

УДК 579.67:581.1

М. Дарказанли, И. С. Киселева

Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,  
620078, Россия, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19,  
mdarkazanli@urfu.ru

## НОВЫЕ ПРОТОКОЛЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ ДЛЯ ИЗОЛЯЦИИ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ РАСТЕНИЙ (БОБЫ ЧЕРНЫЕ, ГОРОХ И ЯЧМЕНЬ)

**Ключевые слова:** стерилизация, спирт этиловый, гипохлорит натрия, эндофитные бактерии, культурные растения.

Растения вступают в мутуалистические взаимоотношения с разнообразными видами микроорганизмов. В таких растительно-микробных ассоциациях эндофитные бактерии занимают особое место. Эндофиты играют важную роль для растений-хозяев, продуцируя вещества, которые могут улучшать рост растений, например, фитогормоны, такие как ауксины, цитокинины и гиббереллины, а также вторичные метаболиты, что позволяет растениям проявлять устойчивость к фитофагам, засухе, паразитам, растворять почвенный фосфат и т.д. [1]. Эндофитные бактерии могут повышать устойчивость к болезнетворным микроорганизмам, потребляя ограниченное количество питательных веществ и производя антибиотики [2]. Существует много исследований, которые изучают эндофитные бактерии и их связь с растениями, но до сих пор взаимодействие между ними не до конца ясно [3].

Семена культурных растений (*Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* и *Hordeum vulgare*) были приобретены в Уральском НИИСХ. Растения выращивали в почве при 25°C, в условиях смешанного освещения (дневной + искусственный). Для выделения эндофитных бактерий сформированные зеленые листья были собраны у 20-дневных нормальных растений без сухих листьев, болезней и насекомых-вредителей.

Для стерилизации и выделения эндофитных бактерий из растительной ткани [4], были использованы разные стерилизующие агенты (таблица):

Таблица

Схема стерилизации

Стерилизующий агент	Продолжительность
70% этанол (E)	1 мин
2% гипохлорит натрия (S)	2 мин
0,2% хлорида ртути (M)	30 сек
70% этанол + 2% гипохлорит натрия (E + S)	Этанол в течение 1 мин + гипохлорит натрия в течение 2 мин
70% этанол + 0,2% хлорид ртути (E + M)	Этанол в течение 1 мин + хлорид ртути в течение 30 с
70% этанол + 2% гипохлорит натрия + 0,2% хлорид ртути (E + S + M)	Этанол в течение 1 мин + гипохлорит натрия в течение 2 мин + хлорид ртути в течение 30 с

Валидация процедуры поверхностной стерилизации проводилась путем культивирования на питательном агаре аликвоты смывов стерильной воды после промывания листьев от стерилизующих растворов. Питательный агар является общей средой для роста эндофитных бактерий, поэтому для их выделения использовали питательную агаровую среду с нистатином (антимикотиком) в концентрации 30 мкг/мл для подавления роста грибов [5].

Наши результаты показали, что при использовании стерилизующих агентов по отдельности экспланты были загрязнены. Обработка стерилизующими агентами 70% этанол + 2% гипохлорит натрия + 0,2% хлорид ртути (E + S + M) была признана эффективной (рисунок) для поверхностной стерилизации и высокого процента выживания эксплантов листьев *P. vulgaris*. При использовании этой комбинации для *P. sativum*, экспланты погибали. Для этого вида растений лучший эффект показывала смесь 70% этанол + 0,2% хлорид ртути (E + M), поскольку она обладала стерилизационным эффектом и увеличивала процент выживания эксплантов. Для поверхностной стерилизации *H. vulgare* наилучшей комбинацией была смесь 70% этанол + 2% гипохлорит натрия (E + S). Тоже результаты в оптимальных условиях показали отсутствие роста микробов на среде для всех образцов.

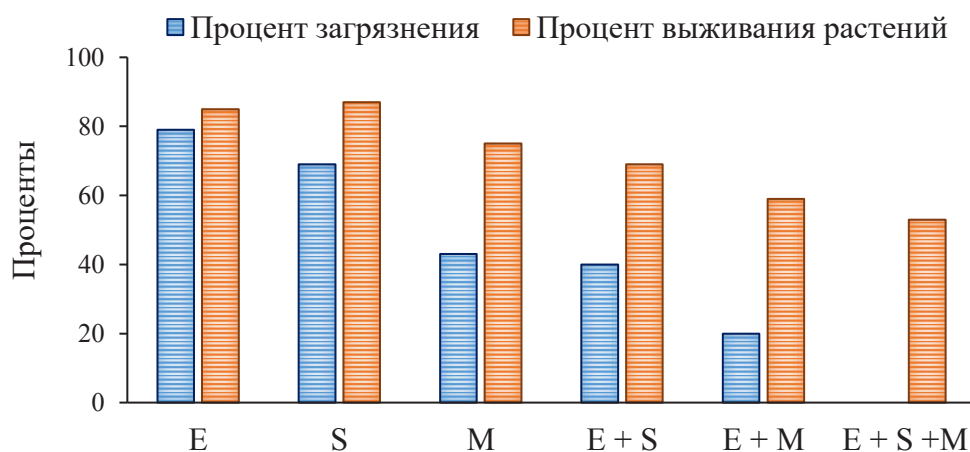


Рисунок. Оптимальные условия для стерилизации поверхности *P. vulgaris*

Результаты показали, что использование таких стерилизующих агентов как 70% этанол (E), 2% гипохлорит натрия (S) и 0,2% хлорид ртути (M) по отдельности не было эффективным. Использование различных комбинаций стерилизующих агентов повышало выживаемость эксплантов на фоне хорошей стерилизации поверхности.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ и ДНТ в рамках научного проекта № 19-516-45006 и Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 02.A03.21.0006.

### Список литературы

1. Sturz A. V., Christie B. R., Matheson B. G., Nowak J. // *Biology and Fertility of Soils*. 1997. Vol. 25. P. 9–13.
2. Faeth S. H., Fagan W. F. // *Integrative and Comparative Biology*. 2002. Vol. 42. P. 360–368.
3. Ulrich K., Ulrich A., Ewald D. // *FEMS Microbiology Ecology*. 2008. Vol. 2. P. 169–180.
4. Anjum N., Chandra R. // *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2015. Vol. 8. P. 233–238.
5. Eevers N. M., Gielen A., Sánchez-López S. et al. // *Microbial Biotechnology*. 2015. Vol. 8. P. 707–715.