



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



БАКТЕРИИ РОДОВ *ADVENELLA*, *BACILLUS* И *PSEUDOMONAS* – ПЕРСПЕКТИВНАЯ ОСНОВА БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА

Кузьмина Л.Ю., Архипова Т.Н., Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Четвериков С.П., Мелентьев А.И.

Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра РАН, проспект Октября, 69, Уфа, Россия, e-mail: ljkuz@anrb.ru

Резюме

Изучены механизмы ростостимулирующей активности прямого и косвенного действия 14 штаммов бактерий из родов *Advenella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*. Все изученные штаммы проявляли фосфат-мобилизующую активность, шесть – обладали способностью продуцировать ауксины (283 - 790 нг/мл). У отдельных культур обнаружена также нитрогеназная активность, антагонизм к фитопатогенным грибам, продукция внеклеточных хитиназ и целлюлаз. В группе штаммов, проявляющих нитрогеназную и целлюлозолитическую активность, *B. subtilis* IB-54 обладал наиболее сильным антагонистическим действием, а *A. kashmirensis* IB-K1 – значительной фосфатмобилизующей способностью. Штаммы рода *Bacillus* и *A. kashmirensis* IB-K1 являлись умеренными галофилами (до 7% NaCl), тогда как представители псевдомонад были устойчивы к концентрации соли 4-5%. В условиях совместного культивирования бациллы подавляли развитие большинства бактерий других родов, но не проявляли антагонизма друг к другу. Только штамм *P. extremaustralis* IB-K13-1A был способен к совместному росту со всеми исследованными бактериями. Полученные результаты позволяют рассматривать штаммы *A. kashmirensis* IB-K1, *P. extremaustralis* IB-K13-1A, *P. mandelii* IBKi-14, *B. atrophaeus* IB-21, *B. subtilis* IB-22 и *B. subtilis* IB-54, проявляющие свойства PGPR-бактерий, в качестве перспективной основы новых полифункциональных биопрепаратов для растениеводства.

Ключевые слова: *Advenella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, фитогормоны, фосфатмобилизация, антагонизм, хитиназа, целлюлаза

Цитирование - Кузьмина Л.Ю., Архипова Т.Н., Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Четвериков С.П., Мелентьев А.И. Бактерии родов *Advenella*, *Bacillus* и *Pseudomonas* – перспективная основа биопрепаратов для растениеводства. *Биомика*. 2018. 10 (1). С. 16-19. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-4

BACTERIA BELONGING TO GENERA *ADVENELLA*, *BACILLUS* AND *PSEUDOMONAS* AS A PROMISING BIOPREPARATIONS BASE FOR HORTICULTURE

Kuzmina L. Yu., Arkhipova T.N., Aktuganov G.E., Galimzianova N.F., Chetverikov S.P., Melentiev A.I.

Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 69 Prospekt Oktyabrya, Ufa, Russia, e-mail: ljkuz@anrb.ru

Resume

The mechanisms of growth-promoting activity of direct and implicit action displayed by 14 strains of bacteria belonging to genera *Advenella*, *Bacillus*, *Pseudomonas* have been studied. All the studied strains exhibited phosphate-mobilizing activity; six ones were capable to produce auxins (283 - 790 ng/ml). Some bacterial cultures revealed additionally nitrogenase activity, antagonism against phytopathogenic fungi, production of extracellular chitinases and cellulases. The strain *B. subtilis* IB-54 demonstrated most strong antagonistic effect among the bacteria displaying nitrogenase and cellulolytic activity, while the strain *A. kashmirensis* IB-K1 was characterized with significant phosphate-mobilizing ability. As well as the cultures belonging to genus *Bacillus* and *A. kashmirensis* IB-K1 were moderate halophiles (up to 7% NaCl), whereas the *Pseudomonas* strains were resistant to a salt concentration of 4-5%. The *Bacillus* strains suppressed in co-cultures the growth of most bacteria belonging to other genera; however, these not displayed antagonism against each other. Only alone strain *P. extremaustralis* IB-K13-1A was capable to

simultaneous growth together with all studied bacterial cultures. Main findings permit to consider the strains *A. kashmirensis* IB-K1, *P. extrem australis* IB-K13-1A, *P. mandelii* IBKi-14, *B. atrophaeus* IB-21, *B. subtilis* IB-22 and *B. subtilis* IB-54 displaying PGPR-abilities as promising base of novel multifunctional biopreparations for horticulture.

Keywords: *Advenella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, phytohormones, phosphate mobilization, antagonism, chitinase, cellulose

Citation - Kuzmina L.Yu., Arkhipova T.N., Aktuganov G.E., Galimzianova N.F., Chetverikov S.P., Melentiev A.I. Bacteria belonging to genera *Advenella*, *Bacillus* and *Pseudomonas* as a promising biopreparations base for horticulture. *Biomics*. 2018. 10 (1). P. 16-19. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-4 [In Russian]

Введение

Бактерии, колонизирующие ризосферу и ускоряющие рост растений с помощью различных механизмов, называют ростостимулирующими ризобактериями PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Среди них наиболее характерны представители родов *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* и некоторые другие. Механизм положительного влияния PGPR-бактерий на растения связан как с их прямым, так и косвенным действием. К прямым действиям относится синтез бактериями некоторых метаболитов (ауксинов, цитокининов, гибберелинов, продукция сидерофоров, антибиотиков и миколитических ферментов - хитиназ, хитозаназ, протеаз, β -1.3- и β -1.3-1.4-глюканаз, целлюлаз и др.). Косвенные механизмы включают в себя факторы, повышающие выживаемость растений в неблагоприятных условиях (соллюбилизация труднорастворимых фосфатов, фиксации атмосферного азота, повышение засухоустойчивости). Большой интерес для сельского хозяйства представляет поиск новых PGP бактерий и создание на их основе биопрепаратов, имеющих комплексное действие.

Цель работы оценить комплекс PGP свойств перспективных штаммов бактерий родов *Advenella*, *Bacillus*, *Pseudomonas* - мобилизацию труднорастворимых фосфатов, продукцию фитогормонов, хитиназ, целлюлаз, нитрогеназную активность, антагонизм к фитопатогенным грибам, галотолерантность, а также возможность их совместного использования в составе одного препарата.

Материалы и методы

Объектами исследований служили штаммы из Коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН. Изучено четырнадцать штаммов, из них 11 являются представителями аэробных грамотрицательных бактерий (*Advenella kashmirensis* IB-K1 и 10 штаммов рода *Pseudomonas*), 3 - грамположительных бактерий рода *Bacillus*.

Способность бактерий синтезировать ауксины оценивали в жидких средах: среда Кинг Б для бактерий рода *Pseudomonas*, среда K1G [Кузьмина и др. / Kuzmina et al., 2015] - род *Bacillus*, среда Г1G модификация среды K1G - вид *A. kashmirensis*. Штаммы

культивировали 4 суток на шейкере при 160 об/мин, бактерии рода *Bacillus* при 37⁰С, грамотрицательные - 28⁰С. Определение ауксинов в культуральной жидкости проводили с помощью ИФА после эфирной экстракции в соответствующей тест-системе [Veselov et al., 1992].

Антагонистическую активность изучали на картофельном агаре, фосфатмобилизующую на среде Муромцева [Муромцев / Muromtsev, 1957] с ортофосфатами (Ca, Al, Fe), среде Менкиной с фитином [Менкина / Menkina, 1950]. Хитиназную и целлюлазную активность на среде, г/л: NaCl - 5, MgSO₄ - 2, NH₄H₂PO₄ - 1, K₂HPO₄ - 1, пептон - 3, дрожжевой экстракт - 3, субстрат - 5 (соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) или коллоидный хитин. Культуры инокулировали методом укола на поверхность среды. Размер колоний и зону просветления вокруг них измеряли через 4-7 суток для хитиназной, целлюлазной, антигрибной активности и на 21 день - фосфатмобилизующей. Целлюлазную активность оценивали по диаметру зон просветления вокруг колоний после окрашивания среды 0.25% Конго красным. Оценку ферментативной и фосфатмобилизующей активности рассчитывали по индексу равному отношению размера зоны гало и колонии [Moawad, Vleck, 1996]. Нитрогеназную активность бактерий, выращенных в жидкой культуре, определяли ацетиленовым методом. Галофильность бактерий изучали в жидких средах, варьируя содержание NaCl от 1 до 10%. Изучение антагонизма между бактериями проводили методом пересекающихся штрихов на среде Г1G.

В качестве тест-объектов для изучения антагонистического действия бактерий использовали 20 штаммов микромицетов вызывающих корневые гнили злаков и первичных разрушителей древесины из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) и коллекции УИБ УФИЦ РАН (ИБ). Грибы были представлены видами: *B. sorokiniana* ИБ Г-12, *Aspergillus glaucus*, *Choetomium* sp., *Fusarium avenaceum* ВКМ-F-132 (ИБ Г-15), *F. culmorum* ВКМ-F-844 (ИБ Г-16), *F. gibbosum* ВКМ-F-848 (ИБ Г-17), *F. graminearum* ВКМ-F-1668 (ИБ Г-18), *F. moniliforme* ВКМ-F-671 (ИБ Г-64), *F. nivale* ВКМ-F-3106 (ИБ Г-24), *F. oxysporum* ВКМ-F-137 (ИБ-Г-20), *F. sambucinum* ВКМ-F-842 (ИБ Г-21), *F. semitectum* ВКМ-F-1938 (ИБ Г-22), *F. solani* ВКМ-F-142 (ИБ Г-23). *F. sporotrichiella* (ИБ Г-57), *Rhinochadium* sp., *Paecilomyces variotii* ИБ Г-27,

Penicillium griseo-purpureum, *P. simplicissimum*, *P. variabile*, *Trichoderma viride* (ИБ Г-40).

Результаты и обсуждение

Оценка способности культур бактерий мобилизовать фосфаты на плотной среде показала, что все штаммы хорошо растворяли фосфат кальция и фитин с индексом солюбилизации от 1 до 7, при этом фосфаты алюминия и железа они растворяли значительно слабее (таблица). Максимальной активностью характеризовался штамм *A. kashmirensis*

IBK1, растворяющий фитин и ортофосфат кальция с индексом солюбилизации 5 и 7, соответственно. Среди псевдомонад наибольшей активностью обладал штамм *P. extremaustralis* IBK13-1A с индексом солюбилизации 5.5 и 6 для фитина и ортофосфата кальция и 1 для фосфата Al и Fe. Среди бацилл только у штамма *B. atrophaeus* IB21 выявлены индексы солюбилизации фитина и ортофосфата кальция не превышающие 2 и 2.4 (таблица).

Таблица

Ростостимулирующие свойства изученных штаммов бактерий из родов *Advenella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*
Growth stimulating properties of the studied bacterial strains of the genera *Advenella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*

Штаммы Strains	Ауксин, нг/мл Auxin	Индекс гидролиза Hydrolysis index		Индекс солюбилизации Solubilization index				нитрогеназа, мкг N ₂ /мл/ч nitrogenase	Рост в NaCl, %	Антагонизм, кол-во штаммов Antagonism, strain quantity	
		целлюлозы / cellulose	хитин / chitin	Са ₃ (РО ₄) ₂	Al ₃ PO ₄ x 3H ₂ O	FePO ₄ x 2H ₂ O	фитин / phytin				
<i>A. kashmirensis</i> IBK1	12	3	- ¹	5	1	+ ¹	7	0.07	7	-	
<i>P. extremaustralis</i> IBK13-1A	625	-	-	6	1	1	5.5	0.04	5	-	
<i>P. extremaustralis</i> IBKi13-1B	37	нд nd	+	4	1	+	3.2	0.15	5	-	
<i>P. mandelii</i> IBKi14	772	-	+	2.7	1	+	2.8	—	4	-	
<i>Pseudomonas</i> sp. IBKi13-2	790	-	-	5.5	—	1	6.4	0.24	5	-	
<i>Pseudomonas</i> sp. IBKi11-1	560	2.7	-	5.7	—	1	6	—	5	-	
<i>Pseudomonas</i> sp. IBKi11-2	283	-	-	5	—	1	5.4	0.09	5	-	
<i>Pseudomonas</i> sp. IBKi8-1	81	3.3	+	2	1	+	3	—	5	-	
<i>Pseudomonas</i> sp. IBKi8-2	18	5	+	4	1	+	3.5	0.02	5	1	
<i>Pseudomonas</i> sp. IBKi17	нд	5	-	3	1	1	3	0.05	5	1	
<i>Pseudomonas</i> sp. IBKi-19	7	4.3	-	4.4	1	+	6	0.02	4	-	
<i>B. subtilis</i> IB22	ауксины auxines	36	3.9	-	2	1	—	2	нд nd	7 ³	3
	цитокенины ² cytokinines ²	640									
<i>B. subtilis</i> IB54	нд nd	6.4	-	1	—	+	2.7	0.32	10	20	
<i>B. atrophaeus</i> IB21	ауксины auxines	313	-	2.1	2	1	+	2.4	нд nd	7 ³	15
	цитокенины ² cytokinines ²	10									

Примечание: ¹ – отсутствует активность, + - растворение труднорастворимых фосфатов только под колонией и слабый гидролиз хитина; ² – данные по [Архипова и др., 2006]; ³ - рост при более высоких концентрациях NaCl не изучали; нд – нет данных.

Note: ¹ – no activity, + - dissolution of insoluble phosphates only under the colony and weak hydrolysis of chitin; ² – data on [Arkhipova et al., 2006]; ³ - growth at higher concentrations of NaCl was not studied; nd – no data.

Все изученные штаммы псевдомонад были способны к продукции ауксинов (табл.) Его содержание в культуральной жидкости колебалось от 283 до 790 нг/мл. Среди бацилл лишь у штамма *B. atrophaeus* IB21 выявлена сопоставимая продукция ИУК. Ранее было установлено, что штамм бацилл *B. subtilis* IB22 способен синтезировать значительные количества цитокинина, в отличие от *B. atrophaeus* IB21 (таблица) [Архипова и др. 2006].

Значительным потенциалом к фиксации азота (нитрогеназная активность 0.15-0.24 мкг N₂/мл/ч) обладали три штамма *B. subtilis* IB54, *Pseudomonas* sp. IBKi13-2 и *P. extremaustralis* IBKi13-1B (таблица).

Высокая целлюлазная активность выявлена у пяти штаммов - *B. subtilis* IB54, *B. subtilis* IB22, *Pseudomonas* sp. IBKi8-2, *Pseudomonas* sp. IBKi17, *Pseudomonas* sp. IBKi-19 (индекс гидролиза Na-КМЦ - 4-6). Способность к гидролизу хитина обнаружена у пяти штаммов, причем максимальным потенциалом обладал штамм *B. atrophaeus* IB21 (индекс 2) (таблица). Умеренную галофильность проявляли все изученные бациллы и *A. kashmirensis* IB-K1 (7% NaCl), псевдомонады были способны развиваться лишь при более низких концентрациях соли (таблица). Изучение антагонизма к микроскопическим грибам показало, что наибольшую активность проявляли штаммы из рода *Bacillus*. Среди псевдомонад только два *Pseudomonas* sp. IBKi8-2 и *Pseudomonas* sp. IBKi17 подавляли развитие *B. sorokiniana* (таблица).

Восемь штаммов бактерий, обладающих свойствами ростостимуляции (*A. kashmirensis* IB-K1, *Pseudomonas* (IBKi13-1A, IBKi13-1B, IBKi-14, IBKi-19), *Bacillus* (IB21, IB22, IB54)), были исследованы на взаимный антагонизм. Штаммы рода *Bacillus* подавляли рост *A. kashmirensis* IB-K1, *P. mandelii* IBKi14, *P. extremaustralis* IBKi13-1B, *Pseudomonas* sp. IBKi-19, причем штамм *B. subtilis* IB54 проявлял максимально широкий спектр антагонизма. Следует отметить, что изученные бациллы могли успешно сосуществовать друг с другом. Только штамм *P. extremaustralis* IBK13-1A мог успешно развиваться со всеми исследованными культурами, не проявляя отрицательного влияния на их рост.

Проведенные исследования позволяют выделить группу штаммов (*A. kashmirensis* IB-K1, *P. extremaustralis* IB-K13-1A, *P. mandelii* IBKi14, *B. atrophaeus* IB21, *B. subtilis* IB22, *B. subtilis* IB54), обладающих комплексом свойств PGPR-бактерий, способных положительно влиять на развитие растений (продукция фитогормонов, оптимизация азотного и фосфорного питания, борьба с заболеваниями растений, вызываемых фитопатогенными грибами, повышение засухоустойчивости), которые могут быть перспективными для создания полифункциональных биопрепаратов для растениеводства.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-00577 А.

Литература / References

1. Arkhipova T.N., Melentiev A.I., Martynenko E.V., Kudoyarova G.R., Veselov S.Yu. Comparison of effects of bacterial strains differing in their ability to synthesize cytokinins on growth and cytokinin content in wheat plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2006. 53 (4). P. 507-513. DOI: 10.1134/S1021443706040121 (In Russian - Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Мелентьев А.И., Мартыненко Е.В., Кудоярова Г.Р. Сравнение действия штаммов бактерий, различающихся по способности синтезировать цитокинины, на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы. *Физиология растений*. 2006. 53 (4). С.567-574.)
2. Kuzmina L.Yu., Galimzyanova N.F., Melentiev A.I., Gilvanova E.A., Arkhipova T.N., Ryabova A.S., Aktuganov G.E. Sintez fosfataz fosfatmobiliziruyushchimi bakteriyami rodov *Bacillus*, *Paenibacillus* i *Pseudomonas*. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN*. 2015. №4. С. 77-79. [The synthesis of phosphatase by phosphate-mobilizing bacteria of the genera *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Pseudomonas*] (In Russian - Кузьмина Л.Ю., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И., Гильванова Е.А., Архипова Т.Н., Рябова А.С., Актуганов Г.Э. Синтез фосфатаз фосфатмобилизирующими бактериями родов *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Pseudomonas*. *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2015. №4. С. 77-79.)
3. Menkina R.A. Bakterii, mineralizuyushchie organicheskie soedineniya fosfora. *Mikrobiologiya*. 1950. 19 (4). S 308-315. [Bacteria, mineralizing organic phosphorus compounds] (In Russian - Менкина Р.А. Бактерии, минерализующие органические соединения фосфора. *Микробиология*. 1950. 19 (4). С 308-315.)
4. Moawad M. E.P., Vleck P.L.G. Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian Journal of Crop Science*. 1996. 11 (1). P. 13–23.
5. Muromtsev G.S. Metody izucheniya rastvoreniya fosfatov kal'tsiya mikroorganizmami. *Mikrobiologiya*. 1957. 26 (2). S. 172-178. [Methods for studying the dissolution of calcium phosphates by microorganisms] (In Russian - Муромцев Г.С. Методы изучения растворения фосфатов кальция микроорганизмами. *Микробиология*. 1957. 26 (2). С. 172-178.)
6. Veselov S.U., Kudoyarova G.R., Egutkin N.L., Guili-Zade V.Z., Mustafina A.R., Kof E.M. Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid. *Physiologia Plantarum*. 1992. 86 (1). P. 93–96. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb01316.x