

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АССОЦИАТИВНЫХ РИЗОБАКТЕРИЙ

Артамонова М.Н., Алексеева А.С., Потатуркина-Нестерова Н.И.

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск,

e-mail: artamonovamn2013@yandex.ru

В ходе исследования выделены микробы – ассоцианты семейств Cucurbitaceae и Lamiaceae. Проведено сравнительное исследование по изучению антагонистического действия микроорганизмов, ассоциированных с растениями, по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам. Установлено, что из выделенных изолятов антагонистический эффект выявлен у таких микроорганизмов, как *Pseudomonas fluorescens* и *Bacillus subtilis*, которые были выделены у представителей изученных семейств. Условно-патогенные и патогенные микроорганизмы (*Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*) проявляют к бактериям-ассоциантам определенную чувствительность, которая выражалась в угнетение роста используемых тест-культур микроорганизмов. Полученные результаты могут стать основой для разработки новых методов борьбы с патогенной микрофлорой растений, имеющих широкое практическое применение. Изученные штаммы ризобактерий могут быть использованы при создании современных биопрепаратов для защиты растений.

Ключевые слова: антагонизм, ризобактерии, бактерии-ассоцианты

THE ANTAGONISTIC ACTIVITY OF ASSOCIATIVE RHIZOBACTERIA

Artamonova M.N., Alekseeva A.S., Potaturkina-Nesterova N.I.

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, e-mail: artamonovamn2013@yandex.ru

It have been isolated microbes-associants of Cucurbitaceae and Lamiaceae families. The comparing research has been realized to study antagonistic effect of microorganisms, which was associated with plants. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was used as test-microorganisms. It has established that antagonistic effect has been explored at *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*, which have been isolated from plants of studied families. Pathogenic and opportunistic bacteria have sensitiveness to associative microbes which was expressed with supression of growth. The results of research would be basis for work out of new methods of struggle with pathogenic microflora of plants which have practical using. The studied stains of rhizobacteria would be using for making of modern biopreparats to defend plants.

Keywords: antagonism, rhizobacteria, bacteria-associants

Микроорганизмы, ассоциированные с растениями, в последние годы стали объектами активных исследований [3]. Устойчивость растений к заболеваниям, вызываемым почвенными фитопатогенами, во многом определяется результатами взаимодействия между корневой системой растений и разнообразными микроорганизмами. Активная секреция клетками корня различных веществ обеспечивает питательными субстратами микроорганизмы, образующие с ним прочные ассоциации как внутри корневых тканей, так и на корневой поверхности (ризоплане), а также в почве, непосредственно окружающей корни (ризосфере). В связи с этим в ризосфере и ризоплане в значительных количествах концентрируются бактерии, актиномицеты, грибы, водоросли и нематоды, существенно превышая количество этих организмов в обычной почве. На поверхности вегетативных подземных органов растений в основном доминируют грамотрицательные бактерии родов *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*, а в ризосфере и ризоплане растений – *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, *Azospirillum* [6, 8].

Наибольший интерес для исследований ассоциативных экосимбиозов с микроорганизмами представляет ризосфера – узкая область почвы вдоль поверхности корней. Поступление и концентрация в ризосфере продуктов метаболизма растений определяет ее высокую энергетическую обеспеченность и формирует специфические экохимические условия для почвенных микроорганизмов. В ризосфере из корней активно поступают сложные смеси легкодоступных органических источников энергии и углерода, что обуславливает ее высокую микробиологическую активность и образование отличающихся от почвенного микробценоза специфических ризосферных микробных сообществ [1]. Разнообразие таких сообществ во многом определяется количественным и качественным составом корневых выделений, зависящим от вида, возраста и условий выращивания растения, а также от влияния комплекса почвенно-климатических факторов. В свою очередь, микробиологическая активность в ризосфере приводит к существенному изменению химических и физических свойств этой зоны и накоплению продуктов жизнедеятельности.

тельности микроорганизмов, биологически активных по отношению к растению. Для изучения взаимодействий растений с полезными формами бактерий в ризосфере продуктивна концепция, согласно которой ризобактерии образуют с растением единую растительно-микробную систему (ассоциацию) с новыми свойствами, детерминированными положительным взаимодействием партнеров [9].

Механизмы положительного влияния ассоциативных ризобактерий можно условно разделить на два типа: 1) прямая или непосредственная стимуляция роста растений за счет синтеза различных метаболитов, полезных для растений; 2) опосредованная стимуляция роста растений за счет вытеснения и подавления развития, почвенных фитопатогенов или микроорганизмов, угнетающих рост растений. Ассоциативная азотфиксация при определенных условиях вносит существенный вклад в обеспечение растений азотом [13]. К важнейшим механизмам взаимодействия в растительно-бактериальных ассоциациях относится продуцирование бактериями фитогормонов (ауксинов, цитокининов и гиббереллинов), витаминов и других биологически активных веществ. Синтез ауксинов ризосферными микроорганизмами в значительной степени определяется составом корневых выделений, содержащих их основной метаболитический предшественник L-триптофан. Многие ризобактерии способны синтезировать цитокинины и гиббереллины. Важную роль в образовании растительно-бактериальных ассоциаций могут играть бактериальные гликопротеины – лектины, которые участвуют в колонизации корней бактериями, а также стимулируют активность растительных ферментов и ростовые процессы [14]. Способность ризосферных бактерий растворять труднодоступные почвенные фосфаты давно рассматривается как важный механизм положительного действия на фосфорное питание растения. Многие бактерии могут повышать доступность фосфатов для растения за счет простого подкисления среды в процессе жизнедеятельности, в частности при утилизации сахаров с образованием органических кислот [10].

Ассоциативные микроорганизмы, выделяющие в процессе роста антибиотические гетерогенные низкомолекулярные вещества, способны при низких концентрациях подавлять активность других микроорганизмов и тем самым влиять на жизнедеятельность растений. *Pseudomonas* способны продуцировать широкий спектр вторичных метаболитов, в том числе антибиотиков. Наиболее хорошо изученными антибиоти-

ками, играющими важную роль в супрессии болезней растений, являются антибиотики группы феназинов, флороглюцинов, пиолитеорин, пирролнитрин и оомицин А [3].

Другим механизмом конкурентных взаимоотношений ассоциативных бактерий с патогенной микрофлорой является их способность обеспечивать себя железом – элементом, необходимым для жизнедеятельности не только бактерий, но и растений. Железо в силу своей нерастворимости труднодоступно. Псевдомонады способны продуцировать желто-зеленые флуоресцирующие водорастворимые пигменты, называемые сидерофорами. Сидерофоры – низкомолекулярные транспортные агенты, продуцируемые микроорганизмами для повышения доступности ионов железа. Общее свойство сидерофоров – способность образовывать с ионами трехвалентного железа шестикоординатный октаэдрический комплекс. Сидерофоры флуоресцирующих псевдомонад имеют различную химическую структуру и обладают, как правило, высоким сродством к трехвалентному железу, образуя с ним стабильные комплексы, недоступные для использования фитопатогенами. Фитопатогены продуцируют собственные сидерофоры, однако в отличие от сидерофоров псевдомонад они гораздо медленнее связываются с ионами железа, и псевдомонады выигрывают в конкурентной борьбе с фитопатогенами за такой жизненно важный элемент, как железо. Таким образом, связывание железа сидерофорами псевдомонад приводит к ограничению роста фитопатогенов и улучшению роста растений. Ризосферные псевдомонады подавляют или замедляют рост и развитие фитопатогенных грибов и бактерий [2].

Ризобактерии могут оказывать положительное действие на растение только при успешной колонизации ими его ризосферы. Для этого необходима способность ризобактерий прикрепляться к поверхности корней растений, способность бактериальных клеток перемещаться к корням растений, секретировавшим широкий набор источников углеродного и азотного питания для микроорганизмов, а также способность адаптироваться к специфическим условиям этой экологической ниши. В частности, бактерии должны быть резистентны к губительным для них ферментам (пероксидазы, протеазы) или токсичным соединениям (фенольные соединения растений), а также обладать в некоторых случаях осмо- или холодоустойчивостью [15]. Биотическими факторами, влияющими на выживаемость ризобактерий, является наличие в ризосфере конкурентов или других организмов,

оказывающих негативный эффект и аризо-бактерии, таких, как простейшие (амебы и инфузории), хищные бактерии и бактериофаги [13].

Использование таких препаратов может быть направлено на достижение нескольких целей: защиту растений и урожая от фитопатогенов, стимуляцию прорастания семян и роста растений, улучшение фосфорного питания растений, стимуляцию образования клубеньков у бобовых, получение компостов, супрессирующих возбудителей корневых гнилей растений и т.д. Увеличение продуктивности сельскохозяйственных культур, эффективное и ограниченное использование удобрений и средств защиты растений, а также повышение устойчивости и адаптации растений к неблагоприятным агро-климатическим условиям и антропогенным воздействиям являются актуальными для сельского хозяйства, а также для решения экологических проблем и охраны окружающей среды [4]. Данные вопросы привлекают внимание многих ученых, работающих в различных областях науки: растениеводстве, почвоведении, агрономии, агрохимии, экологии, микробиологии и других. Особенно важными для решения этих задач являются микробиологические подходы и приемы, которые основаны на использовании потенциала растений и почвенных микроорганизмов, и биологических механизмов взаимодействия компонентов растительно-микробных систем [5]. В некоторых случаях возможно использование смешанных препаратов совместимых бактерий, в том числе и бактерий различных таксономических групп с обязательным включением бактерий рода *Pseudomonas*. Широкомасштабное использование в сельском хозяйстве биопрепаратов на основе ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* сдерживается отсутствием стандартных технологий их производства. В настоящее время ведутся разработки технологий получения биопрепаратов различного назначения на основе ризосферных псевдомонад [7].

В России в настоящее время зарегистрирован единственный биопрепарат на основе *P. fluorescens* под коммерческим названием «ризоплан». Таким образом, уже в настоящее время возможно эффективное ис-

пользование штаммов PGPR *Pseudomonas*, правильно подобранных к конкретным условиям определенного хозяйства в качестве биологических средств защиты растений, являющихся дополнением, а иногда и альтернативой химическим средствам. Активно ведущиеся исследования в этом направлении и разрабатываемые новые технологии существенно повышают эффективность этих биопрепаратов [11].

Целью исследования явилось изучение антагонистической активности бактерий-ассоциантов, выделенных у представителей семейств *Cucurbitaceae* и *Lamiaceae*.

Материалы и методы исследования

Антагонистический эффект выявляли у бактерий *Pseudomonas fluorescens* и *Bacillus subtilis*, выделенных из ризосферы и ризопланы представителей семейства *Cucurbitaceae* и *Lamiaceae*. В качестве тест-объекта использовали *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Для выделения и идентификации используемых культур использовали такие питательные среды, как ЖСА, Эндо и МПА. Видовую идентификацию выделенных микробных ассоциантов проводили на основе изучения их морфологических, тинкториальных и биохимических свойств.

Определение антимикробной активности проводили методом перпендикулярных штрихов (Глушанова, 1999). Испытуемые штаммы наносили в виде штриха по диаметру, после инкубации 2-3 суток к штаммам перпендикулярно подсекали тест-объекты (*S.aureus* и *E.coli*). Антимикробные вещества, диффундирующие в толщу агара, задерживали рост чувствительных к ним микроорганизмов, что проявлялось в образовании зон отсутствия роста микробов (мм).

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что характерной особенностью *P. fluorescens* являлись флюоресценция в ультрафиолетовом цвете, расщепление оксидазы и окисление глюкозы OF. *P. fluorescens*, в отличие от *B.subtilis*, обладали подвижностью. *B.subtilis* проявляли манит- и каталазаположительную активность, не расщепляли мочевины, обладали способностью к спорообразованию и давали положительную реакцию Фогеса-Проскауэра.

P. fluorescens и *B.subtilis* проявляли выраженную антагонистическую активность в отношении обеих тест-культур (табл. 1).

Таблица 1

Величина зон отсутствия роста *E. coli* и *S. aureus* при взаимодействии с ассоциативными ризобактериями (мм)

Тест-культуры	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,5±0,5	7,1±0,6
<i>Escherichia coli</i>	12,1±0,4	10,0±0,5

В высокой степени проявлялось действие *P. fluorescens*, большей чувствительностью к действию ассоциативных ризобактерий обладала *E. coli*. Культура *S. aureus* оказалась устойчивой к антагонистическому действию ассоциативных ризобактерий. Из исследуемых бактериальных ассоциантов наибольшей активностью обладал *P. fluorescens*, что, вероятно, обусловлено синтезом антибиотикоподобных веществ и сидерофоров.

Выводы

P. fluorescens и *B. subtilis*, являющиеся ассоциантами представителей семейств *Cucurbitaceae* и *Lamiaceae*, обладают антагонистической активностью в отношении *E. coli* и *S. aureus*, наиболее выраженной у *P. fluorescens*.

Набольшая резистентность к антагонистическому действию исследуемых штаммов из изученных тест – культур проявляется у *S. aureus*, у *E. coli* она менее выражена.

Список литературы

1. Беззубенкова О.Е., Юхлимова М.Н., Потатуркина, Нестерова Н.И. Микрофлора ризосферы и ризопланы и её влияние на растительный организм // Естественные и технические науки. – 2012. – № 4. – С. 99-102
2. Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Сорос. образоват. журн. Биология, 1998. № 10. с. 25-31.
3. Бухарин О.В. Ассоциативный симбиоз / О.В. Бухарин, Е.С. Лобакова, Н.В. Немцева, С.В. Черкасов. - Екатеринбург: УрО РАН, 2006. – 264 с.
4. Васюк Л.Ф. Азотфиксирующие микроорганизмы на корнях небобовых растений и их практическое использование // Биологический азот в сельском хозяйстве / Ред. Е.Н. Мишустин. – М.: Наука, 1989. С. 88-98.
5. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. С. 306-330.
6. Добровольская Т.Г. Структура Бактериальных сообществ почв / Т.Г. Добровольская. – М.: Наука, 2002. – 282 с.
7. Егоров Н.С., Ландау Н.С. Биосинтез биологически активных соединений смешанными культурами микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология, 1982. Т. 18. С. 835-849.
8. Звягинцев Д.Н., Добровольская Т.Г., Лысак Л.В. Растения как центры формирования бактериальных сообществ // Журн. общей биологии. – 1993. – Т. 54. – С. 183-199.
9. Кравченко Л.В., Макарова Н.М., Азарова Т.С. и др. Выделение и фенотипическая характеристика ризостимулирующих ризобактерий (PGPR), сочетающих высокую активность колонизации корней и ингибирования фитопатогенных грибов // Микробиология, 2002. Т. 71. С. 521-525.
10. Мавроди Д.В., Ксензенко В.Н., Чатуев Б.М. и др. Структурно-функциональная организация генов *Pseudomonas fluorescens*, кодирующих ферменты биосинтеза феназин-1-карбоновой кислоты // Молекуляр. биология. 1997. Т. 31. С. 76-82.
11. Мишке И.В. Микробные фитогормоны в растениеводстве. Рига: ЗинатнеЮ 1988. 151 с.
12. Садовски М., Грэм П. Почвенная биология *Rhizobiaceae* // *Rhizobiaceae* молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Ред. Г. Спайк и др. Пер. под ред. И.А. Тихановича и Н.А. Проворова. СПб, 2002. С. 179-191.
13. Селицкая О.В., Емцев В.Т. Эффективность инокуляции культурами diaзотрофов некоторых лекарственных и эфиромасличных растений // Сельскохозяйственная микробиология в XIX-XXI веках: Тез. всерос. конф. СПб., 2001. с. 72.
14. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наук. думка, 1990. С. 84-111.
15. Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация азота в почве. – М.: Геос, 2007. -137 с.
16. Хадри А.-Е., Спайк Г., Бисселинг Т., Бревин Н. Разнообразие процессов образования корневых клубеньков и их инфицирования // *Rhizobiaceae* молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями // Ред. Г. Спайк и др. Пер. под ред. И.А. Тихановича и Н.А. Проворова. СПб., 2002. С. 373-389.
17. Bar-Ness E., Chen Y., Nadar H. et al. Siderophores of *Pseudomonas putila* as iron source for dicot and monocot plants // *Plant Soil.*, 1991. V. 130. P. 231-241.
18. Chanway C. P., Hynes R.K., Nelson L.M. Plant growth-promoting rhizobacteria: Effect on growth and nitrogen fixation of lentil and pea // *Soil. Biol. Biochem.*, 1989. V. 21. P. 511-517.
19. Schroth M.N., Hancock J.G. Disease – Suppressive Soil and Root-Colonizing Bacteria // *Science.* 1982. Vol. 216. P. 1376-1381.