



**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*,
УСТОЙЧИВЫХ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ**

Хакимова Л.Р., Каримова Л.Р., Вершинина З.Р.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, Проспект октября 71, E-mail: zilyaver@mail.ru

Резюме

Создана векторная конструкция на основе плазмиды pJN105, несущая ген псевдофитохелатина *pph6*, и получены рекомбинантные по гену *pph6* штаммы ризобий. Инокуляция трансформированными штаммами положительно воздействовала на биомассу растений в условиях токсического воздействия кадмия, несмотря на уменьшение числа клубеньков, образуемых на корнях. Проведенные эксперименты показали, что трансформацию геном *pph6* целесообразно использовать для повышения устойчивости как самих бактерий, так и бобово-ризобиального симбиоза к воздействию кадмия с целью дальнейшего использования для целей фиторемедиации.

Ключевые слова: тяжелые металлы, кадмий, фиторемедиация, *Rhizobium leguminosarum*, ризобии, фитохелатин, псевдофитохелатин

Цитирование: Хакимова Л.Р., Каримова Л.Р., Вершинина З.Р. Получение рекомбинантных *Rhizobium leguminosarum*, устойчивых к тяжелым металлам // Биомика. 2020. Т.12(1). С. 50-56. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-4

© Автор(ы)

RECOMBINANT *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*, RESISTANCE TO HEAVY METALS

Khakimova L.R., Karimova L.R., Vershinina Z.R.

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 71 Prospect Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia, E-mail: zilyaver@mail.ru

Resume

A vector construct based on pJN105 carrying the pseudophytochelatin *pph6* gene was created, and rhizobia strains with *pph6* gene were obtained. Inoculation with transformed strains positively affected the biomass of plants under the conditions of toxic effects of cadmium, despite a decrease in the number of nodules formed on the roots. The experiments showed that it is advisable to use the *pph6* gene transformation to increase the resistance of both rhizobia and legume-rhizobial symbiosis to the effects of cadmium for the purpose of their further use for phytoremediation.

Keywords: heavy metals, cadmium, phytoremediation, *Rhizobium leguminosarum*, rhizobia, phytochelatin, pseudophytochelatin

Citation: Khakimova L.R., Karimova L.R., Vershinina Z.R. Recombinant *Rhizobium leguminosarum*, resistance to heavy metals. *Biomics*. 2020. V.12(1). P. 50-56. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-4

© The Author(s)

Введение

На сегодняшний день чрезвычайно актуален поиск методов и подходов для избавления окружающей среды от экотоллютантов. Фиторемедиация представляет собой устранение, обезвреживание или перевод в менее токсичную форму экотоллютантов с помощью растений. Данный метод достаточно часто применяют в случаях загрязнения почв тяжелыми металлами (ТМ), используя растения-гипераккумуляторы тяжелых металлов для восстановления биологической продуктивности экосистем [Li et al., 2019]. Факторами, которые в наибольшей степени ограничивают эффективность фиторемедиации, являются недостаточное накопление биомассы растениями и низкая доступность тяжелых металлов из почв. Эти проблемы можно решить с помощью бактерий, которые принимают непосредственное участие в биогеохимическом цикле тяжелых металлов и могут в значительной степени увеличить их доступность для растений [Manoj et al., 2020]. При этом если данные бактерии будут обладать ростостимулирующими свойствами, это может повысить устойчивость растений к стрессам, вызванным тяжелыми металлами, и будет способствовать накоплению биомассы. Для фиторемедиации почв достаточно часто используют представителей семейства бобовых, которые вступают в симбиоз с клубеньковыми бактериями (ризобиями), образуя азотфиксирующие клубеньки. Поэтому одной из важнейших задач в фиторемедиации является создание эффективных бобово-ризобиальных систем, где микроорганизмы не только будут способствовать выживанию растений в стрессовых условиях, но и смогут увеличить концентрацию тяжелых металлов в растениях. Стоит отметить, что в литературе много данных, где инокуляция ризобиями существенно снижала накопление в растениях ТМ. Например подобные эксперименты были проведены на вигне с *Bradyrhizobium* sp. RM8 на горохе с *R. leguminosarum* RP5, на нуте с *Mesorhizobium* sp. RC3 [Wani et al., 2007, 2008]. Однако для фиторемедиации необходимо накопление тяжелых металлов в растениях. Такие работы в рамках бобово-ризобиального симбиоза тоже проводились. Так была модифицирована симбиотическая система *Astragalus sinicus* (вика молочная) - *Mesorhizobium huakuii*, где в качестве трансгенов использовались металлотионеин и фитохелатинсинтаза. В этой работе были получены положительные результаты по накоплению кадмия в растениях [Sriprang et al., 2002; Sriprang et al., 2003; Ike et al., 2007].

Известно, что при воздействии тяжелых металлов на растения начинают синтезироваться особые небольшого размера пептиды, которые выполняют строго определенные функции, связывая ионы металлов и транспортируя их к месту назначения. Одними из таких металлсвязывающих пептидов являются фитохелатины. Первичная структура фитохелатинов представляет собой небольшой, богатый цистеином пептид, способный связывать ионы тяжелых металлов через SH-группы. Кроме того фитохелатины характеризуются наличием γ -пептидной связи, что усложняет их биосинтез в клетках. Ранее уже проводились эксперименты с химически синтезированными генами, кодирующими аналоги природных фитохелатинов с α -пептидной связью (псевдофитохелатины), что позволяло им синтезироваться с участием рибосомного аппарата клетки. Детальные эксперименты показали, что эти пептиды связывают различные металлы так же, как и природные фитохелатины и нарабатываются в клетках в большом количестве [Постригань и др., 2012].

Целью данной работы являлось создание векторной конструкции на основе плазмиды pJN105, несущей ген псевдофитохелатина *pph6*; получение рекомбинантных по гену *pph6* штаммов ризобий; оценка устойчивости к Cd^{2+} бактерий, экспрессирующих ген псевдофитохелатина *pph6*; оценка влияния полученных рекомбинантных штаммов на биомассу растений и количество клубеньков, образуемых на корнях клевера белого.

Материалы и методы

В данной работе нас интересовал псевдофитохелатиновый ген, кодирующий пептид Met(α -Глу-Цис) $_6$ Гли. Для конструирования и клонирования данного псевдофитохелатинового гена, названного *pph6*, были химически синтезированы соответствующие комплементарные друг другу олигонуклеотидные блоки: 5'ATGGAATGCGAATGTGAGTGCGAGTGCGAGTGC GAATGTGGCTAA3' и 5'TTAGCCACATTCGCACTCGCACTCGCACTCACA TTCGCAATCCAT3'. После сшивки данных блоков, последовательность была клонирована в вектор pJN105 под управлением промотора T5 (рис. 1).

Далее методом электропорации полученной векторной конструкцией были трансформированы штаммы ризобий из коллекции Института биохимии и генетики УФИЦ РАН: *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* THy1, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* THy2, *R. leguminosarum* VSy3, *R. leguminosarum* VPi106, *R. leguminosarum* VSy12.

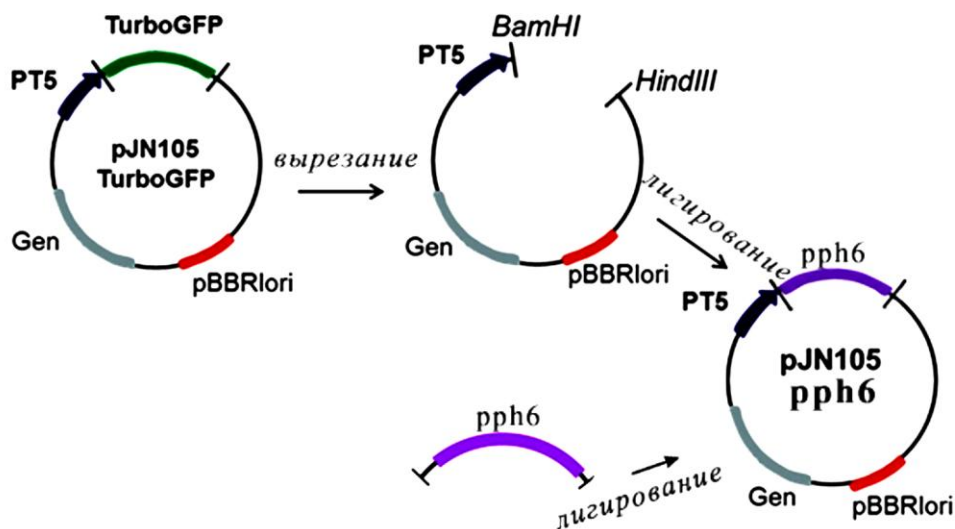


Рисунок 1. Клонирование гена *pph6* в вектор pJN105
Figure 1. Cloning of the *pph6* gene into pJN105 vector

Для идентификации наличия гена в бактериях были использованы праймеры P6F: 5'ATGGAATGCCGAATGTGAGTGCGA3' и P6R: 5'TTAGCCACATTCGCACTCGCACT3'.

Для оценки устойчивости к Cd^{2+} бактерий, экспрессирующих ген псевдофитохелатина *pph6*, трансформированные и контрольные бактерии культивировались в течение недели при 24°C на твердой YM среде (состав в %: маннит – 1, дрожжевой экстракт – 0.04, NaCl – 0.01, MgSO_4 – 0.01 и $\text{K}_2 \text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ – 0.05, агар-агар – 1,5), содержащей разные концентрации Cd^{2+} (0, 100, 200, 300 мкМ) в виде ацетата.

Инокуляция растений клевера белого (*Trifolium repens* L.) бактериями осуществлялась следующим образом. Семена стерилизовали в течение 2 мин в 70%-ном спирте и затем 15 мин в 15%-ном растворе гипохлорита натрия, содержащем несколько капель Tween-20. Затем выращивали в течение 2 нед в стерильном вермикулите в условиях светоплощадки (освещение 5000 Лк, световой день 16 ч). После этого отмытые от вермикулита корни растений обрабатывали штаммами бактерий, которые выращивали до плотности OD_{660} 0.75 при 28°C на жидкой среде YM (без агара). Проростки высаживали в торфяной грунт («Terra Vita», Россия), прогретый в течение 1 ч при 70°C, с добавлением необходимой

концентрации Cd^{2+} (5 или 10 мг/кг грунта) в виде ацетата и культивировали в теплице. Ростовые параметры, и количество клубеньков определяли после роста растений в течение 2 месяцев.

Во всех случаях проводили не менее пяти независимых экспериментов как минимум в пяти повторностях. Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010, доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

Результаты и обсуждение

В целом были получены результаты, показывающие положительное влияние экспрессии гена *pph6* на устойчивость бактерий к воздействию тяжелых металлов. Так бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* THy1, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* THy2, *R. leguminosarum* VPi106, *R. leguminosarum* VSy3 начинали расти на более высоких концентрациях тяжелых металлов, чем контрольные не трансформированные штаммы. Наилучшие результаты по устойчивости были получены для *R. leguminosarum* VSy12 - трансформированный штамм рос при максимальных концентрациях Cd^{2+} , использованных в эксперименте, - 300 мкМ (табл. 1).

Таблица 1

Устойчивость штаммов бактерий к Cd²⁺
Table 1 - Resistance of bacterial strains to Cd²⁺

штамм strain	концентрация Cd ²⁺ Cd ²⁺ concentration			
	0 мкМ	100 мкМ	200 мкМ	300 мкМ
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> THy1	+	±	–	–
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> THy1+p ^{phb}	+	+	±	–
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> THy2	+	±	–	–
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> THy2+p ^{phb}	+	+	±	–
<i>R. leguminosarum</i> VSy3	+	–	–	–
<i>R. leguminosarum</i> VSy3+p ^{phb}	+	±	–	–
<i>R. leguminosarum</i> VPi106	+	±	–	–
<i>R. leguminosarum</i> VPi106+p ^{phb}	+	±	–	–
<i>R. leguminosarum</i> VSy12	+	+	±	–
<i>R. leguminosarum</i> VSy12+p ^{phb}	+	+	+	+

+ рост на твердой среде

± слабый рост на твердой среде

–отсутствие роста на твердой среде

+ active growth on solid medium

± weak growth on a solid medium

–inhibition of growth on solid medium

Ранее проводились эксперименты по трансформации штамма *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei* ВЗ (микросимбионт астрагала) генно-инженерными конструкциями, содержащими либо ген фитохелатинсинтазы из *Arabidopsis thaliana*, либо ген синтетического металлотионеина. Полученные трансформанты накапливали Cd²⁺ до 25 раз больше, чем исходные бактерии. Однако рекомбинантные штаммы не проверялись в экстремально высоких концентрациях Cd²⁺, возможно из-за использования промотора гена *nifH*, который является клубенекспецифичным. Самая высокая используемая в работе концентрация была 50 мкМ [Sriprang et al., 2003; Ike et al., 2007].

Инокуляция ризобияльными штаммами положительно воздействовала на биомассу растений как в случае контрольных, так и трансформированных штаммов (табл. 2). Так бактерии увеличивали в среднем на 50% сырую биомассу растений. Воздействие кадмия снижало биомассу на 40% при концентрации 5 мг/кг Cd²⁺ и на 66% при 10 мг/кг Cd²⁺ в грунте. Однако инокуляция

ризобиями позволяла преодолевать токсическое действие кадмия. Так при воздействии исходных штаммов бактерий снижение биомассы составляло в среднем 27% в случае 5 мг/кг Cd²⁺ и 57,6% при 10 мг/кг Cd²⁺ в грунте. Лучшие результаты были получены для штаммов *R. leguminosarum* bv. *trifolii* THy1 и *R. leguminosarum* VSy12. Однако наиболее эффективными оказались трансформированные штаммы: снижение биомассы составило в среднем 4,4% при 5 мг/кг Cd²⁺ и 38,6% при 10 мг/кг Cd²⁺ в грунте. Лучше всех проявил себя *R. leguminosarum* bv. *trifolii* THy1. Полученные результаты вероятно объясняются накоплением тяжелого металла в бактериях или переводом его в менее токсичную для растений форму. Ранее проводились исследования, посвященные положительному воздействию *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 на растения клевера белого в почвах, загрязненных кадмием, однако использованные концентрации ТМ были намного ниже, чем в данной работе [Young et al., 2019].

Таблица 2

Ростовые параметры растений и количество клубеньков после инокуляции бактериями в присутствии Cd²⁺Table 2 - Plant biomass and number of nodules with Cd²⁺ exposure

Концентрация кадмия Cd ²⁺ Cd ²⁺ concentration	0 мг/кг 0 mg/kg		5 мг/кг 5 mg/kg		10 мг/кг 10 mg/kg	
	Сырая биомасса растений, г Total fresh biomass, g	Количество клубеньков Number of nodules	Сырая биомасса растений, г Total fresh biomass, g	Количество клубеньков Number of nodules	Сырая биомасса растений, г Total fresh biomass, g	Количество клубеньков Number of nodules
штамм strain						
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> THy1	0,79±0,07	148±12	0,61±0,05	93±7	0,40±0,06	14±3
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> THy1+p $ph6$	0,72±0,05	152±10	0,72±0,04	71±8	0,54±0,04	12±4
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> THy2	0,75±0,04	134±16	0,55±0,07	102±5	0,35±0,08	10±6
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> THy2+p $ph6$	0,72±0,08	145±8	0,68±0,04	84±7	0,44±0,08	12±6
<i>R. leguminosarum</i> VSy3	0,91±0,06	164±11	0,70±0,06	107±15	0,38±0,06	18±4
<i>R. leguminosarum</i> VSy3+p $ph6$	0,88±0,05	158±9	0,82±0,05	84±5	0,56±0,07	12±7
<i>R. leguminosarum</i> VPi106	0,79±0,07	152±15	0,49±0,06	95±8	0,32±0,05	8±6
<i>R. leguminosarum</i> VPi106+p $ph6$	0,74±0,06	149±12	0,64±0,04	81±5	0,46±0,06	11±3
<i>R. leguminosarum</i> VSy12	0,89±0,06	172±13	0,71±0,04	112±7	0,31±0,05	10±6
<i>R. leguminosarum</i> VSy12+p $ph6$	0,85±0,07	164±18	0,82±0,06	95±8	0,46±0,07	12±4
Без бактерий Without bacteria	0,54±0,05	5±1	0,32±0,07	2±1	0,18±0,05	2±1

Воздействие концентрации кадмия 5 мг/кг в среднем уменьшало количество образуемых на растениях клубеньков в случае исходных штаммов на 35,6%, а в случае трансформированных — на 50%. При этом вирулентность обеих групп штаммов изначально была одинаковой (без воздействия кадмия) (табл. 2). Полученный результат вероятно объясняется тем, что накопление кадмия внутри клеток бактерий ингибирует процесс клубенкообразования. При высокой концентрации кадмия - 10 мг/кг - происходит ингибирование образования клубеньков во всех экспериментах практически одинаково - в среднем на 92,4%. Подобное негативное влияние тяжелых металлов на процессы клубенкообразования описано для многих бобовых растений, в том числе для клевера белого, что фактически является биоиндикатором, позволяющим оценивать уровень загрязнения почв тяжелыми металлами [Manier et al., 2009].

Проведенные эксперименты показали, что трансформацию геном *p $ph6$* целесообразно

использовать для повышения устойчивости ризобий к воздействию кадмия. При этом трансформированные штаммы способствуют накоплению биомассы растений в загрязненных почвах, несмотря на некоторое снижение клубенкообразующей активности по сравнению с исходными штаммами. В дальнейшем планируются исследования по оценке накопления кадмия растениями и нитрогеназной активности клубеньков.

Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований №18-34-00033 мол_a.

Литература

1. Постригань Б.Н., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Яхин О.И., Чемерис А.В. Активность синтетического псевдофитохелатинового гена в растениях табака // Физиология растений. 2012. Т. 59(2). Р. 303-308.

2. Ike A., Sriprang R., Ono H., Murooka Y., Yamashita M. Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobia with the *MTL4* and the *PCS* genes // *Chemosphere*. 2007. V. 66(9). P. 1670-1676. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.07.058
3. Li C., Ji X., Luo X. Phytoremediation of Heavy Metal Pollution: A Bibliometric and Scientometric Analysis from 1989 to 2018 // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019. V. 16(23). P. 4755. doi:10.3390/ijerph16234755
4. Manier N., Deram A., Broos K., Denayer F.O., Van Haluwyn C. White clover nodulation index in heavy metal contaminated soils—a potential bioindicator // *Journal of Environmental Quality*. 2009. V. 38(2). P. 685-692. doi:10.2134/jeq2008.0013
5. Manoj S.R., Karthik C., Kadirvelu K., Arulselvi P.I., Shanmugasundaram T., Bruno B., Rajkumar M. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review // *Journal of Environmental Management*. 2020. V. 254. P. 109779. doi:10.1016/j.jenvman.2019.109779
6. Sriprang R., Hayashi M., Ono H., Takagi M., Hirata K., Murooka Y. Enhanced accumulation of Cd²⁺ by a Mesorhizobium sp. transformed with a gene from Arabidopsis thaliana coding for phytochelatin synthase // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69(3). P. 1791–1796. doi:10.1128/AEM.69.3.1791-1796.2003
7. Sriprang R., Hayashi M., Yamashita M., Ono H., Saeki K., Murooka Y. A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia // *J. Biotechnol.* 2002. V. 99(3). P. 279–293. doi:10.1016/S0168-1656(02)00219-5
8. Wani P.A., Khan M.S., Zaidi A. Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants // *Chemosphere*. 2007. V. 70(1). P. 36–45. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.07.028
9. Wani P.A., Khan M.S., Zaidi A. Chromium-reducing and plant growth-promoting *Mesorhizobium* improves chickpea growth in chromium-amended soil // *Biotechnology letters*. 2008. V. 30(1). P. 159-163. doi:10.1007/s10529-007-9515-2
10. Young S.D., van Koten C., Gray C.W., Cavanagh J.A.E., Wakelin S.A. Symbiosis between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain TA1 and a white clover cultivar benefits clover tolerance to cadmium toxicity // *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 2019. P. 1-12. doi:10.1080/00288233.2019.1680394

References

1. Ike A., Sriprang R., Ono H., Murooka Y., Yamashita M. Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobia with the *MTL4* and the *PCS* genes. *Chemosphere*. 2007. V. 66(9). P. 1670-1676. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.07.058
2. Li C., Ji X., Luo X. Phytoremediation of Heavy Metal Pollution: A Bibliometric and Scientometric Analysis from 1989 to 2018 // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019. V. 16(23). P. 4755. doi:10.3390/ijerph16234755
3. Manier N., Deram A., Broos K., Denayer F.O., Van Haluwyn C. White clover nodulation index in heavy metal contaminated soils—a potential bioindicator. *Journal of Environmental Quality*. 2009. V. 38(2). P. 685-692. doi:10.2134/jeq2008.0013
4. Manoj S.R., Karthik C., Kadirvelu K., Arulselvi P.I., Shanmugasundaram T., Bruno B., Rajkumar M. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of Environmental Management*. 2020. V. 254. P. 109779. doi:10.1016/j.jenvman.2019.109779
5. Postrigan B.N., Knyazev A.V., Kuluev B.R., Yakhin O.I., Chemeris A.V. Aktivnost' sinteticheskogo psevdofitohelatinovogo gena v rastenijah tabaka. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2012 V. 59(2). P. 303-308. [Activity of synthetic pseudo-phytochelatin gene in tobacco plants]. (In Russian).
6. Sriprang R., Hayashi M., Ono H., Takagi M., Hirata K., Murooka Y. Enhanced accumulation of Cd²⁺ by a Mesorhizobium sp. transformed with a gene from Arabidopsis thaliana coding for phytochelatin synthase. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69(3). P. 1791–1796. doi:10.1128/AEM.69.3.1791-1796.2003
7. Sriprang R., Hayashi M., Yamashita M., Ono H., Saeki K., Murooka Y. A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. *J. Biotechnol.* 2002. V. 99(3). P. 279–293. doi:10.1016/S0168-1656(02)00219-5
8. Wani P.A., Khan M.S., Zaidi A. Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants. *Chemosphere*. 2007. V. 70(1). P. 36–45. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.07.028
9. Wani P.A., Khan M.S., Zaidi A. Chromium-reducing and plant growth-promoting *Mesorhizobium* improves chickpea growth in chromium-amended

- soil. *Biotechnology Letters*. 2008. V. 30(1). P. 159-163. doi:10.1007/s10529-007-9515-2
10. Young S.D., van Koten C., Gray C.W., Cavanagh J.A.E., Wakelin S.A. Symbiosis between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain TA1 and a white clover cultivar benefits clover tolerance to cadmium toxicity. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 2019. P. 1-12. doi:10.1080/00288233.2019.1680394