

# Ризосферные плазмидосодержащие бактерии рода *Pseudomonas* для био/фиторемедиации загрязненных почв

Кочетков В.В., Анохина Т.О., Сиунова Т.В., Сизова О.И., Боронин А.  
М.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН

# Новая концепция фиторемедиации почв, загрязненных смесью ПАУ с токсичными металлами и/или металлоидами

Конструирование  
мультифункциональных  
штаммов *PGPR Pseudomonas*

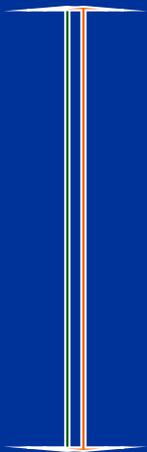


Инокуляция семян  
мультифункциональными  
штаммами и выращивание  
растений на загрязненных  
почвах

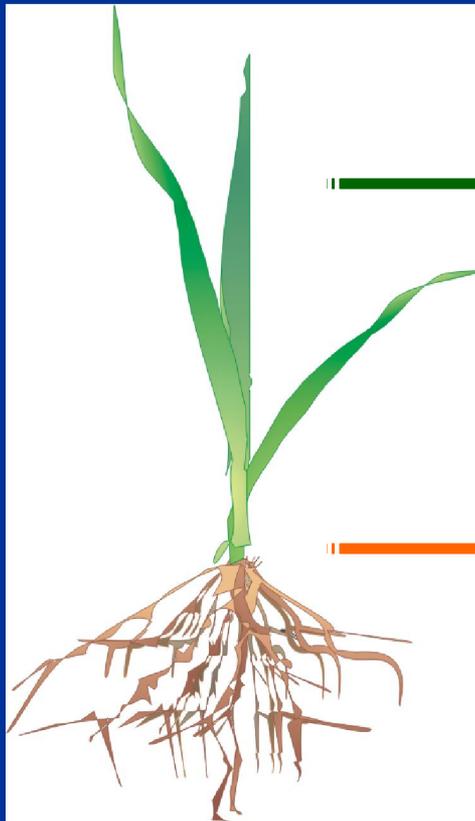
Дегградация ПАУ



Растение



Ризосферные  
бактерии рода  
*Pseudomonas*



ФИТОРЕМЕДИАЦИЯ



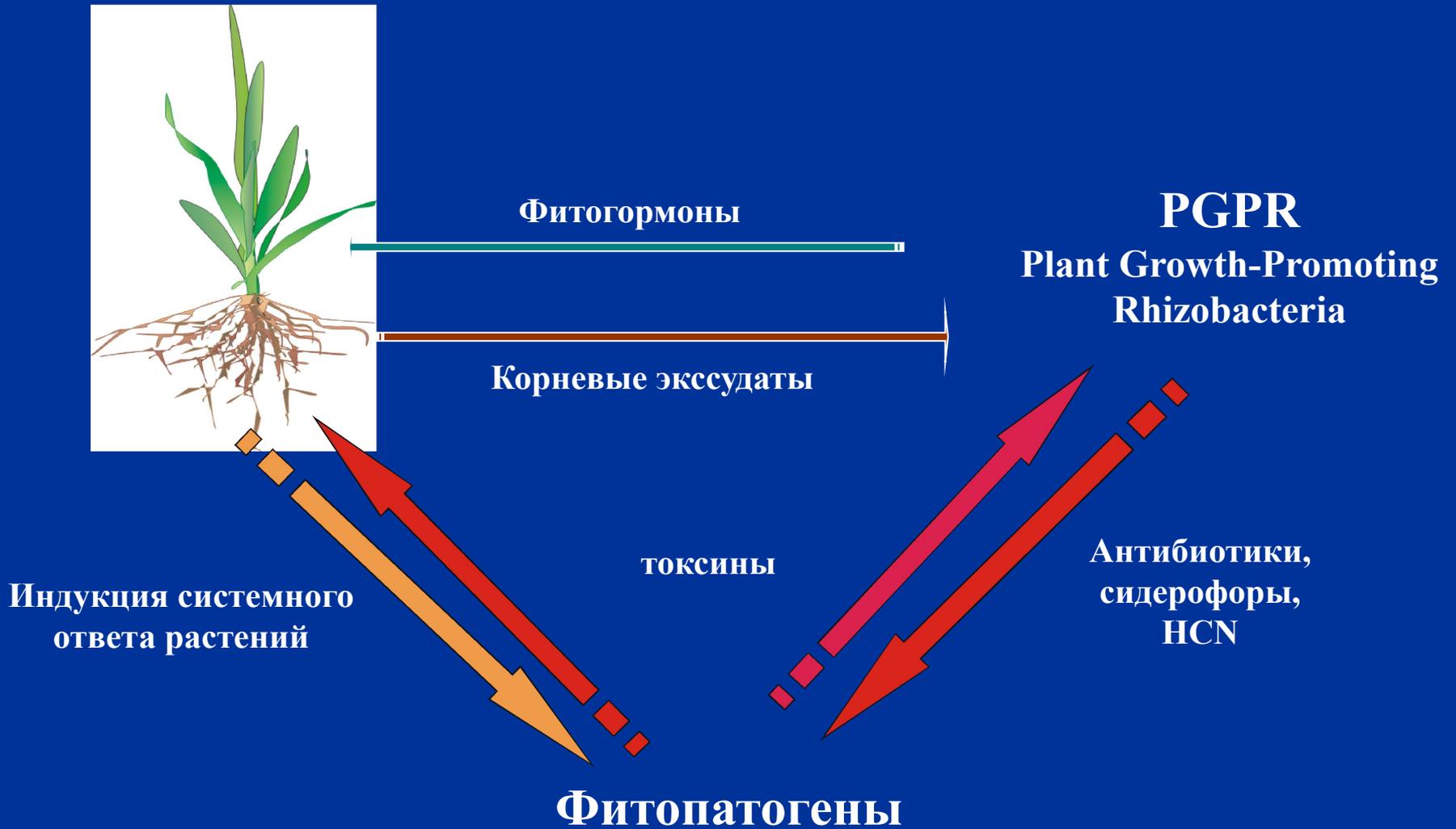
АККУМУЛЯЦИЯ  
ПОЛЛЮТАНТОВ

БИОРЕМЕДИАЦИЯ

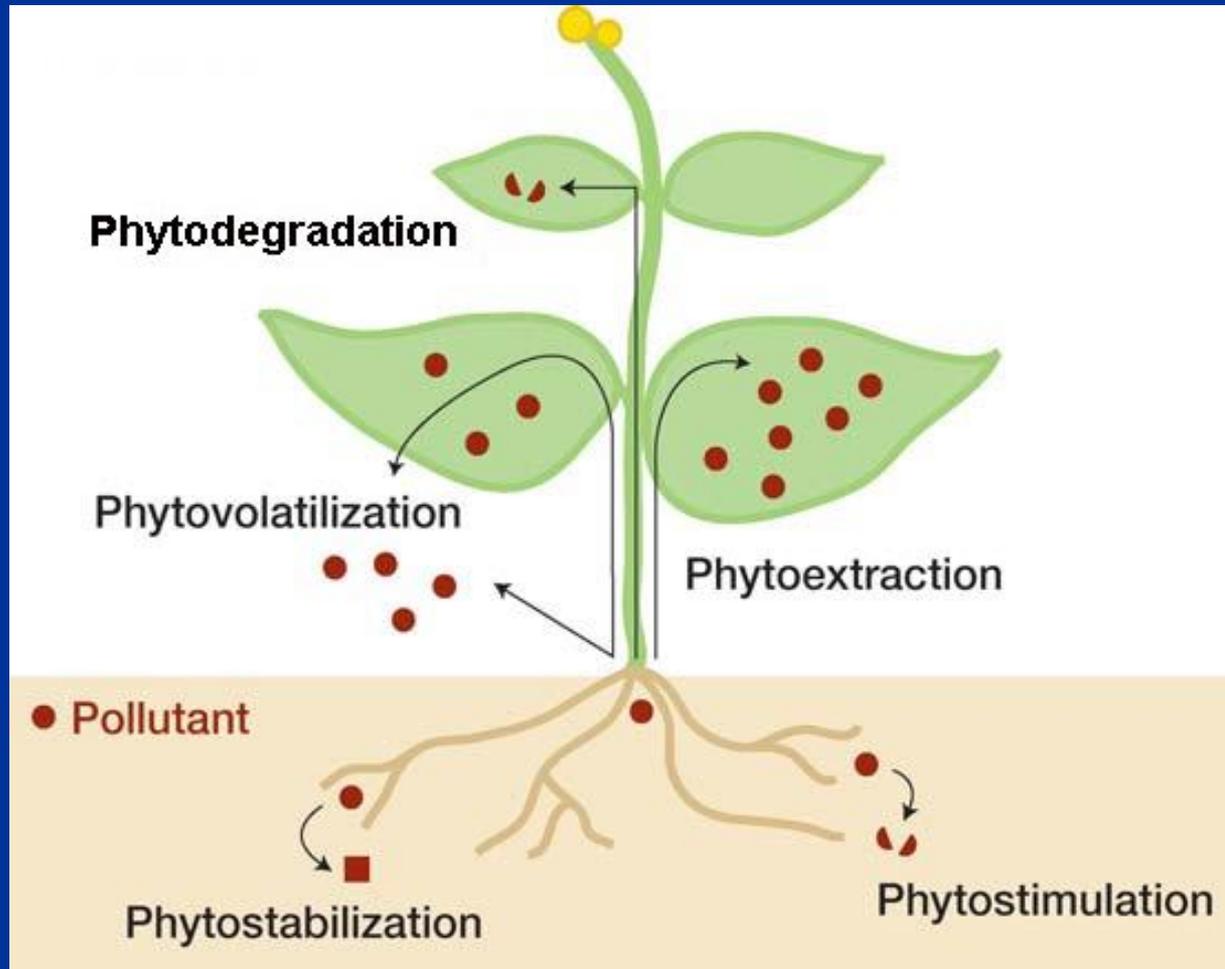


ДЕГРАДАЦИЯ  
ТОКСИЧНЫХ  
ОРГАНИЧЕСКИХ  
СОЕДИНЕНИЙ

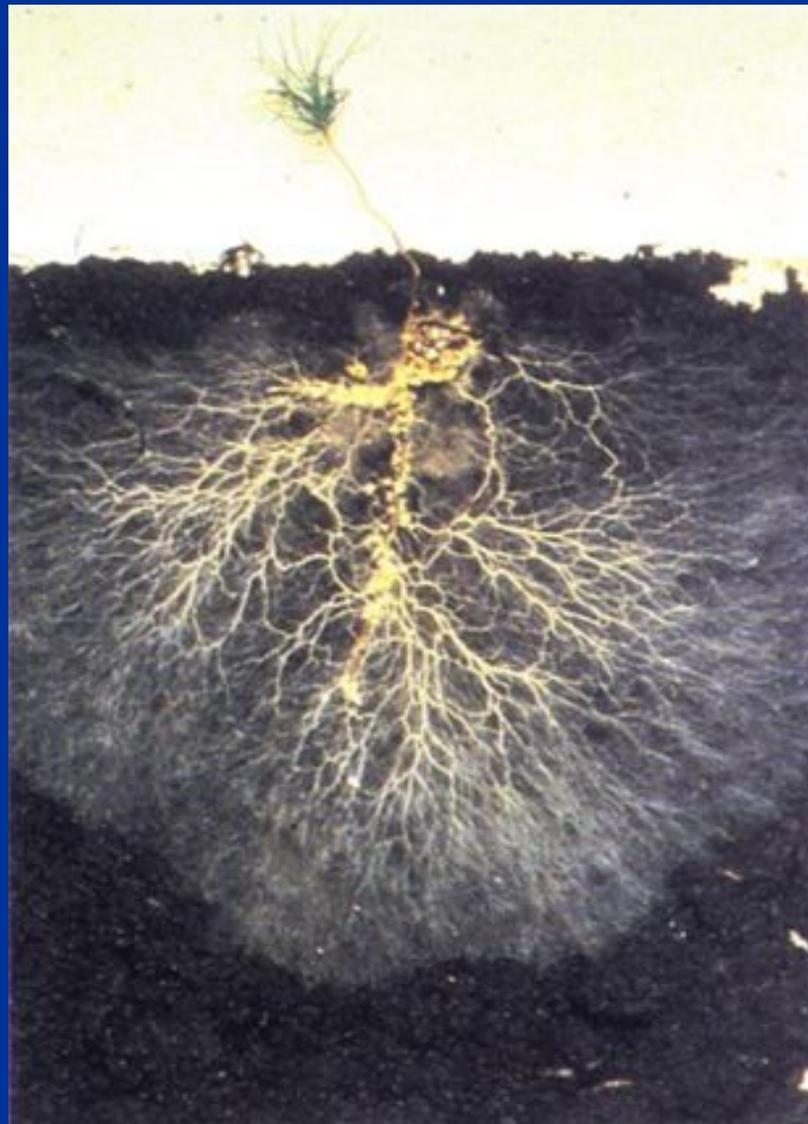
# Растительно-микробные взаимодействия в ризосфере



# Возможные превращения полютантов в процессе фиторемедиации



By E. Pilon-Smits,  
2004



The plant rhizosphere.

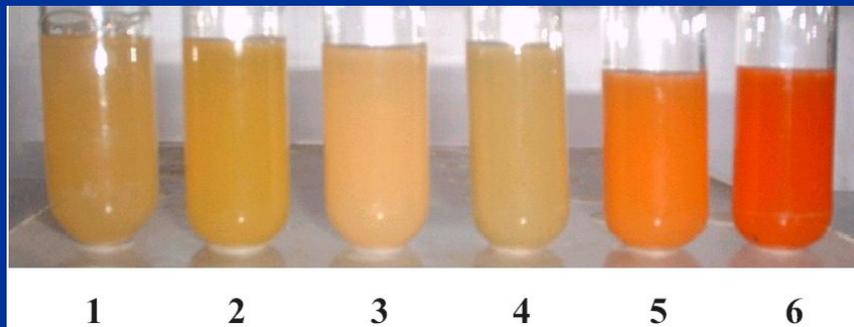
Reprinted with permission from

<http://www.nativeplantsalliance.net/graphics/>

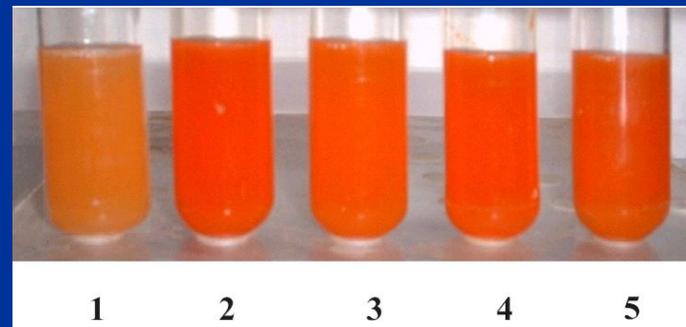


# Плазмиды, контролирующие биodeградацию нафталина

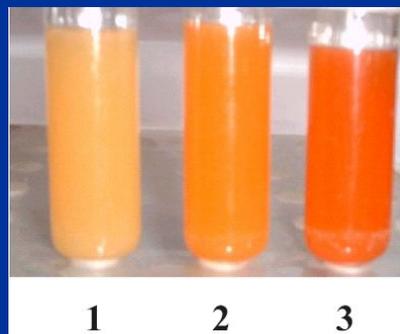
# Плазмиды биодegradации увеличивают количество окси-производных феназина у PGPR *Pseudomonas*



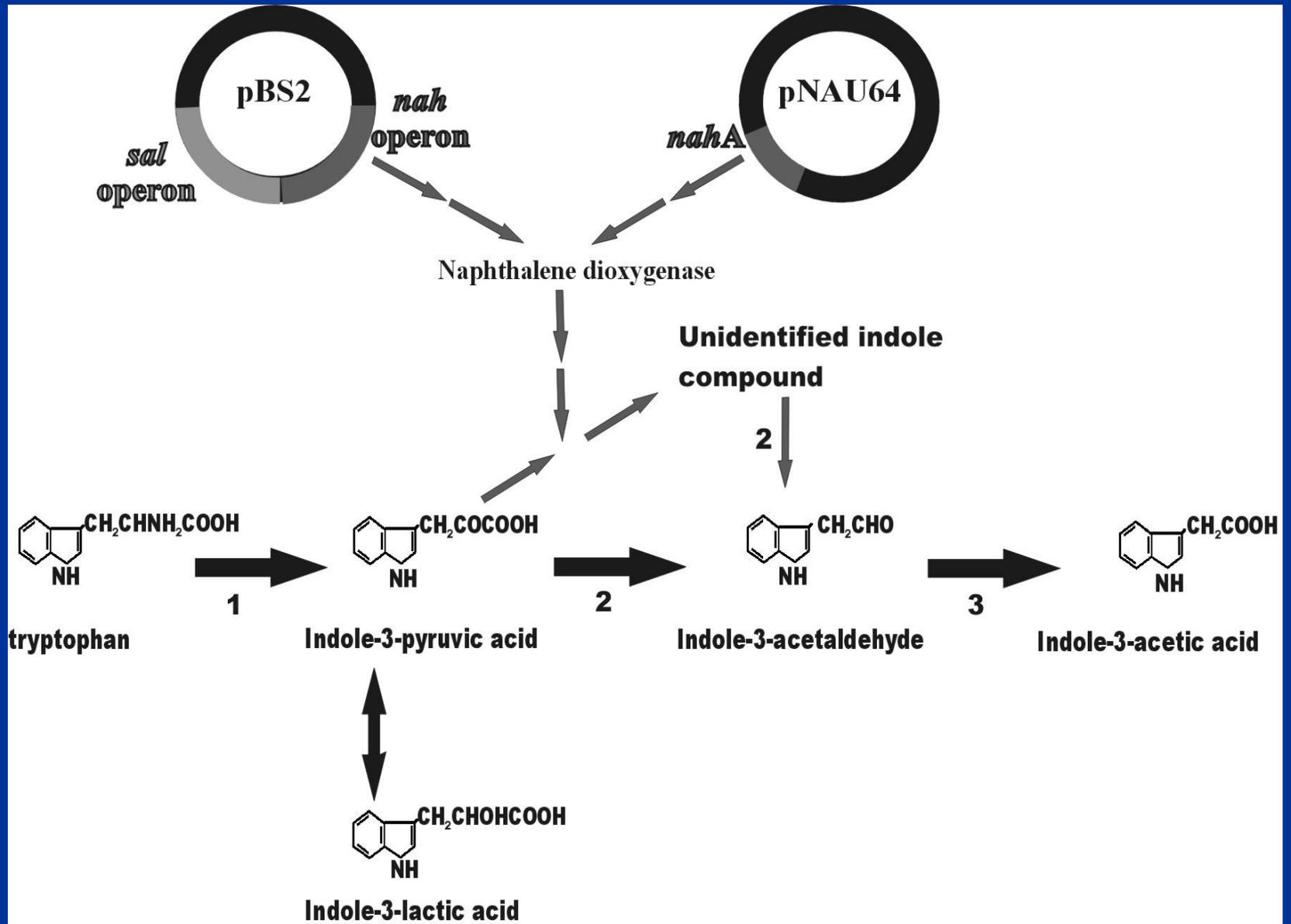
1 – *P. fluorescenc* 2-79, 2 - *P. fluorescenc* 2-79(pBS216)  
3 – *P. chlororaphis* PCL1391, 4 - *P. chlororaphis* PCL1391(pBS216)  
5 – *P. aureofaciens* 1217, *P. aureofaciens* 1217(pBS216)



1 - *P. aureofaciens* BS1393, 2 - *P. aureofaciens* BS1393(NAH7), 3 - *P. aureofaciens* BS1393(pBS216),  
4 - *P. aureofaciens* BS1393(pBS3), 5 - *P. aureofaciens* BS1393(SAL)



1 – plasmid less variant of the *P. aureofaciens* strain OV17,  
2 - *P. aureofaciens* OV17(pOV17),  
3 - *P. aureofaciens* OV17(pBS216)

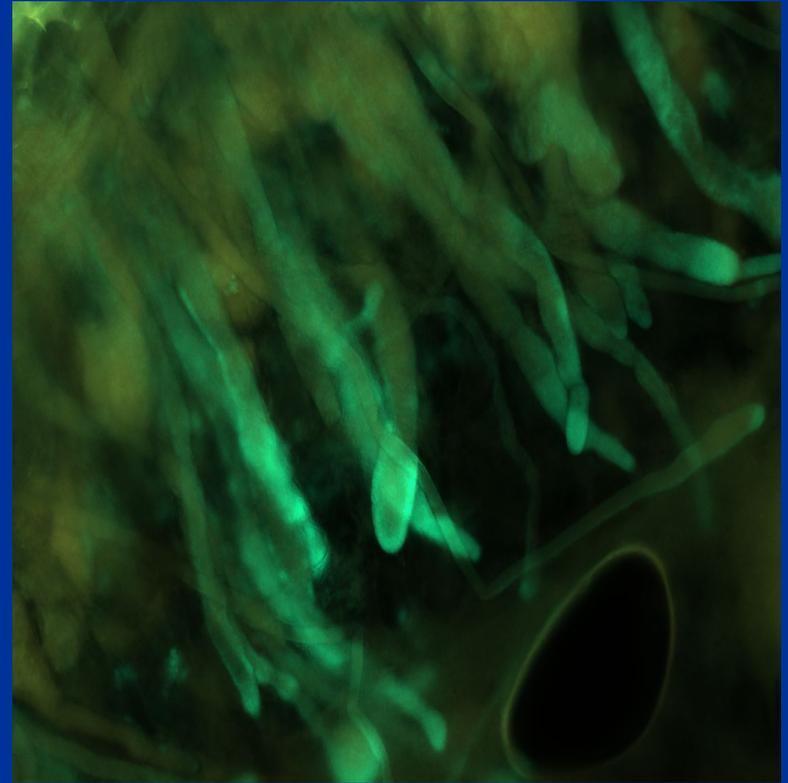
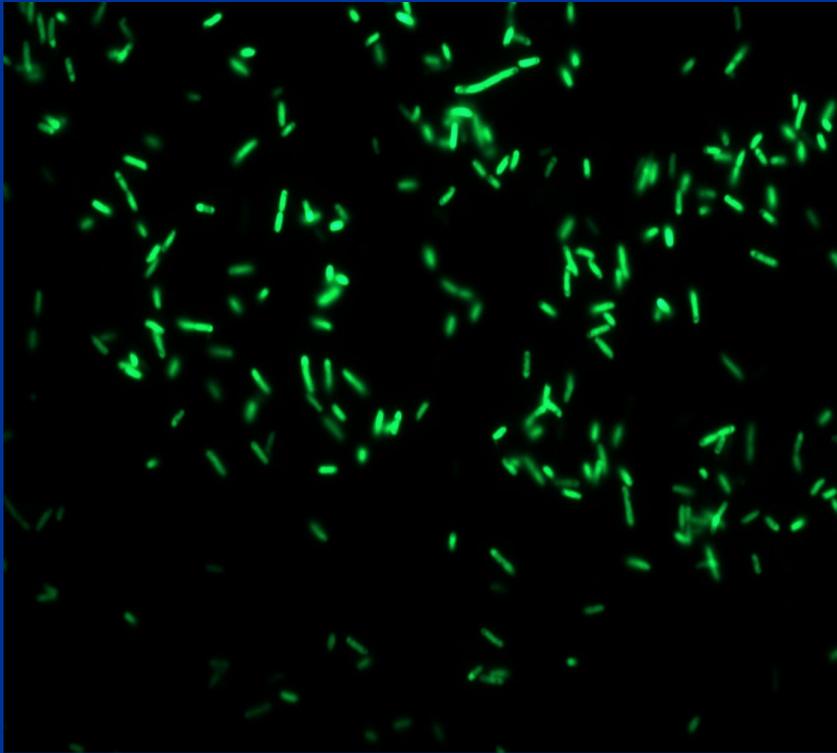


Involvement of naphthalene dioxygenase in the biosynthesis of indole-3-acetic acid by *Pseudomonas putida*

# Microclonal tobacco plants colonized by various *Pseudomonas* bacteria on the Murashige & Skoog with naphthalene (1mg/ml)



1. - not colonized plant (control);
2. - *P. aureofaciens* B-2188 Д;
3. - *P. aureofaciens* B-2188 Д (pBS216);
4. - *P. aureofaciens* B-2188 Д (pNF142::TnMod-OTc);
5. - *P. aureofaciens* B-2188 Д (pOV17)



Колонизация корней растений табака  
штаммом *P. aureofaciens* BS1393::*gfp*.

1 – отдельные клетки под люминесцентным микроскопом;

2 - корневые волоски растений табака, через месяц после колонизации.



# Штаммы и плазмиды, использованные при конструировании мультифункциональных PGPR

**Phz<sup>+</sup>** - strain produces phenazine-type antibiotics;

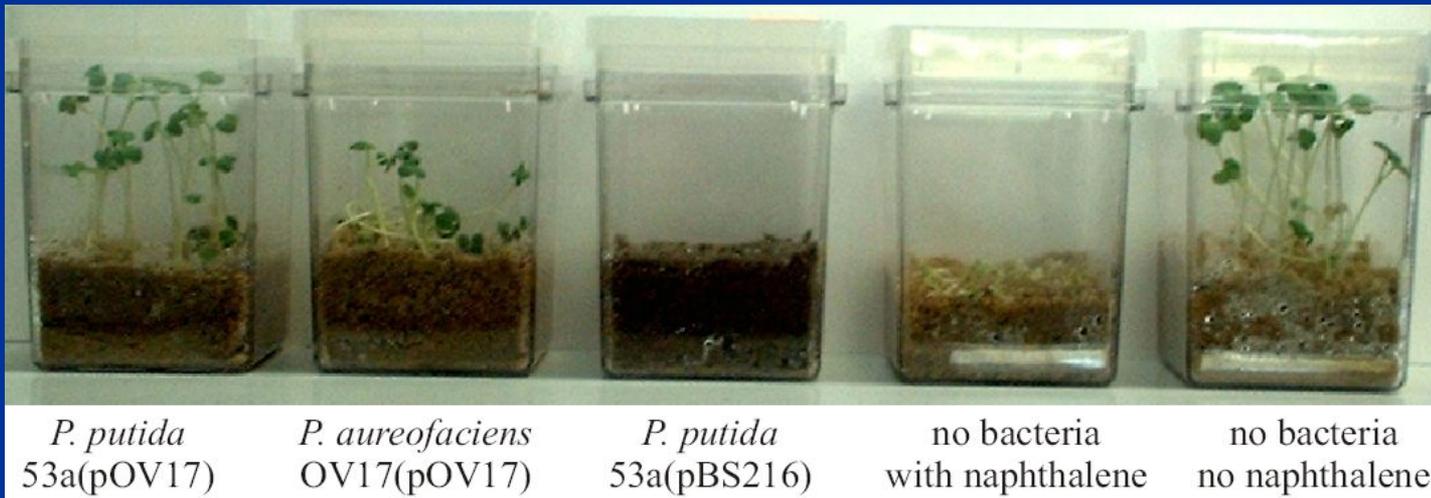
**PCA**—phenazine-1-carboxylic acid; **2-OH-PCA**— 2-hydroxy-phenazine-1-carboxylic acid;

**2-OH-PHZ** – 2-hydroxy-phenazine; **PCN** – phenazine-1-carboxamide;

**2,4-DAPG** - 2, 4-diacetylphloroglucinol;

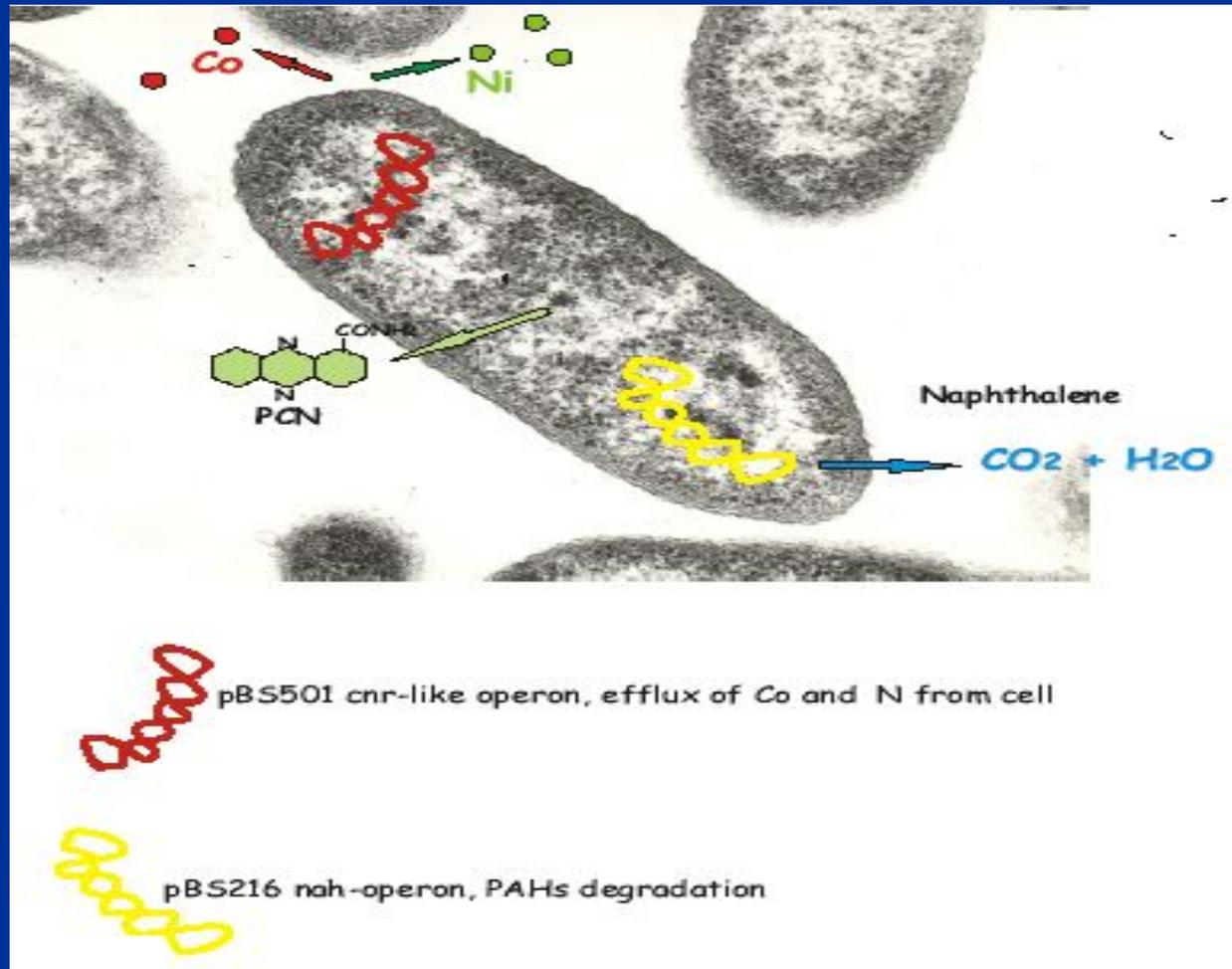
**Phe<sup>+</sup> Nah<sup>+</sup> Sal<sup>+</sup>** - ability to grow on phenanthrene, naphthalene, salicylate

# Взаимодействие ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* с растениями индийской горчицы (*Brassica juncea* L.) в гнотобиотической системе с нафталином



- Стерильные проростки горчицы инокулировали перед посадкой штаммами *P. putida* 53a(pOV17), 53a(pBS216) и *P. aureofaciens* OV17(pOV17). Неинокулированные проростки служили контролем.
- Растения культивировали в гнотобиотических условиях: стерильный песок + среда Murashiga&Skoog с добавлением нафталина (200 мкг/г), влажность около 10%.
- Штамм *P. putida* 53a(pBS216) продуцировал неидентифицированные интермедиаты окисления нафталина, которые ингибировали рост самого штамма и оказывали фитотоксический эффект на растения горчицы.

# Конструирование штамма PGPR *P. chlororaphis* PCL1391 (pBS216, pBS501), способного к деградации ПАУ и устойчивого к тяжелым металлам

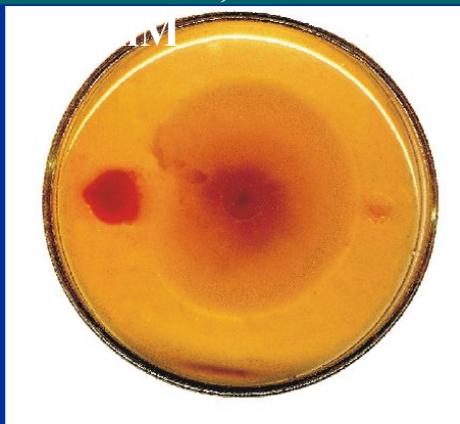


# Ингибирование фитопатогенных грибов ризосферными бактериями в присутствии тяжелых металлов

Co<sup>2+</sup> 0,5

Ni<sup>2+</sup> 0,5

BS1393  
(pBS501)



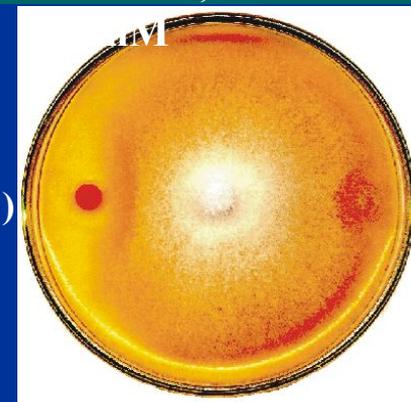
BS1393

Control



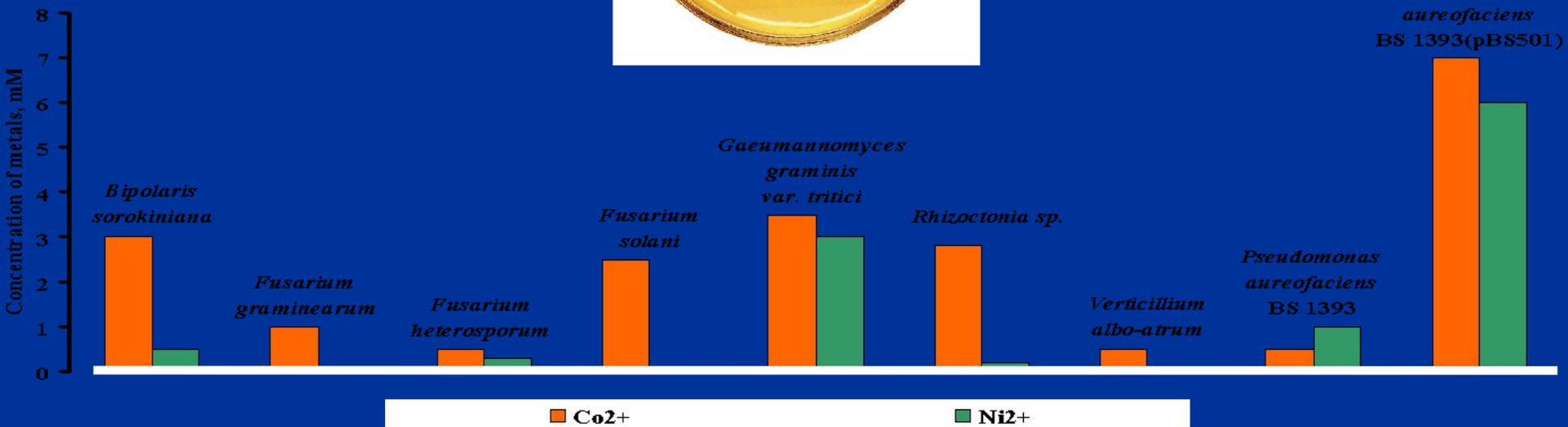
BS1393  
(pBS501)

BS1393



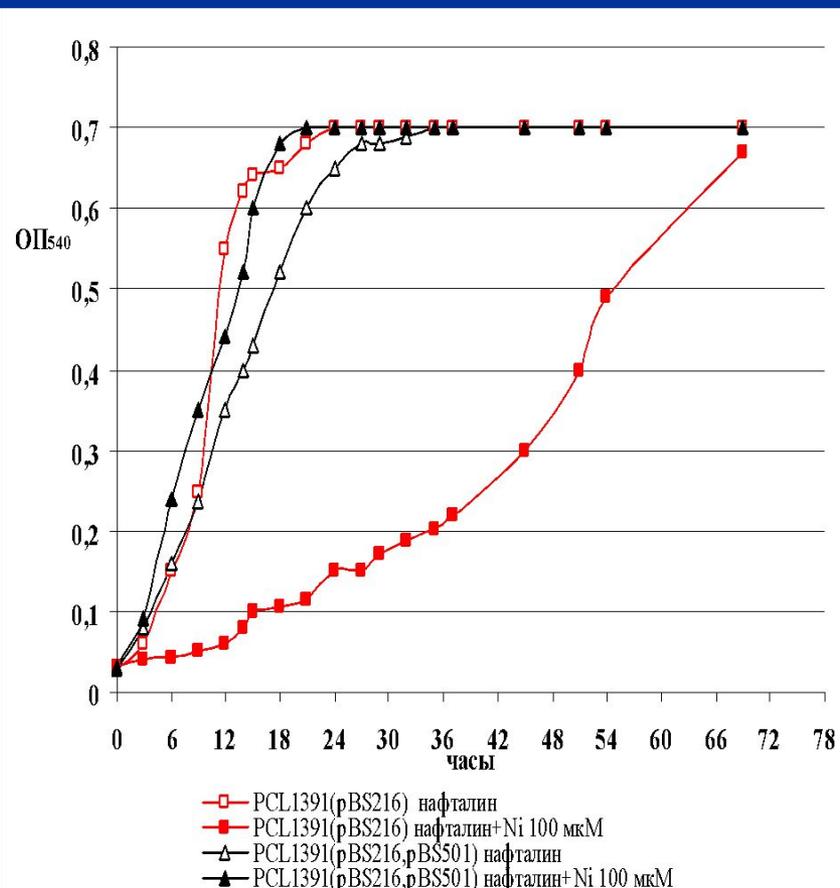
BS1393  
(pBS501)

BS1393

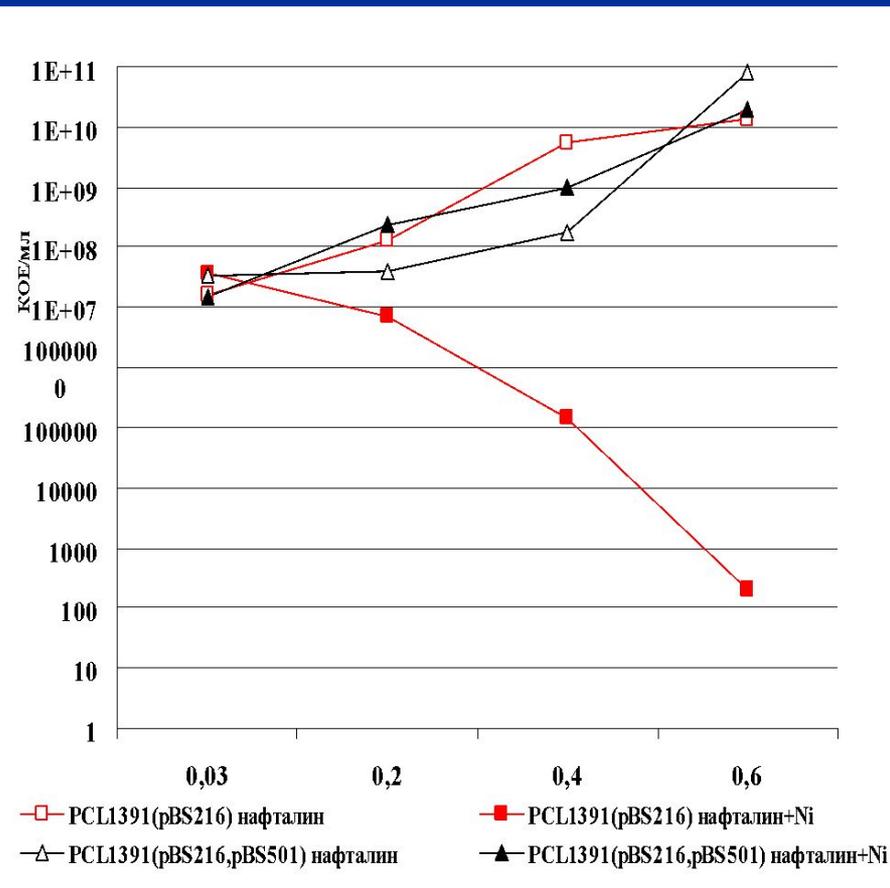


# Рост различных плазмидосодержащих вариантов штамма *P. chlororaphis* PCL1391 на жидкой синтетической среде с нафталином и на среде с нафталином и никелем (100мкМ)

А) OD



Б) CFU

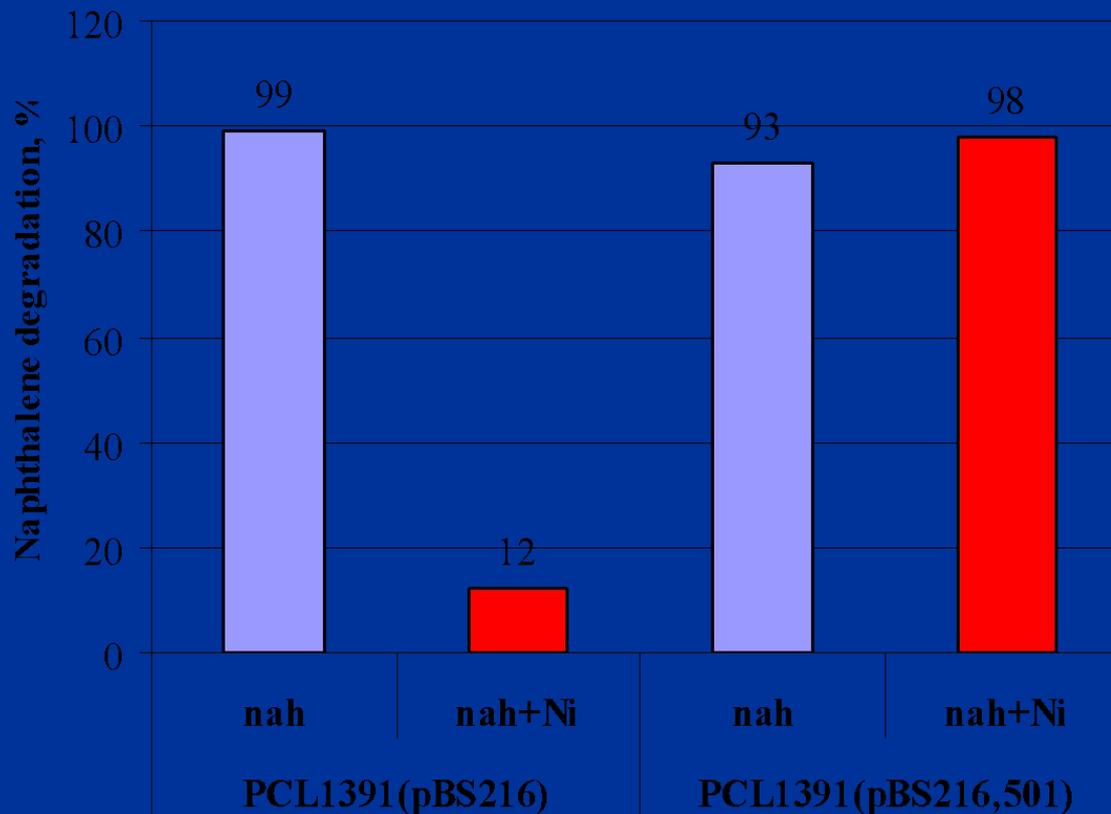


Влияние чувствительных и устойчивых к никелю ризосферных штаммов-деструкторов ПАУ на рост сорго в почве, загрязненной ПАУ и никелем

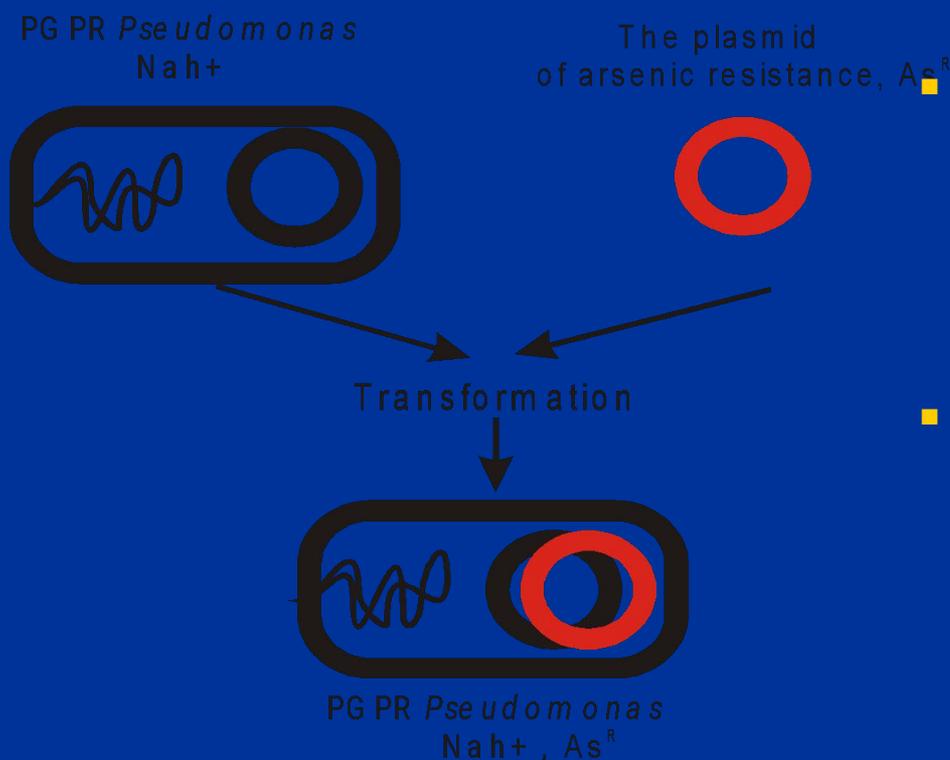


- 1 – no bacteria, PAHs+Ni; 2 – no bacteria, clean soil;  
3 – PCL1391(pBS216), clean soil; 4 - PCL1391(pBS216,pBS501), clean soil;  
5 - PCL1391(pBS216), PAHs+Ni; 6 - PCL1391(pBS216,pBS501), PAHs+Ni

Деградация нафталина мультифункциональным штаммом *P. chlororaphis* PCL1391 (pBS216, pBS501) в присутствии никеля (100 мкМ)

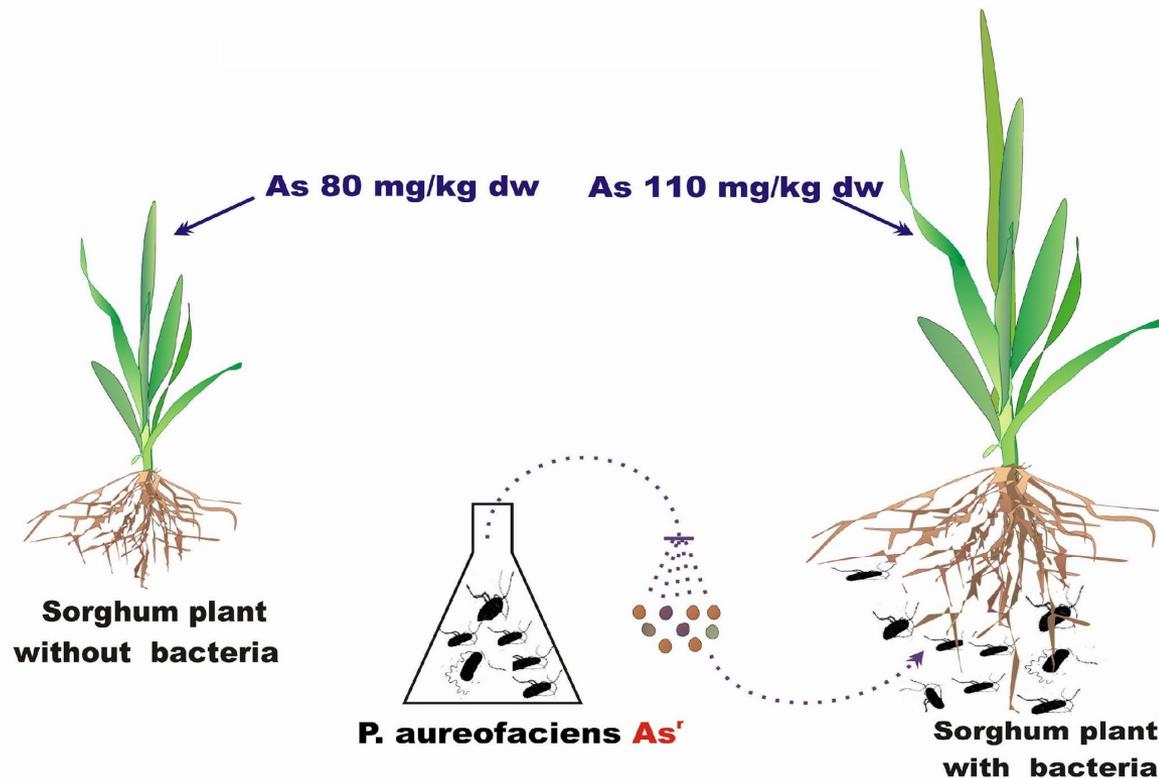


# Конструирование рекомбинантных штаммов PGPR *Pseudomonas* – деструкторов ПАУ и устойчивых к соединениям мышьяка

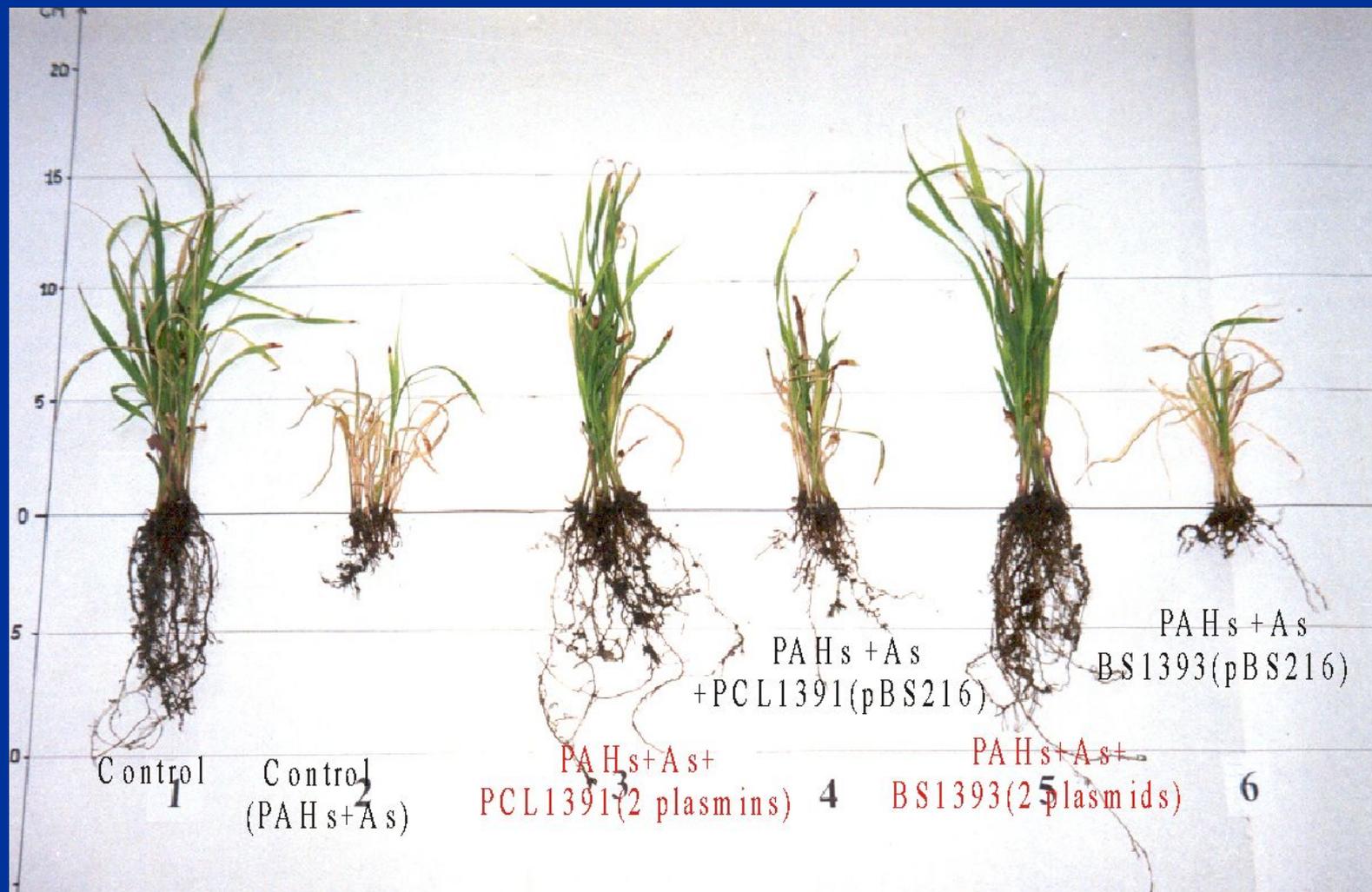


- Реципиенты – полученные ранее штаммы *P. aureofaciens* BS1393 и *P. chlororaphis* PCL1391 с плазмидой биodeградации нафталина pBS216
- Для трансформации реципиентов использовали рекомбинантную плазмиду pUCP22::arsRBC. Плазмида содержит оперон резистентности к мышьяку *arsRBC*, клонированный из *P. aeruginosa* PAO1
- В результате трансформации получены рекомбинантные штаммы *P. aureofaciens* BS1393 и *P. chlororaphis* PCL1391 с двумя плазмидами pBS216 и pUCP22::arsRBC

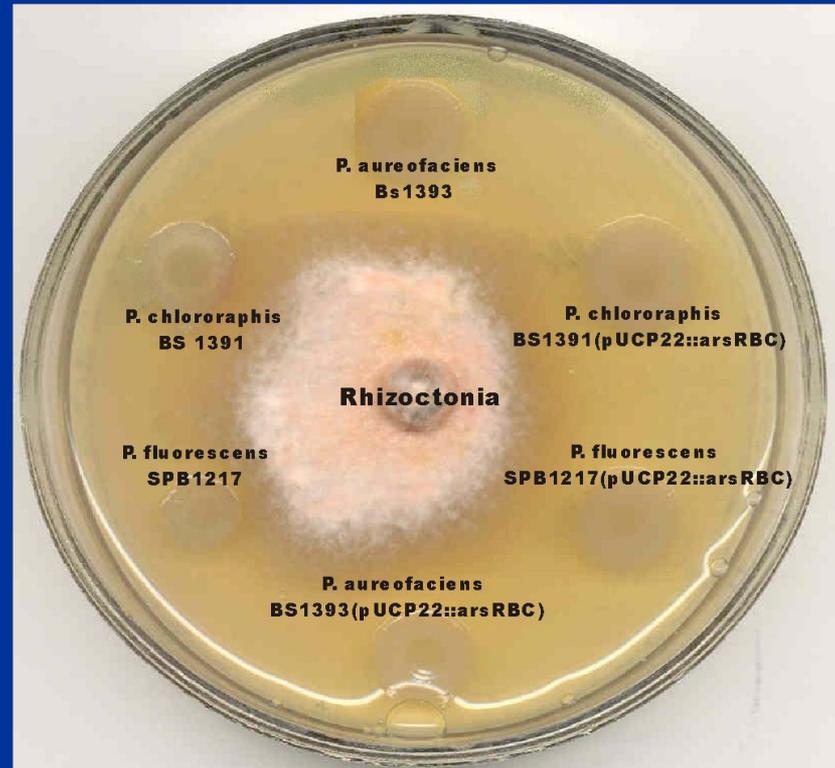
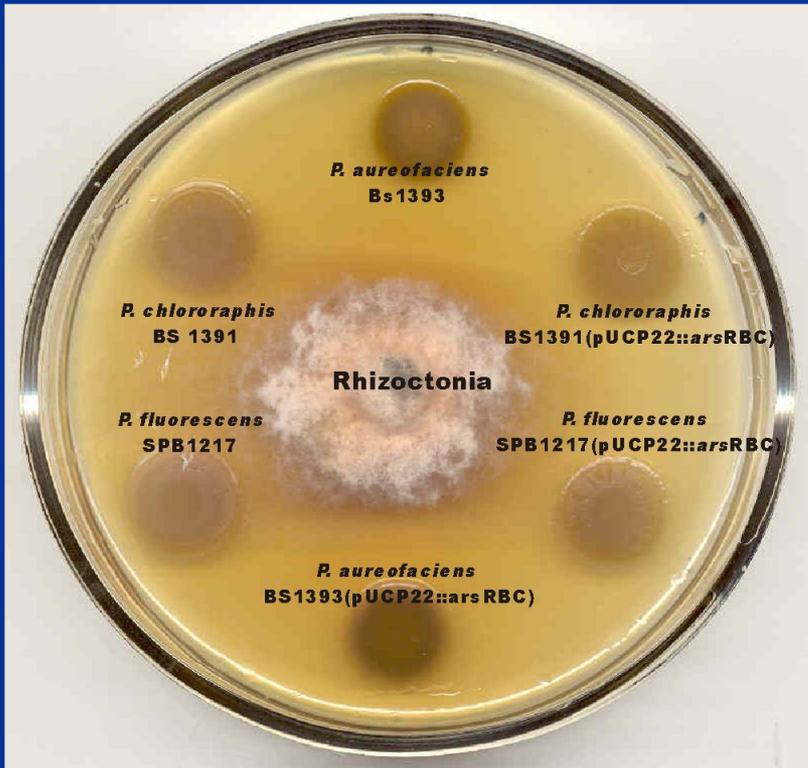
# Использование PGPR *Pseudomonas* в фиторемедиации почв, загрязненных мышьяком



Влияние различных штаммов PGPR *Pseudomonas*, устойчивых и чувствительных к мышьяку, на рост сорго в условиях загрязнения почв ПАУ и мышьяком



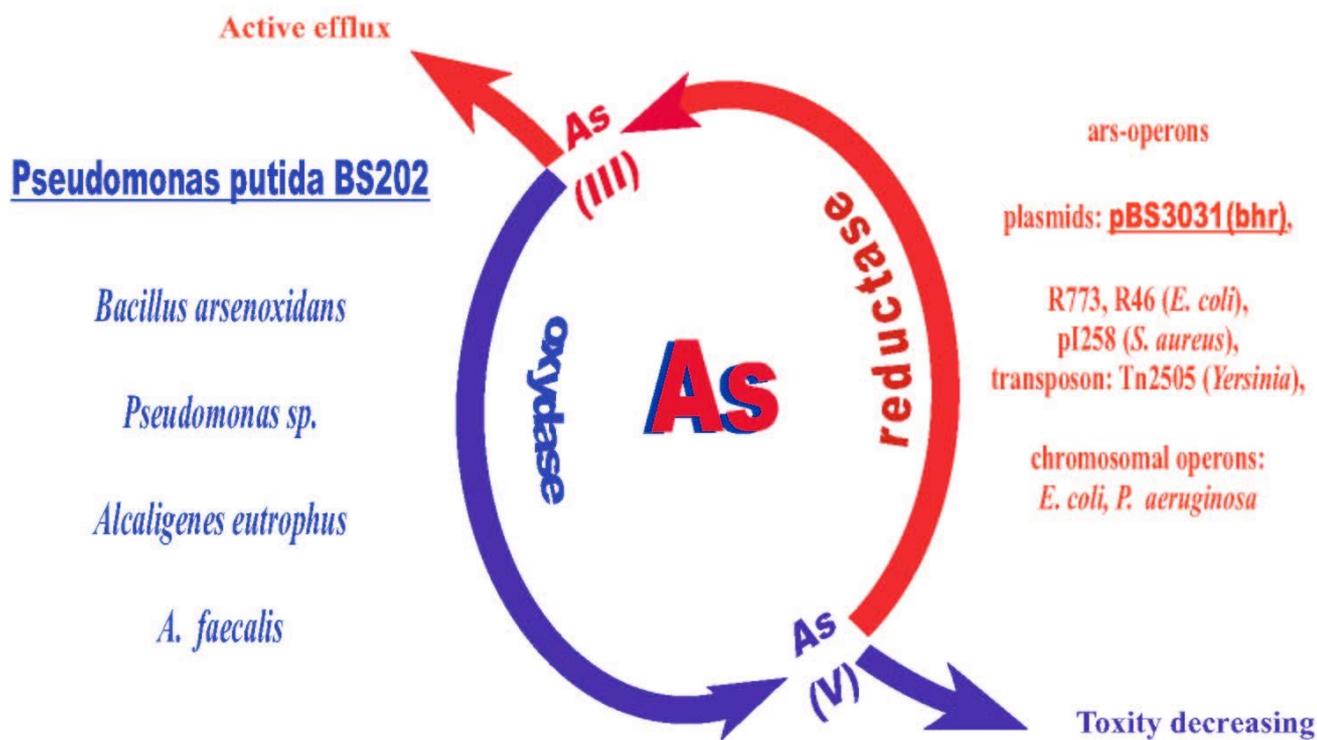
# Плазмиды резистентности к мышьяку не изменяют супрессивных свойств **PGPR Pseudomonas**



- Супрессия *in vitro* фитопатогенных грибов *Rhizoctonia solani* плазмидосодержащими штаммами PGPR *Pseudomonas*
- Слева- среда без мышьяка;
- Справа – концентрация мышьяка 500 мкг/мл



# Механизмы устойчивости к мышьяку у микроорганизмов



# ПОЛЕВЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО ОПТИМИЗАЦИИ ФИТОРЕМЕДИАЦИИ НА ЮГЕ РОССИИ

Краснодарский лесхоз;  
ИБФМ РАН

