на тестируемые штаммы осуществляли с использованием  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Выбор данных химических соединений железа обусловлен высоким уровнем их диссоциации в водных растворах.

Определение уровня резистентности влияния солей железа проводили с использованием диффузионного метода агаровых лунок в комбинации с методом серийных разведений. Для оценки резистентности штаммов бактерий к  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  и  $\text{FeSO}_4$  использовали следующие концентрации солей: от 1 М/л до 0,0156 М/л. Ростовые характеристики оценивали нефелометрически путем измерений оптической плотности суспензии бактерий и последующим построением кривой роста.

Оценку влияния железа на антагонистические характеристики исследуемых штаммов осуществляли также с использованием этого же метода. В качестве действующего вещества в стерильный ГРМ бульон вносили рабочие концентрации (РК) солей железа (не оказывающие ингибирующее действие на тестируемые штаммы). Выделенные изоляты бактериальных клеток инкубировали в течение 24, 48 и 72 часов при температуре 37 °С, на каждом из указанных временных интервалов содержимое пробирки центрифугировали с целью отбора супернатанта (вторичные метаболиты, такие как антибиотикоподобные соединения, в процессе роста популяции клеток активно выделяются в субстрат) и оценки его антагонистических характеристик (бактерицидный эффект).

На поверхность стерильного питательного субстрата (ГРМ-агар) газомом высевали суспензию *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella typhimurium*, пробочным

сверлом делали равноудаленные (не менее 1,5 см от края чашки Петри и не менее 3 см между лунками) лунки диаметром 5 мм, в которые вносили полученный супернатант (после 24, 48 и 72 часов культивирования штаммов в присутствии  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24 часов. Оценку антагонистических характеристик определяли визуально путем замера диаметральными удаленных зон полного ингибирования роста вокруг лунок.

Полученные экспериментальные данные были статистически обработаны, достоверность различий оценивалась на основании определения t- критерия Стьюдента и критерия Уилкоксона с использованием автоматизированного пакета программ «STATISTICA 10» (StatSoft, USA).

### **Полученные результаты и их обсуждение**

В ходе реализации первого блока экспериментального исследования, направленного на выделение почвенных изолятов *Bacillus cereus* из образца на основании культуральных, морфологических признаков и методом MALDI ToF MS были идентифицированы 9 штаммов с последующим их обозначением от ОСТ2022.1 до ОСТ2022.9.

Исследование уровня толерантности выделенных изолятов *B. cereus* по отношению к нитрату и сульфату железа свидетельствуют о высоком уровне биотоксичности обеих используемых в эксперименте солей (рис. 1).

Так следует отметить, что все тестируемые штаммы обладают выраженной чувствительностью к солям в концентрации 1 М/л с ингибированием роста от 34,33 мм (ОСТ2022.7) до 21,00 мм (ОСТ2022.6) в присутствии  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  и от 32,33 мм (ОСТ2022.1) до 25,33 (ОСТ2022.9) при добавлении  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . При этом наиболее высокими показателями уровня толерантности (обусловленного минимальным уровнем ингибирующего действия) является штамм ОСТ2022.6 у которого регистрируются минимальные зоны ингибирования при концентрации 1 М/л нитрата железа и выраженной резистентностью при внесении данного химического соединения в дозе 0,063 М/л, на фоне ингибирования других тестируемых в эксперименте штаммов. Использование в эксперименте концентраций нитрата и сульфата железа ниже 0,063 М/л не вызывало подавление роста штаммов *B. cereus*. Наиболее близкими показателями толерантности к

химическим соединениям железа, наряду со штаммом *B. cereus* ОСТ2022.6, обладают ОСТ2022.2 и ОСТ2022.9, проявляющие относительную устойчивость как к нитрату, так и сульфату железа.

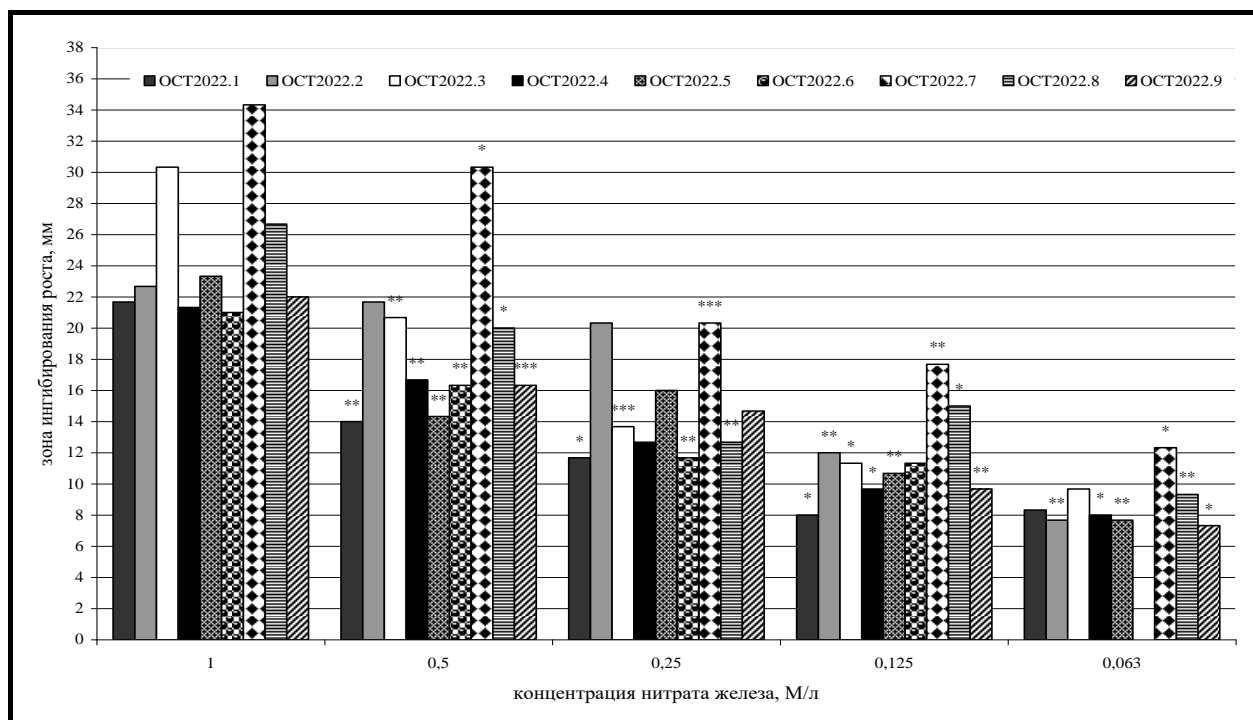


Рис. 1. Средние значения зон ингибирования роста тестируемых штаммов на фоне использования различных концентраций Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>

Промежуточный этап проводимых исследований был направлен на оценку влияния исследуемых солей на рост штаммов *B. cereus* с целью определения времени их выхода на максимальные значения скорости роста бактерий в условиях периодического культивирования (рис. 2). Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о достоверно значимом различии ( $p < 0,001$ ) между показателями контроля (культивирование в жидком субстрате без добавления Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) и опыта. Так установлено, что из 3 представленных на графике штаммов наиболее высокими ростовыми характеристиками обладает штамм *B. cereus* ОСТ2022.6 значения которых превышают аналогичные культур ОСТ2022.2 и ОСТ2022.9 на 29,27 % и 24,39 %, соответственно.

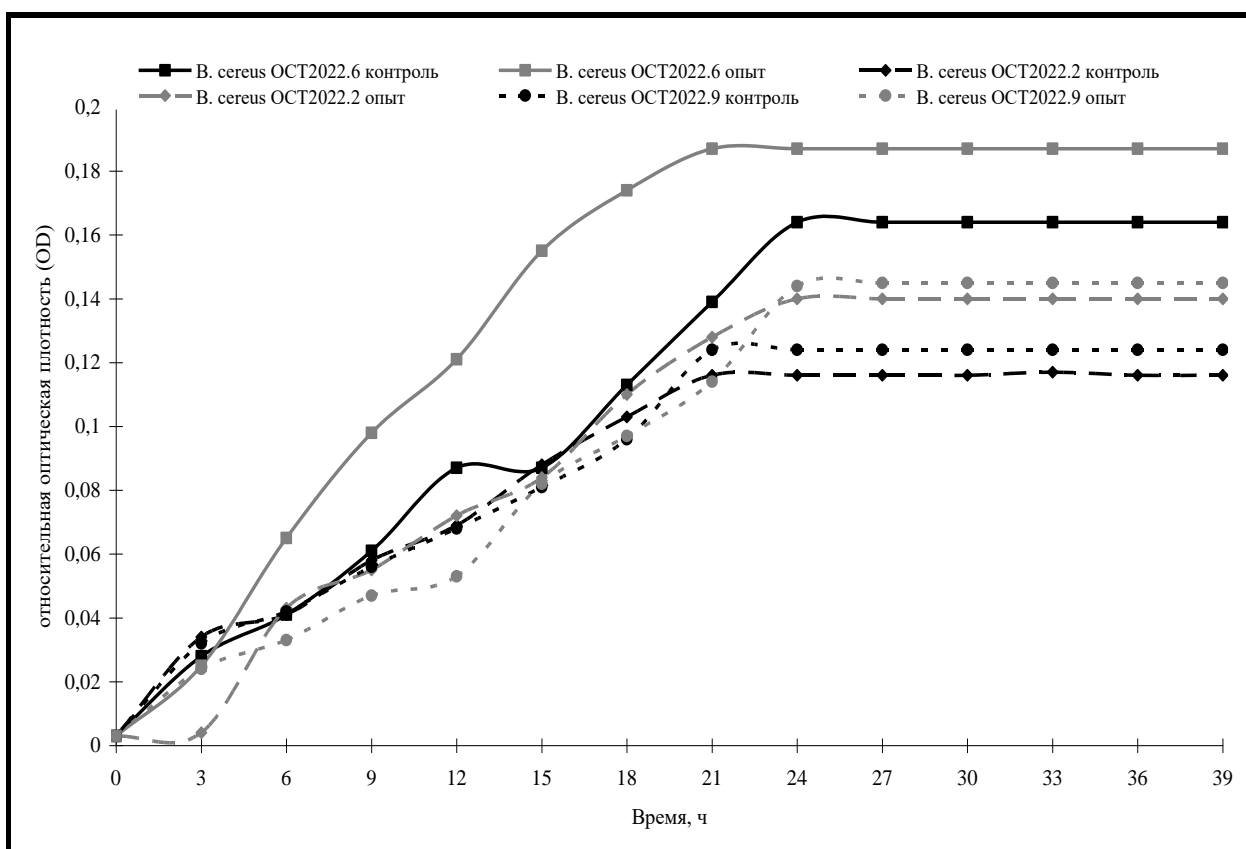


Рис. 2. Динамические характеристики роста штаммов *B. cereus* OСТ2022.6, OСТ2022.2 и OСТ2022.9 в присутствии  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  в концентрации 0,031 М/л

Внесение в субстрат нитрата железа способствует не только увеличению оптической плотности, но и сокращает время наступления стационарной фазы роста на 3 часа для всех тестируемых штаммов. Уровень плотности популяции на 39 часов исследования превысил контрольные показатели на 12,30 % для OСТ2022.6, 17,14 % и 14,48 % у OСТ2022.2 и OСТ2022.9, соответственно.

Увеличение оптической плотности в опытных образцах может быть связано не только со стимулированием роста тестируемых микроорганизмов, но и с повышением плотности бактериальных клеток за счет сорбции металла на поверхностных структурах. Полученные в данной серии эксперимента данные объясняют результаты эксперимента по оценке уровня толерантности, так как прослеживается прямая зависимость между более высокими динамическими характеристиками роста и уровнем устойчивости штамма OСТ2022.6.

В проводимых экспериментальных исследованиях была проведена оценка влияния массивной катионной нагрузки железа в субстрате на антагонистические

характеристики тестируемых штаммов (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о выраженном влиянии метаболитов микроорганизмов на используемые в эксперименте патогенные и условно-патогенные штаммы.

Таблица 1. Оценка уровня влияния сульфата и нитрата железа на антагонистическую активность тестируемых штаммов в отношении патогенных и условно-патогенных штаммов

Исследуемые штаммы <i>B. cereus</i>	Время инкубирования изолятов <i>B. cereus</i> в присутствии солей, часов					
	24		48		72	
	FeSO <sub>4</sub>	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	FeSO <sub>4</sub>	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	FeSO <sub>4</sub>	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
<i>E. coli</i>						
ОСТ2022.1	R	11,69±1,46	R	13,33±0,33	R	12,16±0,37
ОСТ2022.2	R	11,00±0,01	R	11,00±0,57	R	11,22±0,54
ОСТ2022.3	R	19,00±2,00	R	19,00±8,02	R	11,00±0,57
ОСТ2022.4	R	10,66±0,88	R	10,00±0,01	R	9,30±0,55
ОСТ2022.5	R	11,00±1,15	R	11,00±0,57	R	12,00±0,57
ОСТ2022.6	R	11,31±0,88	R	11,12±0,61	R	11,21±0,62
ОСТ2022.7	R	9,32±0,56	R	10,00±0,57	R	11,00±0,00
ОСТ2022.8	R	10,67±0,35	R	11,32±0,46	R	11,27±0,52
ОСТ2022.9	R	10,72±0,42	R	10,41±0,29	R	10,31±0,24
<i>P. aeruginosa</i>						
ОСТ2022.1	R	11,00±0,57	R	9,64±0,58	R	10,37±0,29
ОСТ2022.2	R	R	R	R	R	R
ОСТ2022.3	R	9,21±0,43	R	9,61±0,56	R	9,56±0,32
ОСТ2022.4	R	10,30±0,59	R	9,30±0,25	R	9,42±0,29
ОСТ2022.5	R	9,00±0,57	R	9,41±0,37	R	9,35±0,41
ОСТ2022.6	8,00±0,03	10,00±0,00	8,72±0,43	9,66±0,31	9,52±0,23	10,27±0,61
ОСТ2022.7	R	R	R	R	R	R
ОСТ2022.8	9,63±0,27	10,33±0,88	R	10,12±1,07	R	9,62±0,44
ОСТ2022.9	9,58±0,31	10,16±0,24	9,00±0,57	10,00±1,00	8,12±0,18	11,00±0,57
<i>S. typhimurium</i>						
ОСТ2022.1	R	R	R	R	R	R
ОСТ2022.2	R	R	R	R	R	R
ОСТ2022.3	R	R	R	R	R	R
ОСТ2022.4	R	R	R	R	R	R
ОСТ2022.5	R	R	R	R	R	R
ОСТ2022.6	R	R	R	R	R	R
ОСТ2022.7	R	R	R	R	R	R
ОСТ2022.8	R	R	R	R	R	R
ОСТ2022.9	R	R	R	R	R	R

Примечание: R - отсутствие зон ингибирования роста.

Экспериментально установлено, что все тестируемые штаммы *B. cereus* в условиях



насыщения субстрата железом активно подавляют рост и размножение *E. coli*, проявляющееся в ингибировании роста с варьированием зоны ингибирования от 10,00 мм до 11,00 мм. Исключение составил штамм ОСТ2022.3, обладающий наиболее высокими ингибирующими характеристиками в отношении исследуемого микроорганизма с зоной ингибирования роста до 19 мм, через 24 и 48 часов культивирования. А проведенные экспериментальные исследования по влиянию предварительного культивирования штаммов *B. cereus* в среде без солей железа и с нитратом железа в концентрации 0,031 М/л не выявили подавления роста *E.coli*, *P. aeruginosa* и *S. typhimurium*, что свидетельствует об индукции только повышенной катионной нагрузки ионами железа синтеза широкого круга вторичных метаболитов, проявляющих антагонистическую активность.

Экспериментально установлен относительно высокий уровень ингибирующего действия метаболитов семи тестируемых штаммов *B. cereus* в отношении полирезистентного штамма *P. aeruginosa*. Умеренно выраженная резистентность в диапазоне от 9,00 мм до 11,00 мм была зарегистрирована у всех штаммов за исключением ОСТ2022.7, при этом следует отметить, что достоверных различий между временем инкубирования и зонами подавления роста не установлено. Штамм *S. typhimurium* проявил выраженную резистентность в отношении всех исследуемых штаммов, независимо от времени инкубирования.

### Заключение

Обобщая результаты проведенных экспериментальных исследований по оценке уровня толерантности почвенных изолятов *B. cereus* к различным химическим соединениям железа следует отметить, что сульфат железа обладает более выраженным токсическим действием на рост тестируемых штаммов, о чем свидетельствует наличие ингибирующего эффекта вплоть до концентрации 0,0625 М/л. Однако в ходе исследования не выявлены различия бактерицидного действия солей железа с различным анионным компонентом, так как корреляционная зависимость между ингибирующим эффектом и концентрацией элемента в субстрате имеет общую закономерность у обеих исследуемых соединений. Максимальные показатели толерантности зарегистрированы у штамма *B. cereus* ОСТ2022.6 которому незначительно уступают ОСТ2022.2 и ОСТ2022.9 проявляющие относительную резистентность как к нитрату, так и сульфату железа.

В контексте изучения перспективности использования выделенных изолятов для

повышения супрессивности почв, следует отметить, что все исследуемые штаммы микроорганизмов активно продуцируют метаболиты, подавляющие рост *E. coli* и *P. aeruginosa*, что может быть использовано в практической деятельности для снижения численности патогенных микроорганизмов в почвах сельскохозяйственных угодий.

### **Благодарность**

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23–26–10079, <https://rscf.ru/project/23-26-10079/>.

### **Список использованных источников:**

1. Nanjundappa A., Bagyaraj D.J., Saxena A.K., Kumar M., Chakdar H. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus* spp. in soil enhancing growth of crop plants. *Fungal Biology and Biotechnology*. 2019. vol. 28. no 6. p. 23. <https://doi.org/10.1186/s40694-019-0086-5>
2. Xavier G.R., Jesus E.C., Dias A., Coelho M.R.R., Molina Y.C., Rumjanek N.G. Contribution of biofertilizers to pulse crops: from single-strain inoculants to new technologies based on microbiomes strategies. *Plants*. 2023. vol. 20. no 12(4). pp. 954. <https://doi.org/10.3390/plants12040954>
3. Kumar A., Jha M.N., Singh D., Pathak D., Rajawat M.V.S. Prospecting catabolic diversity of microbial strains for developing microbial consortia and their synergistic effect on Lentil (*Lens esculenta*) growth, yield and iron biofortification. *Archives of Microbiology*. 2021. vol. 203. no 8. pp. 4913-4928. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02446-9>
4. Liu S.H., Zeng G.M., Niu Q.Y., Liu Y., Zhou L., Jiang L.H., Tan X.F., Xu P., Zhang C., Cheng M. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. *Bioresource technology*. 2017. no 224. pp. 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.095>
5. Rizvi A., Ahmed B., Zaidi A., Khan M.S. Biosorption of heavy metals by dry biomass of metal tolerant bacterial biosorbents: an efficient metal clean-up strategy. *Environmental monitoring and assessment*. 2020. vol. 192. no 12. pp. 801. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08758-5>
6. Babu A.G., Kim J.D., Oh B.T. Enhancement of heavy metal phytoremediation by *Alnus firma* with endophytic *Bacillus thuringiensis* GDB-1. *Journal of hazardous materials*. 2013. vol. 250. no 251. pp. 477–483. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.02.014>
7. Esertaş Ü.Z.Ü., Uzunalioglu E., Guzel S., Bozdeveci A., Karaoğlu Ş.A. Determination of bioremediation properties of soil-borne *Bacillus* sp. 5O5Y11 and its effect on the development of *Zea mays* in the presence of copper. *Archives of Microbiology*. 2020.

<https://doi.org/10.1007/s00203-020-01900-4>

8. Yong S.N., Lee W.S., Chieng S., Lim S., Kuan S.H. Impact of *Bacillus species* on Fe reduction of kaolin in bioleaching: surface, structural, and chemical studies. *Applied microbiology and biotechnology*. 2023. vol. 107. no 15. pp. 4789–4801.

<https://doi.org/10.1007/s00253-023-12622-0>

9. Helmann J.D. Specificity of metal sensing: iron and manganese homeostasis in *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry*. 2014. vol. 289. no 41. pp. 28112–28120.

<https://doi.org/10.1074/jbc.R114.587071>

10. Majed R., Faille C., Kallassy M., Gohar M. *Bacillus cereus* biofilms-same, only different. *Frontiers in microbiology*. 2016. no 7. pp. 1054.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01054>

11. Lin Y., Briandet R., Kovács Á.T. *Bacillus cereus* sensu lato biofilm formation and its ecological importance. *Biofilm*. 2022. no 4. pp.100070.

<https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2022.100070>

12. Сизенцов А.Н., Бибарцева Е.В., Синеок Д.М. Сравнительная оценка уровня толерантности почвенных изолятов *Bacillus subtilis* в отношении химических соединений меди // Аграрная наука. 2022. N 10. С. 86-90. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-363-10-86-90>

#### Цитирование:

Сизенцов А.Н., Галактионова Л.В. Влияние солей железа на ростовые характеристики и антагонистическую активность почвенных изолятов *Bacillus cereus* [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2023. – № 6. – Режим доступа: [http://agroecoinfo.ru/STATYI/2023/6/st\\_620.pdf](http://agroecoinfo.ru/STATYI/2023/6/st_620.pdf)  
DOI: <https://doi.org/10.51419/202136620>.