

Обнаружение бактериоциноподобных веществ у ризосферных псевдомонад

Сиунова Т.В., Сизова О.И., Анохина Т.О., Кочетков В.В.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН; siunova@mail.ru

Ризосфера (совокупность корневой системы растений с почвой) – это сложная экологическая ниша, заселенная полезными, вредными или нейтральными по отношению к растению микроорганизмами. В настоящее время нерациональная химизация в растениеводстве приводит к вытеснению полезных микроорганизмов из их природной среды обитания. Поэтому восстановление естественного биологического состояния ризосферы за счет интродукции в нее почвенных микроорганизмов является актуальной проблемой. При разработке биопрепаратов, включающих несколько микроорганизмов, важно учитывать их различные характеристики. Целью работы было изучение совместимости различных штаммов PGPR *Pseudomonas* в условиях периодического культивирования и в ризосфере растений, обусловленной биосинтезом бактериоциноподобных веществ.

Из ризосферы растений было выделено 6 штаммов: *P. chlororaphis(aureofaciens)* Kr31 и *P. brassicacearum* Kr21, *P. lurida* P6-1 и *P. putida* P8-1, *P. chlororaphis* Or3-3, *P. fluorescens* IC7. Эти штаммы были отнесены к группе PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria – ризосферные бактерии, стимулирующие рост растений). Выделенные бактерии обладали набором характерных для данной группы свойств: синтезировали фитогормоны, ПАВ, растворяли трудно-растворимые фосфаты, хорошо колонизировали корни различных растений и стимулировали рост корней проростков. Кроме того, штаммы *P. chlororaphis(aureofaciens)* Kr31, P4-1 и *P. chlororaphis* Or3-3 и синтезировали антибиотикоподобные соединения феназинового ряда, за счет которых подавляли рост фитопатогенных грибов. Методом диффузии в агар выяснилось, что в культуральной жидкости шести штаммов также содержатся бактериоциноподобные вещества (БПВ), подавляющие рост других псевдомонад группы PGPR. Чувствительными к БПВ оказались только четыре штамма (из 17 протестированных), относящихся к виду *P. chlororaphis(aureofaciens)* BS1393, OV17, IG1, P4-1 (табл. 1). Штаммы данного вида синтезируют окси-производные феназина, обеспечивающие оранжевую пигментацию колоний. Это дало возможность идентифицировать их при высеве на агаризованную среду LB после совместного выращивания с другими штаммами в жидкой культуре. Например, через 18 часов совместного культивирования *P. chlororaphis* Or3-3 и *P. chlororaphis(aureofaciens)* P4-1 титр чувствительного штамма P4-1 (8.0×10^7 КОЕ/мл) был почти на два порядка ниже, чем у продуцента БПВ – Or3-3 (1.6×10^{10} КОЕ/мл). При совместном культивировании *P. lurida* P6-1 и *P. chlororaphis(aureofaciens)* P4-1 титр чувствительного штамма (1.6×10^8 КОЕ/мл) был на порядок ниже по сравнению с его титром в монокультуре (3×10^9 КОЕ/мл) и незначительно понижался по сравнению с титром продуцента БПВ – P6-1 (5.8×10^8 КОЕ/мл).

Для выяснения того, происходит ли подавление штаммов непосредственно в ризосфере, стерильные семена пшеницы инокулировали штаммами: *P. chlororaphis* Or3-3 + *P. chlororaphis(aureofaciens)* P4-1 (опыт 1); *P. lurida* P6-1 + *P. chlororaphis(aureofaciens)* P4-1 (опыт 2). Через 14 сут выращивания в стерильном песке, увлажненном минеральной средой Мурашига-Скуга, проводили высевы с корня растения, разделяя его на три части (верхнюю, среднюю и нижнюю). Эксперименты проводили в 3х-кратной повторности. Количество бактерий, выросших на агаризованной среде LB, пересчитывали на 1 см корня. Оказалось, что в данных условиях не происходит подавление штамма *P. chlororaphis(aureofaciens)* P4-1 продуцентами БПВ – *P. chlororaphis* Or3-3 и *P. lurida* P6-1.

Во всех частях корня титр инокулированных бактерий достигал 10^6 КОЕ/см, при этом, их соотношение было постоянным (1 : 1). Поскольку продукция БПВ бактериями наблюдалась в богатой среде LB, вероятно, в вегетационных экспериментах без внесения дополнительных источников углерода было недостаточно питательных веществ в составе корневых экссудатов для продукции БПВ. Поэтому планируется проведение более длительных экспериментов с растениями на различных почвах.

Табл. 1. Подавление штаммов PGPR *Pseudomonas* (метод диффузии в агар)

№	Бесклеточный супернатант штамма	Тестируемые штаммы PGPR							
		1	2	3	4	5	6	7	8–17**
		16H	BS1393	OV17	Kr31	P4-1	IC7	IG1	OV29–P8-2
1	<i>P. chlororaphis</i> 16H*								
2	<i>P. chlororaphis</i> 1393*								
3	<i>P. chlororaphis</i> OV17*								
4	<i>P. chlororaphis</i> Kr31*		+	+		±		±	
5	<i>P. chlororaphis</i> P4-1*								
6	<i>P. fluorescens</i> IC7		+	+		±		±	
7	<i>P. chlororaphis</i> IG1*								
8	<i>P. fluorescens</i> OV29								
9	<i>P. putida</i> O9-10								
10	<i>P. fluorescens</i> A1								
11	<i>P. chlororaphis</i> Or3-3		+	+		±		±	
12	<i>P. brassicacearum</i> Kr21		±	±		±		±	
13	<i>P. protegens</i> 38a								
14	<i>P. fluorescens</i> P2-1								
15	<i>P. protegens</i> P4-2								
16	<i>P. lurida</i> P6-1		±	+		±		±	
17	<i>P. putida</i> P8-2		±	±				±	

Примечания. *Штамм *P. chlororaphis* ранее относился к виду *P. aureofaciens*. **8–17 – Столбцы не показаны из-за отсутствия подавления роста штамма культуральной жидкостью. Номера в первом столбце (бесклеточный супернатант штамма) соответствуют номерам в строке (тестируемый штамм). (±) зона подавления ≤ 5 мм; (+) зона подавления ≥ 5 мм; пустые ячейки – подавление отсутствует.

Бесклеточные супернатанты штаммов-продуцентов БПВ проверяли на чувствительность к ферментам, pH и тепловой обработке. Обработка РНКазой, α -амилазой и липазой С не влияла на антимикробную активность. Обработка протеиназой К приводила к потере активности, однако у штамма *P. chlororaphis* Or3-3 она сохранялась. Активность отсутствовала после прогревания при 60°C в течение 30 мин, при понижении pH до 2.0; в щелочных условиях (pH 9.0) активность сохранялась только у двух штаммов Kr21 и Kr31. Полученные результаты предполагают различную природу БПВ у выделенных ризосферных штаммов и требуют дальнейшего изучения.