

УДК 574.24 579.26 579.64

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОДУКЦИИ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ШТАММАМИ  
*PSEUDOMONAS PROTEGENS* А-СМС-05 И *GORDONIA PARAFFINIVORANS* А-СМС-11  
ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**А.Н. Сысоева<sup>1,2</sup>, А.Л. Герасимчук<sup>1</sup>, А.Е. Паталаха<sup>1</sup>, Д.А. Ивасенко<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Томский государственный университет, г. Томск, Российская Федерация

<sup>2</sup>ООО «Дарвин», г. Томск, Российская Федерация

В статье приведены результаты экспериментов по изучению биотехнологически значимых физиологических характеристик изолятов из сточных вод городских очистных сооружений *Pseudomonas protegens* и *Gordonia paraffinivorans*, включая ингибирование роста фитопатогенного гриба рода *Fusarium* и стимулирование ризогенеза у растений барбариса (*Berberis thunbergii* Aurea). Для штамма *P. protegens* А-СМС-05 выявлены более высокие показатели по всем исследованным характеристикам, таким как эффективность ингибирования фитопатогена и процент эксплантов с признаками ризогенеза.

**Ключевые слова:** сельскохозяйственные биотехнологии, микроорганизмы – продуценты биоактивных веществ, *Pseudomonas protegens*, *Gordonia paraffinivorans*, антагонизм фитопатогенным микроорганизмам, стимулирование роста растений, ризогенез, *Berberis thunbergii* Aurea

**STUDY OF BIOACTIVE SUBSTANCES PRODUCTION BY STRAINS *PSEUDOMONAS PROTEGENS* А-CMS-05 AND *GORDONIA PARAFFINIVORANS* А-CMS-11 FOR USE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY**

**A.N. Sysoeva<sup>1,2</sup>, A.L. Gerasimchuk<sup>1</sup>, A.E. Patalakha<sup>1</sup>, D.A. Ivashenko<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

<sup>2</sup>Darwin LLC, Tomsk, Russian Federation

The article presents the experiments results to study biotechnologically significant physiological characteristics of isolates from municipal treatment plants wastewater *Pseudomonas protegens* and *Gordonia paraffinivorans*, including growth inhibition of phytopathogenic fungus of the genus *Fusarium* and rhizogenesis stimulation in barberry plants (*Berberis thunbergii* Aurea). *P. protegens* А-CMS-05 showed higher values for all studied characteristics, such as phytopathogen inhibition efficiency and percentage of explants with rhizogenesis signs.

**Keywords:** agricultural biotechnology, microorganisms - producers of bioactive substances, *Pseudomonas protegens*, *Gordonia paraffinivorans*, antagonism to phytopathogens, plant growth stimulation, rhizogenesis, *Berberis thunbergii* Aurea

**Введение.** В настоящее время во всем мире сельскохозяйственная промышленность сталкивается с необходимостью производства всё большего количества продуктов питания для удовлетворения растущего спроса населения, а также проблемами последствий загрязнения окружающей среды, изменения климата и нехватки воды, которые снижают урожайность сельскохозяйственных культур. Чрезмерное использование химических удобрений привело к различным негативным последствиям, таким как накопление вредных элементов в почве,

загрязнение грунтовых, снижение содержания органического вещества в почве и ее плодородия вместе с ухудшением физических и химических свойств почвы [1, 2]. Таким образом, современное сельскохозяйственное производство в различных странах мира сталкивается с необходимостью решения сразу двух важнейших проблем, а именно защиты сельскохозяйственных культур от вредителей, болезней и сорняков и защиты окружающей среды от техногенного загрязнения.

В последние годы особое внимание уделяется промышленному потенциалу микроорганизмов для использования в качестве биологических удобрений, их способности улучшать доступность питательных веществ, усиливать рост и продуктивность растений и защищать окружающую среду от негативных воздействий [3].

В настоящем исследовании изучали ростостимулирующие и биопротекторные свойства штаммов *Pseudomonas protegens* A-СМС-05 и *Gordonia paraffinivorans* A-СМС-11, выделенных нами ранее из городских очистных сооружений г. Сурабая, Индонезия [4].

**Методы исследования.** Для культивирования штаммов бактерий использовали среду РСА (plate count agar), агаризованную или жидкую среду на основе гидролизата рыбной муки (ГРМ), а также минеральную среду [4] с добавлением 1 % пальмового масла в качестве источника углерода. Для определения оптимальных условий для культивирования штаммов проводили посеы при разных значениях рН (от 3 до 10) и температур (+4, +15, +28, +32, +35, +40 °С).

Количественное определение липолитической активности проводили по модифицированному методу Ота-Ямада с оливковым маслом в качестве субстрата [5].

Антагонистическую активность штаммов по отношению друг к другу определяли методом перекрестных штрихов. Чашки с агаризованной средой инокулировали бактериальным штаммом, нанося одну полоску в середине чашки, и инкубировали при 28°С в течение ночи. Затем засекали чашку другим штаммом одной полоской, перпендикулярной выросшему бактериальному штамму. Появление зоны отсутствия роста будет свидетельствовать об ингибировании второго штамма первым.

Для выявления ингибирующего эффекта штаммов *P. protegens* A-СМС-05 и *G. paraffinivorans* A-СМС-11 на рост и развитие патогенных микроорганизмов выбран штамм фитопатогенного гриба *Fusarium* sp. D1. Эксперимент проводили на среде для грибов-микромикотетов (МЭ – мальтозный экстракт), а также РСА. 0,1 мл свежей жидкой бактериальной культуры высевали чашки с агаризованной средой и равномерно распределяли по поверхности агара с помощью шпателя. Далее на инокулированные чашки помещали два фрагмента свежесвыращенного грибного мицелия на расстоянии друг от друга не менее 3 см. Культивирование проводили при 28°С в течении 5 суток. Ингибирующий эффект бактериальных штаммов определяли с помощью измерения диаметра зоны ингибирования роста патогенного штамма гриба и расчета по формуле, как описано ранее [6]. Эксперимент проводили отдельно для каждого бактериального штамма в трех независимых повторностях.

Для эксперимента по стимулированию корнеобразования штаммами *P. protegens* A-СМС-05 и *G. paraffinivorans* A-СМС-11 выбран барбарис Тунберга (*Berberis thunbergii* Aurea), для которого не удалось подобрать оптимальной питательной среды для ризогенеза. Экспланты барбариса, полученные микроклональным размножением, без признаков ризогенеза были высажены в стерильную почву, обработанную раствором культуральной жидкости с концентрацией  $10^8$  кл/мл. Для каждого штамма проводили отдельный эксперимент. В каждом эксперименте использовали 66 эксплантов барбариса. В качестве контроля высаживали экспланты в стерильную почву без какой-либо обработки. Дополнительный контрольный эксперимент включал обработку нестерильной почвы регулятором роста растений (препарат «Корневин», содержащий индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) в качестве действующего вещества), а также внесение биопрепарата на основе гриба *Trichoderma* для подавления нежелательной микрофлоры. Общая продолжительность эксперимента составила 5 недель. Эксперимент проводился при комнатной температуре. Первые 2 недели экспланты находились

под герметичными прозрачными крышками для поддержания высокой влажности и адаптации эксплантов. В следующие 3 недели влажность постепенно снижали за счет нарушения герметичности крышек. Когда вся влага испарилась, растения были извлечены из почвы и проведен подсчет эксплантов с признаками ризогенеза. Статистическая обработка полученных данных проведена с применением t-критерия Стьюдента. Отличия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Представители *Pseudomonas* и *Gordonia* широко распространены в природе и активно изучаются благодаря своей способности разлагать, преобразовывать и синтезировать органические соединения [7-8]. *P. protegens* известен как стимулирующая рост растений ризобактерия [9]. Для *G. paraffinivorans* не обнаружено опубликованных данных об исследовании их потенциала в качестве стимуляторов роста растений или свойств биоконтроля, однако подобные работы есть для других представителей рода *Gordonia* [10].

Ранее нами для обоих штаммов были показаны липофильные свойства при культивировании на диагностической и селективной питательной среде [4], а также измерена продукция липаз ( $24,1 \pm 6,2$  мкМ/ч\*мл и  $42,5 \pm 6,6$  мкМ/ч\*мл для А-СМС-11 и А-СМС-05, соответственно), что свидетельствует о способности штаммов к эффективной деструкции жиродержащих веществ.

На первом этапе изучали оптимальные условия для культивирования штаммов *P. protegens* А-СМС-05 и *G. paraffinivorans* А-СМС-11. Диапазон температур для роста составил 4 - 40 °С для А-СМС-11 и 4 - 35 °С для А-СМС-05 с оптимумом при 32-35°С и 28-32 °С, соответственно. Оба штамма росли в диапазоне значений рН от 4 до 10 с оптимумом 7,5 и 8-9 для А-СМС-11 и А-СМС-05, соответственно.

Далее исследовали ингибирующую активность штаммов по отношению к фитопатогенному грибу рода *Fusarium*. При совместном культивировании *Fusarium* D1 в присутствии каждого из бактериальных штаммов наблюдали изменение морфологии мицелия гриба и ингибирование зоны роста (рис. 1). Ингибирование роста мицелия составило от 9 до 29 % для штамма А-СМС-11 и не менее 66 % для штамма А-СМС-05.

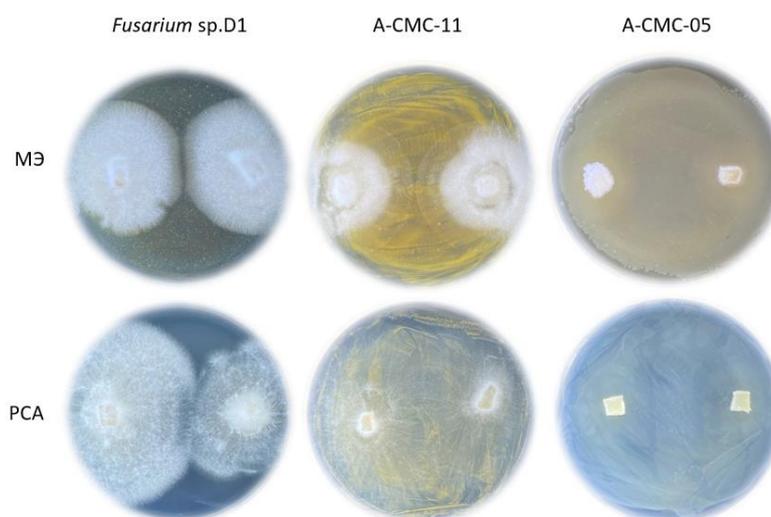


Рисунок 1. Подавление роста *Fusarium* sp. D1 при совместном культивировании со штаммами А-СМС-11 и А-СМС-05 при 28 °С в течении 5 сут. МЭ – мальтозный экстракт, РСА – plate count agar

Помимо исследования потенциала штаммов в качестве агентов биоконтроля путем оценки их способности ингибировать фитопатогенные грибы, проведен эксперимент по изучению

ростостимулирующих свойств, а именно синтезу биоактивных веществ, способствующих ризогенезу эксплантов барбариса (рис. 2, 3).



Рисунок 2. Экспланты барбариса Тунберга (*Berberis thunbergii* Aurea) в начале эксперимента (А), без признаков ризогенеза (Б) и с корнями (В), образованными в ходе эксперимента

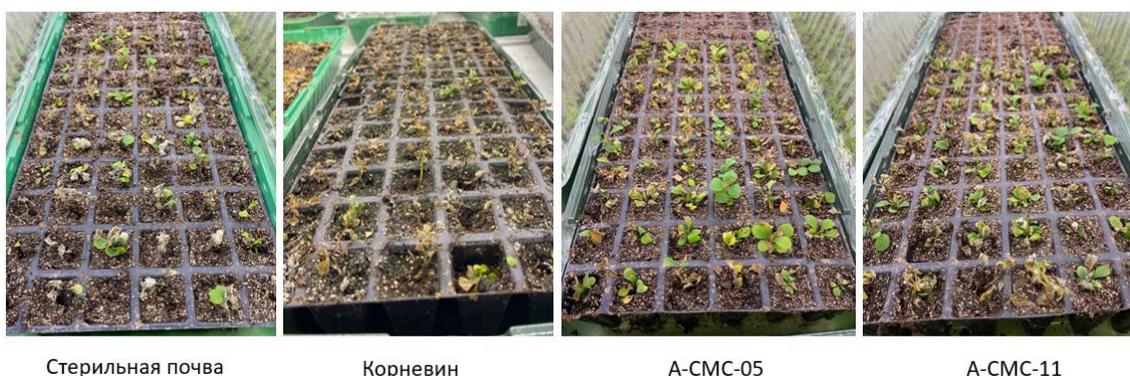


Рисунок 3. Внешний вид эксплантов барбариса Тунберга (*Berberis thunbergii* Aurea) по окончании эксперимента по стимулированию корнеобразования штаммами *Pseudomonas protegens* А-СМС-05 и *Gordonia paraffinivorans* А-СМС-11

В итоге у 8 из 66 эксплантов (12,1 %), высаженных в стерильную почву, обработанную раствором культуральной жидкости штамма А-СМС-05, наблюдали процессы ризогенеза. В эксперименте со штаммом А-СМС-11 образование корней выявлено у 5 эксплантов (7,5 %). В контрольном эксперименте с добавлением коммерческого препарата «Корневин» эффективность ризогенеза составила 15 % (10 эксплантов из 66 образовали корни в ходе эксперимента). Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что штамм А-СМС-05 обладает более выраженными свойствами, способствующими ризогенезу у использованных в качестве объекта исследования растений барбариса и его эффективность в стимулировании ризогенеза сравнима с эффективностью препарата на основе ИУК.

Следует отметить, что штаммы А-СМС-05 и А-СМС-11 не проявляют антагонистической активности в отношении друг друга и могут быть использованы в составе консорциума. Будущие исследования позволят оценить эффективность совместного использования штаммов для стимулирования ризогенеза, ингибирования фитопатогенов и т.д.

**Заключение.** Проведенные исследования продемонстрировали потенциал штаммов *P. protegens* А-СМС-05 и *G. paraffinivorans* А-СМС-11 в качестве агентов биоконтроля и стимуляторов роста растений. Штамм *P. protegens* А-СМС-05 показал более значимые результаты и является более перспективным агентом для дальнейших исследований ростостимулирующих и биопротекторных свойств.

**Благодарности.** Исследование выполнено при поддержке Гранта № 075-15-2022-1152 (Постановление № 619 от 8 апреля 2022 г.).

**Библиографический список**

1. Sun Z., X. Duan, Y. Xie, et al. Nutrient supplying capacity of typical black soil and fertilizer use efficiency of soybean in Heilongjiang province Chin // Agric. Sci. Bull. 2012. V. 28 P. 46–51.
2. Fróna D., Szenderák J., Harangi-Rákos M. The Challenge of Feeding the World // Sustainability. 2019. V. 11. P. 5816.
3. Lee J.A., E.S.G. Cheah, S. Sethupathi, N.I.M. Ismail. Isolation and characterization of effective microorganisms from palm oil sludge for enhancement of spent bio-adsorbents from aquaculture wastewater treatment // Materials Today: Proceedings. 2023.
4. Герасимчук А.Л. Поиск и выделение липофильных бактерий для утилизации отходов производства пальмового масла / Герасимчук А.Л., Ивасенко Д.А., Трифонов А.А., Топилина Ю.С., Сысоева А.Н., Франк Ю.А. // Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (25 сентября 2023, Москва). 2023. Вып. 21. С. 112–113.
5. Демьянцева Е.Ю., Копнина Р.А. Ферментативный катализ в цдп: учебно - методическое пособие/СПбГТУРП. СПб., 2014. С. 1–47.
6. Whipps J.M. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi // J New phytol. 1987. V. 107(1). P. 127–142.
7. Afonso L., B. Gionco-Cano, A.S. Simionato, E.T.G. Niekawa, G.E.A. Pega et al. Chapter 3 - Microbial bioactive compounds in plant disease management / Editor(s): A. Kumar, S. Droby. Food Security and Plant Disease Management, Woodhead Publishing, 2021. P. 37–61.
8. Silva N.M., de Oliveira A.M.S.A., Pegorin S., Giusti C.E., Ferrari V.B., Barbosa D. et al. Characterization of novel hydrocarbon-degrading *Gordonia paraffinivorans* and *Gordonia sihwensis* strains isolated from composting // PLoS ONE. 2019. V. 14 (4). P. e0215396.
9. Yang Y. The antibiotic metabolites genes of *Pseudomonas fluorescens* // China Biotechnol. 2012. V. 32. P. 100–106.
10. Kayasth M., Kumar V., Gera R. *Gordonia* sp.: a salt tolerant bacterial inoculant for growth promotion of pearl millet under saline soil conditions // 3 Biotech. 2014. V. 4(5). P. 553–557.