

ХИТИНОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS* – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ

О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев, Т.Ф. Бойко, Н.Ф. Галимзянова,
Е.В. Свешникова, Н.Н. Силищев, Г.Э. Актуганов

Институт биологии УНЦ РАН, Уфа, E-mail: gleakt@anrb.ru

CHITINOLYTIC ACTIVITY OF BACTERIA FROM GENUS *PSEUDOMONAS* WHICH ARE POTENTIAL APPLICANTS IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

O.N. Loginov, A.I. Melent'ev, T.F. Boyko, N.F. Galimzianova,
E.V. Sveshnikova, N.N. Silishev, G.E. Aktuganov

Institute of Biology of URC RAS, Ufa, E-mail: gleakt@anrb.ru

ABSTRACT

The five antagonistic strains of *Pseudomonas* were isolated from different sources. The isolates significantly inhibited the growth of broad spectrum of tested plant pathogenic and mould fungi. The bacterial growth in mixed culture resulted in inhibition of fungal spore germination and disturbances in mycelial morphology of some fungi. Only alone bacterium, *Pseudomonas* sp. strain IB 182, was capable to produce extracellular inducible chitinolytic enzymes in nutritional medium containing 0,5% colloidal chitin. The relationship between the chitinolytic properties and antifungal activity of this strain is not found. Probable mechanism of fungal growth inhibition by *Pseudomonas* sp. IB 182 includes production of antibiotics and other secondary metabolites. The strain indicated also a nitrogenase activity comparable with that in nitrogen-fixing bacteria from genus *Azotobacter*. All studied strains have a high potential for application in agricultural biotechnology.

Бактерии рода *Pseudomonas* являются одной из наиболее перспективных групп грам-отрицательных микроорганизмов для создания эффективных биологических средств защиты растений от почвенных фитопатогенов [1]. Это обусловлено как способностью представителей рода *Pseudomonas* стимулировать рост и развитие растений, так и продукцией ими широкого спектра соединений, подавляющих рост фитопатогенной микрофлоры. В основе антагонистического действия псевдомонад лежит синтез миколитических ферментов, сидерофоров, разнообразных антибиотиков, салициловой кислоты, а также летучих соединений, таких, как аммиак и циановодород. Актуальным вопросом современных исследований антагонистической активности бактерий *Pseudomonas* является изучение и оценка роли хитинолитических ферментов в механизмах подавления фитопатогенных грибов. Псевдомонады являются одними из наиболее распространенных продуцентов хитиназ среди грам-отрицательных микроорганизмов. По различным данным, хитинолитическая активность может обнаруживаться у 20–40% почвенных изолятов *Pseudomonas* [1, 2]. Однако сведения об антигрибной активности внеклеточных хитиназ псевдомонад остаются достаточно ограниченными и противоречивыми. Цель настоящей работы заключалась в выделении и отборе новых активных штаммов бактерий-антагонистов рода *Pseudomonas*, оценке их хитинолитической активности и изучении участия хитинолитических ферментов в механизмах антагонистических взаимоотношений псевдомонад с фитопатогенными грибами.

Методом накопительных культур из почвенных образцов Мелеузовского и Иглинского районов республики Башкортостан, а также из сточных вод биологических очистных сооружений г. Орск и г. Стерлитамака было выделено более 180 бактерий, из которых в дальнейшем было отобрано пять изолятов, проявляющих

наиболее высокую антагонистическую активность к фитопатогенным грибам *in vitro*. По совокупности культуральных и физиолого-биохимических свойств отобранные штаммы были отнесены к роду *Pseudomonas*, из них два были идентифицированы как *P. aureofaciens* (ИБ 6, ИБ 51), два — как *P. putida* (ИБ 17, ИБ 56), для штамма ИБ 182 видовая принадлежность не была определена. Выделенные псевдомонады подавляли широкий спектр фитопатогенных и фитотоксичных видов грибов (табл. 1).

Таблица 1. Ингибирование роста фитопатогенных грибов штаммами бактерий рода *Pseudomonas* (на третьи сутки инкубации при 28°C)

Вид фитопатогенных грибов	Диаметр зоны подавления роста гриба, мм				
	<i>P. aureofaciens</i> ИБ 6	<i>P. aureofaciens</i> ИБ 51	<i>P. putida</i> ИБ 17	<i>P. putida</i> ИБ 56	<i>Pseudomonas</i> sp. ИБ 182
<i>Fusarium culmorum</i>	8-14	7-11	12-16	17-19	15-21
<i>F. gibbosum</i>	7-13	33-37	9-15	10-14	6-10
<i>F. graminearum</i>	-	6-8	-	-	-
<i>F. nivale</i>	15-21	29-33	10-14	8-12	7-13
<i>F. oxysporum</i>	8-12	27-31	8-14	6-8	8-12
<i>F. semitectum</i>	11-17	8-10	22-30	19-25	14-16
<i>F. solani</i>	8-12	7-11	10-14	10-14	11-15
<i>F. avenaceum</i>	5-11	14-18	7-11	7-9	8-10
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	34-36	52-58	20-24	26-34	22-28
<i>Alternaria alternata</i>	14-16	16-22	16-20	11-17	12-16
<i>Penicillium funiculosum</i>	-	28-34	12-16	8-12	-

"-" отсутствие зоны подавления роста тест-гриба.

Антагонистическое действие бактерий выразилось в подавлении прорастания спор микромицетов и нарушении морфогенеза грибов - формировании излишне разветвленных, зачастую септированных гиф. В ряду других особенностей воздействия метаболитов псевдомонад на грибы было отмечено, что в зоне антагонистического действия бактерий отдельные представители рода *Fusarium* не формировали воздушный мицелий, при этом у них отсутствовало спорообразование.

Известно, что у некоторых штаммов псевдомонад (*P. fluorescens*, *P. stutzeri*) способность подавлять рост и развитие фитопатогенных грибов взаимосвязана с синтезом эндохитиназы и / или β -1,3-глюканазы [1, 3, 4]. Хитинолитическую активность выделенных бактерий оценивали, выращивая их на агаризованной среде, содержащей 0,5% коллоидного хитина из панцирей креветок. Культивирование осуществляли при 28°C. Активные штаммы выявляли по наличию вокруг колонии бактерий зоны просветления мутной среды. Эффективность гидролиза хитина определяли по величине отношения диаметра зоны просветления к диаметру колонии (D_0/D_c). Полученные результаты показали наличие хитинолитической активности лишь у одного штамма из пяти тестируемых — *Pseudomonas* sp. ИБ 182, величина D_0/D_c у данной культуры составила (табл. 2).

Для активной культуры ИБ 182 был характерен индуцибельный синтез внеклеточной хитиназы, который определялся содержанием специфического субстрата в питательной среде. При концентрациях хитина в среде более 0,1% (в/о) дальнейшие вариации в хитиназной активности штамма зависели от его ростовых характеристик. Однако анализ взаимодействия штамма ИБ 182 в смешанной культуре с фитопатогенными грибами не выявил повышения его хитиназной активности по сравнению с контролем. Эти данные согласуются с отсутствием миколитического эффекта при воздействии живой культуры и внеклеточных метаболитов

ИБ 182 на микромицеты. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии взаимосвязи между синтезом хитинолитических ферментов и антагонистической активностью исследуемых штаммов *Pseudomonas*. По всей видимости, основной механизм подавления роста фитопатогенных грибов этими бактериями заключается в продукции антибиотических веществ и других вторичных метаболитов. Тем не менее, данный факт не исключает существенной роли хитинолитических (и иных) ферментов в антагонистической и миколитической активности других штаммов псевдомонад [1, 3, 4]. Существует также точка зрения о необходимости комплексного взаимодействия хитиназ с антибиотическими веществами для эффективного лизиса гиф фитопатогенных микромицетов некоторыми видами бактерий *Pseudomonas* [5].

Кроме исследований антагонистической активности отобранные штаммы были описаны с точки зрения свойств, характерных для PGPR (ростстимулирующих) микроорганизмов (табл. 2). В результате у штаммов *P. aureofaciens* ИБ 6 и ИБ 51 была обнаружена способность к продукции цитокининоподобных веществ и ИУК; штаммы *P. putida* ИБ 17, ИБ 56 и *Pseudomonas* sp. ИБ 182 растворяли неорганические фосфаты. ИБ 182 – единственный штамм, обладающий хитинолитической активностью, обладал также азотфиксирующей активностью, что достаточно редко встречается у представителей рода *Pseudomonas*. Нитрогеназная активность штамма, определенная с помощью стандартного метода восстановления ацетилена, составляла 0,43 мкг N₂/мл/час, что было сопоставимо с аналогичной характеристикой для бактерий рода *Azotobacter* – типичных представителей азотфиксирующих микроорганизмов. Сейчас известно, что некоторые псевдомонады принимают участие в процессе азотфиксации. С агрономической точки это имеет большое значение, поскольку обогащение почвы азотом положительно влияет на развитие и урожайность сельскохозяйственных культур.

Таблица 2. Характеристика выделенных штаммов псевдомонад как ростстимулирующих (PGPR) микроорганизмов

Штамм	Цитокининоподобные вещества, нг/мл КЖ	ИУК, нг/мл КЖ	Нитрогеназная активность, мкг N ₂ /мл/ч	Хитинолитическая активность, Do/Dc	Растворение минеральных фосфатов	Минерализация органических фосфатов
<i>P. aureofaciens</i> ИБ 6	680	511	–	–	–	–
<i>P. aureofaciens</i> ИБ 51	205	878	0,08	–	–	–
<i>P. putida</i> ИБ 17	–	255	–	–	+	–
<i>P. putida</i> ИБ 56	40	38	–	–	+	–
<i>Pseudomonas</i> sp. ИБ 182	18	–	0,43	5,75	+	–

Таким образом, все выделенные штаммы *Pseudomonas* по своим свойствам являются потенциальными объектами агробιοтехнологий для разработки на их основе биологических средств защиты растений от фитопатогенов. Наибольший интерес в качестве антагониста, обладающего высокой хитинолитической активностью и способностью к азотфиксации, представляет культура *Pseudomonas* sp. Данный штамм был запатентован в Российской Федерации (Патент № 2187553) и поддерживается в Коллекции микроорганизмов Института биологии УНЦ РАН под номером 182.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nielsen M.N., Sørensen J., Fels J., Pedersen H.C. Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64, N. 10. P. 3563–3569.
2. De Boer W., Gunnewiek P.J.A.K., Lafeber P., Janse J.D., Spit B.E., Woldendorp J.W. Antifungal properties of chitinolytic dune bacteria // Soil Biol. Biochem. 1998. V. 30, N. 2. P. 193–203.

3. *Lim H.-S., Kim Y.-S., Kim S.-D.* *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57, N. 2. P. 510–516.

4. *Nagarajkumar M., Bhaskaran R., Velazhahan R.* Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen // *Microbios. Res.* 2004. V. 159, N. 1. P. 73–81.

5. *Wang S.-L., Yieh T.-C., Shih I.-L.* Purification and characterization of a new antifungal compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium // *Enzyme Microb. Technol.* 1999. V. 25. P. 439–446.