

УДК 57.083.1:581.557

КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РОСТА БАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПОДЗЕМНЫМИ ОРГАНАМИ *DACTYLORHIZA MACULATA* (L.) SOO (ORCHIDACEAE)

Шеховцова Н.В., Первушина К.А., Маракаев О.А., Охупкина В.А.
ФБГОУ ВПО «Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова»,
Ярославль, e-mail: bioksusha@mail.ru

Впервые изучены кинетические параметры периодического роста четырех штаммов ассоциативных бактерий р. *Bacillus*, выделенных из подземных органов *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo, представителя семейства Orchidaceae умеренного климата, с целью определения времени синтеза вторичных метаболитов. При выращивании бактерий в жидких культурах по изменению оптической плотности суспензии при 590 нм были установлены такие параметры периодического роста, как длительность фазы роста, удельная скорость роста и время генерации, максимальный выход биомассы. Показано, что все культуры растут с различной скоростью и имеют специфические кривые роста, иногда не имеющие стационарной фазы. Проведено сравнение с кривыми роста бактерий того же рода, ассоциированных с тропическими видами сем. Orchidaceae. Предложено вероятное время синтеза вторичных метаболитов изученными микроорганизмами.

Ключевые слова: ассоциативные бактерии, *Bacillus*, орхидные, периодическая культура, кинетика роста

THE GROWTH KINETIC PARAMETERS OF THE BACTERIA, ASSOCIATED WITH UNDERGROUND ORGANS OF THE *DACTYLORHIZA* *MACULATA* (L.) SOO (ORCHIDACEAE)

Shekhovtsova N.V., Pervushina K.A., Marakaev O.A., Okhapkina V.A.
Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, e-mail: bioksusha@mail.ru

For the first time the kinetic parameters of periodic growth of four strains associated bacteria of the genus *Bacillus* which are isolated from the underground organs of *Dactylorhiza maculata*, the representative of family Orchidaceae inhabiting temperate climate region, are studied for the purpose to define the secondary metabolites synthesis time. At cultivation of bacteria in liquid cultures according with change of suspension optical density at 590 nanometers such parameters of periodic growth as duration of a growth phase, specific growth rate and generation time, the maximum exit of a biomass have been established. It was shown that all cultures grow with various rate and have the specific curves of growth which sometimes don't have a stationary phase. Comparison with growth curves of the same genus bacteria associated with tropical species Orchidaceae these is spent. Probable time of synthesis of secondary metabolites is defined for the studied microorganisms.

Keywords: associative bacteria, *Bacillus*, Orchidaceae, periodic culture, growth kinetics

Рост и развитие растений семейства Orchidaceae во многом обусловлены их взаимодействием с микроорганизмами. Основой существования орхидных является симбиоз с микромицетами, изучению механизмов которого посвящено значительное количество работ [5, 8, 9]. Кроме того, были обнаружены бактерии, ассоциированные с оранжерейными и дикорастущими тропическими видами орхидных [3, 7, 9], а также некоторыми их представителями умеренного климата [4]. Известно, что бактерии, изолированные с поверхности и из внутренних тканей различных видов культурных и дикорастущих растений, играют важную роль в их жизнедеятельности [6]. Они продуцируют вторичные метаболиты – регуляторы роста, пигменты, а также антибиотики, защищающие растения от фитопатогенных микроорганизмов прямо или косвенно – за счет индукции синтеза фитоалексинов [5, 6]. В единичных исследованиях показано, что ассоциативные прокариоты тропических орхидных продуцируют фитогормоны, стимулируют формирование микоризы

и прорастание семян [3, 7, 9]. Однако механизмы взаимодействия орхидных, особенно видов умеренного климата, с ассоциативными прокариотами остаются практически неизученными. Важным аспектом таких исследований в условиях *in vitro* являются особенности роста бактерий. Экспериментально показано, что синтез бактериями вторичных метаболитов в жидкой культуре происходит в конце экспоненциальной и в течение стационарной фазы роста [2, 4, 5, 6].

Целью работы являлось изучение параметров периодического роста жидких культур бактерий, выделенных из подземных органов *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo (Orchidaceae), для определения времени инициации синтеза вторичных метаболитов.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись четыре штамма грамположительных спорообразующих бактерий р. *Bacillus* – *M*, *S5*, *U* и *E3*. Они отобраны из числа 26 культур, выделенных с помощью питательных сред из внутренних тканей подземных органов (придаточных корней и окончаний стеблекорневых туберидов) *D. maculata* [4]. Это достаточно широко

распространенный на территории средней России представитель семейства Orchidaceae – многолетнее травянистое растение, у которого запасующим органом служит стеблекорневой тубероид [8].

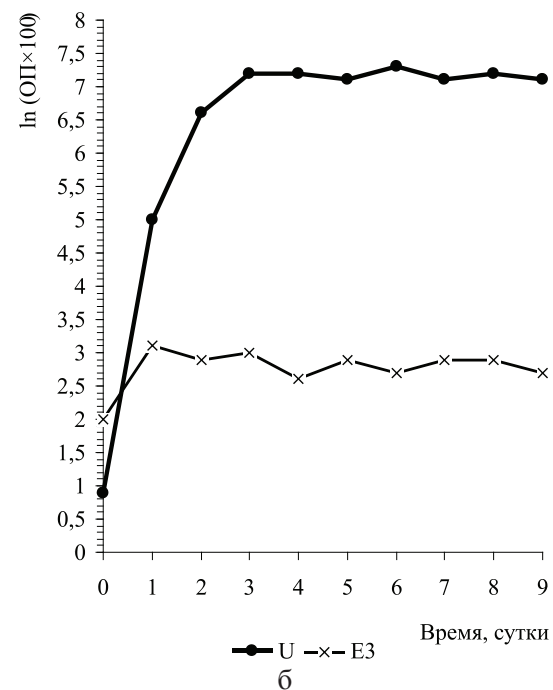
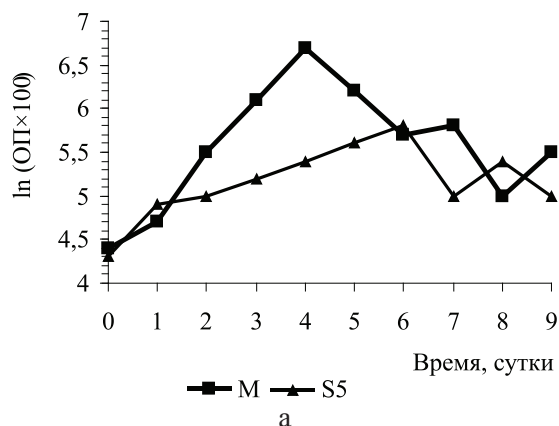
Параметры периодического роста микроорганизмов изучали, пересевая чистые культуры в жидкую среду Чапека следующего состава (г/л): NaNO_3 – 2,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; D,L-триптофан – 0,2; дрожжевой экстракт – 0,5; глюкоза – 20, рекомендованную Е.А. Цавкеловой с соавт. [3, 7]. Культуру бактерий предварительно выращивали на поверхности мясо-пептонного агара, разбавленного в 2 раза, с добавлением 0,5 г/л дрожжевого экстракта в течение 7 сут. Биомассу микроорганизмов вносили в колбу с 100 мл среды Чапека методом смыва. Жидкую культуру инкубировали в течение двух суток. Затем 10 мл суспензии вносили в колбу с пробирочником, заполненную 115 мл среды Чапека, и инкубировали в течение 9 сут. Культивирование осуществляли в периодическом режиме при комнатной температуре в условиях принудительной аэрации (на качалке Elran-357, Польша, 120 об/мин). В динамике периодического роста определяли биомассу по показателю оптической плотности (ОП) суспензии при 590 нм (фотозлектроколориметр КФК-2УХЛ-42, кювета с расстоянием 1 см). По полученным данным, строили кинетические кривые роста бактерий в полулогарифмических координатах. Параметры периодического роста жидких культур (фазы роста, удельную скорость роста – μ , время генерации – g) определяли согласно существующим рекомендациям [1].

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты кинетических исследований, представленные на рисунке, показывают, что каждая из четырех культур бактерий обладает специфической кривой роста. Тем не менее характер графиков роста штаммов *M* и *S5* обладает некоторым сходством (рисунок а). Обе культуры растут в два этапа, причем на каждом их удельная скорость существенно не различается. Стационарная фаза не выражена: сразу после максимального значения биомассы наблюдается ее снижение.

Культура *M* растет в течение 4-х суток, при этом ОП увеличивается от 0,84 в момент посева до своего максимального значения – 8,32 ед. Удельная скорость роста бактерий меняется в 2 этапа (таблица): в течение первых суток $\mu = 0,3 \text{ сут}^{-1}$, а со вторых по четвертые удельная скорость роста увеличивается более чем в 2 раза. Культура *S5* растет в течение 6 суток, при этом ОП увеличивается в 4 раза: от 0,74 в момент посева до своего максимального значения – 3,36 ед. Рост культуры также происходит в 2 этапа и сопровождается снижением удельной скорости роста. В первые сутки ее значение составляет $0,61 \text{ сут}^{-1}$, а в последующие пять снижается более чем в 3 раза. Таким образом, после первых суток штамм *M* растет с ускорением, а *S5* – с замедлением. Отмирание первой культуры наблюдается на 5 сутки, второй – на 7 сутки роста.

При этом обе кривые носят колебательный характер, что, по-видимому, объясняется частичным автолизом клеток в популяции, который предоставляет дополнительный питательный субстрат для бактерий [1].



Кинетические кривые роста спорообразующих бактерий штаммов *M*, *S5* (а), *U* и *E3* (б), выделенных из подземных органов *D. maculata*: \ln (единицы ОП·100)/время, сут); ОП – оптическая плотность

Кинетические кривые периодических культур штаммов *U* и *E3* (рисунок б) отличаются от кривых роста штаммов *M* и *S5* наличием стационарной фазы. Рост жидкой культуры штамма *U* происходил в течение трех суток с понижением удельной скорости роста в течение каждых суток в 2,6 раза (см. таблицу). При этом ОП суспензии возрастает с 0,03 в момент посева до 13,11 ед. на 3 сутки и далее стабилизируется на уровне максимального значения. Фаза роста пе-

риодической культуры штамма *E3* (см. рисунок б) – самая короткая и составляет одни сутки. Увеличение биомассы происходит с удельной скоростью $1,1 \text{ сут}^{-1}$. Оптическая плотность суспензии за это время повышается в 3 раза: с 0,07 до 0,21 ед. Значение биомассы штамма *E3*, стабилизируясь на этом уровне, меньше в 64 раза по сравнению с аналогичным показателем штамма *U*. Обобщая полученные результаты, можно отметить, что

штаммы *U* и *E3* являются быстрорастущими (среднее время генерации составляет 0,6 сут) по сравнению с культурами *M* ($g_{\text{сред}} = 1,3 \text{ сут}$) и *S5* ($g_{\text{сред}} = 3,1 \text{ сут}$). Штамм *U* отличается максимальным выходом биомассы, а *E3* – минимальным. Тем не менее именно кривая периодического роста штамма *E3* сходна с таковой бактерий р. *Bacillus*, выделенных с субстратных корней тропического вида *Dendrobium moschatum* [3].

Характеристика периодического роста жидких культур бактерий р. *Bacillus*, ассоциированных с *D. maculata*

Параметры роста*	Этапы роста культуры, сут							
	<i>M</i>		<i>S5</i>		<i>U</i>			<i>E3</i>
	0–1	1–4	0–1	1–6	0–1	1–2	2–3	0–1
$\mu_{\text{сред}}, \text{сут}^{-1}$	0,30	0,67	0,61	0,18	4,10	1,56	0,60	1,10
<i>g</i> , сут	2,3	1,0	1,2	3,5	0,2	0,4	1,2	0,6

Примечание. * μ – удельная скорость роста, *g* – время генерации.

Заключение

Бактерии каждого из четырех штаммов р. *Bacillus* – *M*, *S5*, *U* и *E3*, ассоциированные с подземными органами *D. maculata* (Orchidaceae), обладают специфическими показателями периодического роста: длительностью фазы роста, наличием стационарной фазы, а также значениями удельной скорости роста, времени генерации и выхода биомассы. Кривые периодического роста бактерий р. *Bacillus* могут иметь неклассический вид из-за смешанного типа их метаболизма – возможности перехода с дыхания на брожение. Характер роста изученных культур существенно различается, что не позволяет дать однозначные рекомендации по выбору временных пределов для определения продукции ими вторичных метаболитов. Наиболее вероятно обнаружение биологически активных веществ в периодической культуре штамма *E3* после первых, штаммов *M* и *U* – после третьих, штамма *S5* – после пятых суток роста.

Список литературы

1. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 116 с.
2. Практикум по микробиологии / под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Academia, 2005. – 608 с.
3. Цавкелова Е.А., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Обращение ауксинов бактериями, ассоциированными с корнями орхидей // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 1. – С. 55–62.
4. Микроорганизмы, ассоциированные с подземными органами орхидных средней полосы России / Н.В. Шеховцова, К.А. Первушина, О.А. Маракеев и др. // Проблемы агрохимии и экологии. – 2010. – № 4. – С. 30–36.
5. Bayman P., Otero J.T. Microbial endophytes of orchid roots // Soil Biology. – 2006. – Vol. 9. – P. 153–177.
6. Chen W., Wu C.H., Bernard S.H. Developing microbe-plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration // Microbial biotechnology. – 2009. – Vol. 10. – P. 1–13.

7. Tsavkelova E.A., Cherdynitseva T.A., Klimova S.Yu. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin // Archives of Microbiology. – 2007. – Vol. 188, № 6. – P. 655–664.

8. Vakhrameeva M.G., Tatarenko I.V., Varlygina T.I. Orchids of Russia and adjacent countries (within the borders of the former USSR). – Königstein: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2008. – 690 p.

9. Wilkinson K.G., Dixon K.W., Sivasithamparam K. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria // Plant Soil. – 1994. – Vol. 159. – P. 291–295.

References

1. Pert S.J. *Osnovy klytivirovaniya mikroorganizmov i kletok* (Principles of microbe and cell cultivation). M.: Mir, 1978. 116 p.
2. *Praktikum po mikrobiologii* (Practice on microbiology). Pod red. A.I. Netrusova. M.: Academia, 2005. 608 p.
3. Tsavkelova E.A., Cherdynitseva T.A., Netrusov A.I. *Mikrobiologiya – Microbiology*, 2005, Vol. 74, no. 1, pp.55–62.
4. Shekhovtsova N.V., Pervushina K.A., Marakaev O.A., Kholmogorov S.V., Osipov G.A. *Problemy agrokhimii i ekologii – Agrochemistry and ecology problems*, 2010, no 4., pp. 30–36.
5. Bayman P., Otero J.T. *Soil Biology*, 2006, Vol. 9, pp. 153–177.
6. Chen W., Wu C.H., Bernard S.H. *Microbial biotechnology*, 2009, Vol.10, pp. 1–13.
7. Tsavkelova E.A., Cherdynitseva T.A., Klimova S.Yu. *Archives of Microbiology*, 2007, Vol. 188, no 6, pp. 655–664.
8. Vakhrameeva M.G., Tatarenko I.V., Varlygina T.I. *Orchids of Russia and adjacent countries (within the borders of the former USSR)*, Königstein: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2008. 690 p.
9. Wilkinson K.G., Dixon K.W., Sivasithamparam K. *Plant Soil*, 1994, Vol. 159, pp. 291–295.

Рецензенты:

Степанов А.Л., д.б.н, профессор, профессор кафедры биологии почв факультета Почвоведения Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, МГУ, факультет Почвоведения, г. Москва.

Воронин Л.В., д.б.н., доцент, доцент кафедры ботаники, теории и методики обучения биологии Ярославского государственного университета им. К.Д. Ушинского, ЯГПУ, Естественно-географический факультет, г. Ярославль.

Работа поступила в редакцию 13.02.2012.