

УДК 543.472.3

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ АССОЦИАНТОВ

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

¹ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, e-mail: junau@yandex.ru

Проведено сравнительное исследование по изучению антагонистического действия микроорганизмов, ассоциированных с растениями. Антагонистическая активность была изучена по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам. Установлено, что из изученных изолятов антагонистический эффект выявлен у таких микроорганизмов, как *Pseudomonas fluorescens* и *Bacillus subtilis*. Условно-патогенные и патогенные микроорганизмы (*Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*) проявляют к бактериям-ассоциантам определенную чувствительность, которая выражалась в угнетении их роста. Полученные результаты могут стать основой для разработки новых методов борьбы не только с «традиционными» облигатными фитопатогенами, но и так называемыми полиморфными группами грибов, включающими как сапротрофные, так и паразитические формы, многие из которых известны как биоразрушители, патогены культурных и дикорастущих растений.

Ключевые слова: антагонизм, ризобактерии, бактерии-ассоцианты

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF PLANT-BACTERIAL ASSOCIATES

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

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

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. The results can be a basis for development of new methods of struggle not only with «traditional» obligate phytopathogen, but also the so-called polymorphic groups of fungi, including both сапротрофные and parasitic forms, many of which are known as биоразрушители, pathogens cultural and wild plants.

Keywords: antagonism, rhizobacteria, bacteria-associates

Популяции микроорганизмов, вступая в сложные взаимоотношения – конкурентные или кооперативные, при заселении различных частей органов, тканей микроорганизма формируют его специфический «микросимбиоз» [7]. При описании форм природных и искусственных сообществ микроорганизмов в литературе используется термин «ассоциации». В работах последнего десятилетия прошлого века для описания ассоциативных отношений или эктосимбиозов стали использовать термин «ассоциативный симбиоз» [8]. По мнению О.В. Бухарина, ассоциативный симбиоз – это многокомпонентная интегральная система, включающая хозяина в качестве макропартнера, стабильный доминантный микросимбионт и ассоциированные микросимбионты с разнонаправленными воздействиями, определяющими формирование, стабильность существования и продуктивность симбиоза в целом [2].

Большой интерес для исследований ассоциативных эктосимбиозов с микроорганизмами представляет ризосфера (узкая область почвы вдоль поверхности корней), так как она богата заселена микроорганизмами, оказывающими полифункциональное по-

ложительное влияние на растения [4]. Для обозначения таких бактерий используют термин *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR). Стимулирующие рост растений ассоциативные ризобактерии оказывают влияние на физиологические процессы растений, урожайность и качество растительной продукции [5], поэтому они все шире применяются в отечественном и мировом земледелии. Ризосфера служит их основной экологической нишей с наиболее благоприятными условиями [9]. В ризосферу 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 [7, 10].

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* [2, 4]. Механизм действия этих микроорганизмов на фитопатогены включает конкуренцию за источник

питания, эффективную колонизацию ризосферы, синтез антибиотических и рострегулирующих веществ [1]. 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 [5].

Для изучения взаимодействий с полезными формами бактерий в ризосфере продуктивна концепция, согласно которой ассоциативные ризобактерии образуют с растением единую растительно-микробную систему с новыми свойствами, детерминированными положительным взаимодействием партнёров [2]. К ассоциативным предложено относить виды микроорганизмов, оказывающие положительное влияние на растения, но колонизирующие только поверхности органов и/или свободные пространства тканей. Ассоциативные микроорганизмы обитают в зоне прямого влияния растений, прилегающей к корням в почве или заселяют поверхность корней. Ризосферные микроорганизмы формируют на корнях растений сложные по таксономическому составу и структурно-функциональной организации сообщества, которые оказывают на растения полифункциональное воздействие [4].

Механизмы положительного влияния ризобактерий на жизнедеятельность растений делят на прямые и опосредованные. К прямым способам воздействия на растения предлагают относить: ассоциативную азотфиксацию, образование ростстимулирующих веществ, обеспечение легкоусвояемыми формами железа, фосфора и/или поглощение их из почвы и доставку в растения, формирование специфических трофических связей, уменьшение уровня этилена. Непрямые способы – предотвращение или уменьшение роста фитопатогенных почвенных микроорганизмов за счет выделения бактерицидных и антифунгальных метаболитов [2, 9].

Одной из важнейших проблем современного растениеводства являются фитопатогены, не только «традиционные» (облигатные), но и так называемые полиморфные группы грибов, включающие как сапротрофные, так и паразитические формы, многие из которых известны как биоразрушители, патогены культурных и дикорастущих растений [10]. Большинство сортов сельскохозяйственных культур в среднем реализуют только 20–25% генетического потенциала продуктивности. При обеспечении защиты от возбудителей болезней, вредителей и сорняков они спо-

собны формировать значительно больший урожай. Среднемировой уровень потерь вследствие поражения сельскохозяйственных растений фитопатогенными микроорганизмами оценивается в 12%. Это определяет важность защиты растений как одного из факторов интенсивного растениеводства. Установлено, что в борьбе с возбудителями болезней растений возможно использовать бактерии, обладающие антагонистическим действием по отношению к фитопатогенам [9]. Имеются сведения о том, что формирование эффективной растительно-бактериальной ассоциации определяется не только количеством выделяемых растением в ризосферное пространство растворимых органических соединений (экссудатов), но и их качественным составом, влияющим на приживаемость и размножение штамма в ризосфере. По этой причине можно говорить об относительной приуроченности штаммов PGPR к определенным видам и даже сортам растений, имеющим специфические характеристики химических корневых выделений [10]. Однако до сих пор антагонистическая активность ризосферных бактерий по отношению к фитопатогенам остается малоизученной.

Целью исследования явилось изучение антагонистической активности растительно-бактериальных ассоциантов по отношению к условно-патогенной и патогенной микрофлоре.

Материалы и методы исследования

Для выделения и идентификации используемых культур использовали такие питательные среды, как ЖСА, Эндо и МПА (Оболонск). Видовую идентификацию выделенных микробных ассоциантов проводили на основе изучения их морфологических, тинкториальных и биохимических свойств [6]. Для выявления *Pseudomonas fluorescens* использовали люминесцентную микроскопию (микроскоп – МИК-МЕД-6 ЛЮМLed).

Антагонистический эффект выявляли у бактерий *Pseudomonas fluorescens* и *Bacillus subtilis*. В качестве тест-объекта использовали *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, обладающие типичными свойствами. *Staphylococcus aureus* – грамположительные кокки, диаметром 0,5–1,5 мкм, расположенные в мазке в виде небольших групп или виноградных гроздей, неподвижные (не имеют жгутиков), не образующие спор. Биохимически очень активны: продуцировали каталазу, восстанавливали нитриты из азота, обладали способностью гидролизовать белки, расщеплять многие углеводы в аэробных условиях. *S. aureus* расщепляли маннит и глюкозу не только в аэробных условиях, но и в анаэробных. *Escherichia coli* – короткие подвижные грамотрицательные палочки с закругленными концами, ферментировали лактозу с образованием кислоты и газа (или лактозонегативны), на голодной среде с цитратом не росли, реакция Фогеса-Проскауэра отрицательна, проба с MR положительна, не имели фенилаланиндезаминазы, не давали рост

на среде с KCN [6]. Определение антимикробной активности проводили методом перпендикулярных штрихов [3]. Испытуемые штаммы наносили в виде штриха по диаметру, после инкубации 2–3 суток при температуре 37°C к штаммам перпендикулярно подсевали 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). О наличии и степени антагонистической активности у испытуемой бактерии судили по величине зоны ингибирования тест-штамма на границе со штрихом роста бактерии.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что в микробоценозе ризосферы и ризопланы изученных семейств растений преобладали *Pseudomonas fluorescens* и *Bacillus subtilis*, 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 маннит- и каталазаположительную активность, не расщепляли мочевины, обладали способностью к спорообразованию и давали положительную реакцию Фогеса–Проскауэра (табл. 1).

Таблица 1

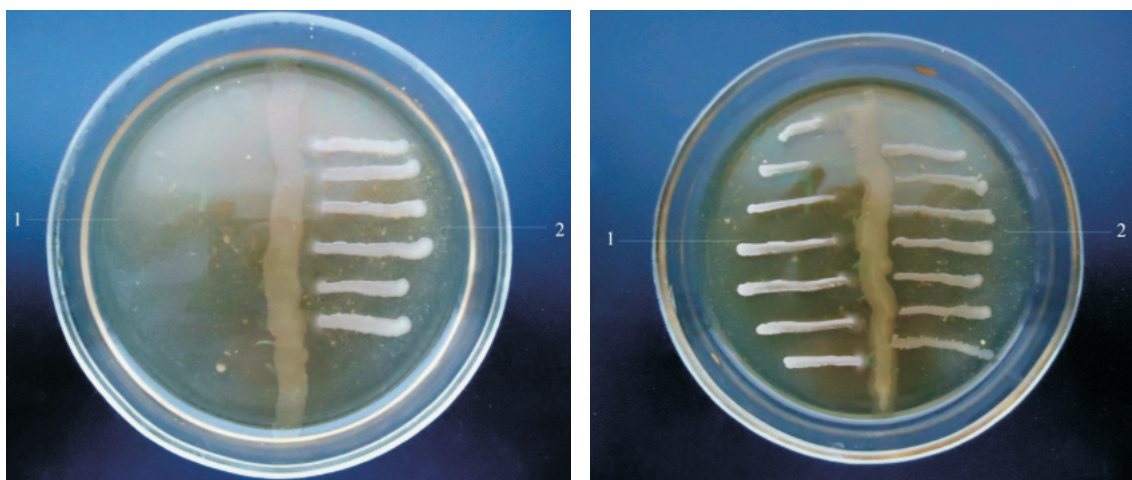
Биохимическая активность ризосферных бактерий

Биохимические свойства	<i>P. fluorescens</i>	<i>B. subtilis</i>
Наличие спор	–	+
Повижность	–	+
Ферментация лецитиназы	+	–
Ферментация маннита	+	+
Ферментация ксилозы	+	+
Образование уреазы	–	V
Редукция нитратов	(–)	+
Реакция Фогеса–Проскауэра	–	+
Синтез пиовердина, флюоресцирующего в УФ-свете	+	–

Примечания :

- «–» – 0–10% штаммов положительные;
- (–) – 11–25% штаммов положительные;
- V – 26–75% штаммов положительные;
- «+» – 90–100% штаммов положительные.

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



а

б

Антагонистическая активность B. subtilis (а) P. fluorescens (б) по отношению к E. coli (1) и S. aureus (2)

Проведенные исследования показали, что большей чувствительностью к действию ассоциативных ризобактерий обладала *E. coli* (табл. 2). Чувствительность *E. coli* к *P. fluorescens* в 8,0 раз превышает чувствительность *S. aureus* к данной бактерии. По отношению к *B. subtilis*, *E. coli* превышает чувствительность *S. aureus* в 2,7 раз.

Культура *S. aureus* оказалась устойчивой к антагонистическому действию ассоциативных ризобактерий. Из исследуемых бактериальных ассоциантов наибольшей активностью обладал *B. subtilis*, что, вероятно, обусловлено синтезом антибиотикоподобных веществ и сидерофоров.

Таблица 2

Антагонистическая активность *P. fluorescens* и *B.subtilis* (мм)

Тест-культуры	Величина зоны отсутствия роста бактерий (мм) при взаимодействии с :	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1,5 ± 0,5	12,1 ± 0,4
<i>Bacillus subtilis</i>	10,2 ± 0,6	28,0 ± 0,5

Примечание: * – достоверность показателя по сравнению с диаметром зоны отсутствия роста *S. aureus* ($p < 0,05$).

Выводы

1. Микробные ассоцианты *P. fluorescens* и *B.subtilis* обладают антагонистической активностью в отношении *E. coli* и *S. aureus*. Антагонистическая активность *B.subtilis* по отношению к *E. coli* в 2,3 раз превышает действие *P. fluorescens*. По отношению к *S. aureus* антагонистическая активность *B.subtilis* в 6,8 раз превосходит активность *P. fluorescens*.

2. Наибольшая устойчивость к антагонистическому действию исследуемых штаммов из изученных тест-культур проявляется у *S. aureus*, которая превышает устойчивость *E. coli* в 2,7 раз по отношению к *B.subtilis* и в 8,0 раз по отношению к *P. fluorescens*.

Список литературы

1. Боронин А.М., Кочетков В.В. Биологические препараты на основе псевдомонад // АГРО XXI. – 2000. – 140 с
2. Бухарин О.В. Ассоциативный симбиоз / О.В. Бухарин, Е.С. Лобакова, Н.В. Немцева, С.В. Черкасов. – Екатеринбург: УрО РАН, 2006. – 264 с.
3. Глушанова Н.А., Блинов А.И., Бахаев В.В. Об антагонизме пробиотических лактобацилл // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2004. – № 6.
4. Добровольская Т.Г. Структура Бактериальных сообществ почв. – М.: Наука, 2002. – 282 с.
5. Звягинцев Д.Н. Растения как центры формирования бактериальных сообществ / Т.Г. Добровольская, Л.В. Лысак // Журн. общей биологии. – 1993. – Т. 54. – С. 183–199.
6. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т. 1: пер с англ. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – 432 с., ил.
7. Проворов Н.А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе // Журн. общ. биологии. – 2001. – Т. 62. – С. 472–495.
8. Умаров М.М. Микробиологическая трансформация азота в почве / М.М. Умаров, А.В. Кураков, А.Л. Степанов. – М.: Геос, 2007. – 137 с.
9. Hiltner L. Über neuere Erfahrungen und Problem auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache. Arb Dtsch. Landwirt. Ges., 1904, 98: 59–78.

10. Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V. e.a Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. MPMI, 2004, 17(1): 6–15.

References

1. Boronin A.M. *Sorovskij obrazovatelnyj jurnal Soros Educational Journal*, 1998, no.10, pp. 25–31.
2. Bukharin, O.V., *Assotsiativnyj simbioz* (Associative symbiosis), Yekaterinburg: UrORAN, 2007. 264 p.
3. Glushanova N.A. *Jepidemiologija i infekcionnye bolezni Epidemiology and infectious diseases*, 2004. no. 6.
4. Dobrovolsky T.G. *Struktura Bakterial'nyh soobshhestv pochv* (Struktura of Bacterial communities of soils): M.: Science, 2002. 282 p.
5. Zvyagintsev D.N. *Zhurn. obshhejbiologii – Zhurn. general biology*. 1993. T. 54. pp. 183–199.
6. Determinant of bacteria of Berdzh. In 2 T. T. 1: Per with English / Under the editorship of J. Hoult, N. Kriga, P. Snit, J. Steyli, S. Williams. M.: World 1997. 432 p.
7. Provorov N.A. *Zhurn. obshhejbiologii – Zhurn. general biology*. – 2001. T. 62. pp. 472–495.
8. Umarov M.M. *Mikrobiologicheskaj atransformacija azota v pochve* (Mikrobiologicheskaya nitrogen transformation in the soil), M.: Geos, 2007. 137 p.
9. Hiltner L. Über neuere Erfahrungen und Problem auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache. Arb Dtsch. Landwirt. Ges., 1904, 98: 59–78.
10. Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V. e.a Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. MPMI, 2004, 17(1): 6–15.

Рецензенты:

Золотухин В.В., д.б.н., профессор кафедры зоологии, ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова», г. Ульяновск;

Артемьева Е.А., д.б.н., профессор кафедры зоологии, ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова», г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 19.12.2013.