

УДК 623.937+579.841.11

И.Н. ФЕКЛИСТОВА, Н.П. МАКСИМОВА

**ПРИМЕНЕНИЕ СИНТЕЗИРУЮЩИХ АНТИБИОТИКИ ФЕНАЗИНОВОГО РЯДА
БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS AURANTIACA* ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО
КОНТРОЛЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПШЕНИЦЫ**

It is established that the high level of antibiotics synthesis in phenazine overproducers *P. aurantiaca* B-162/498 bacteria correlates with their increase of antibacterial (on 35 %) and antifungal (on 30÷50 %) activity. Antifungal activity was shown *in vitro* and *in planta* in an example of mutant *P. aurantiaca* B-162/498, synthesizing 205,32 mg/l of phenazine antibiotics, that was demonstrated in an inhibition of fungus vegetative function and suppression of infections development caused by *F. culmorum*, *F. semitectum*, *F. moniliforme* and *F. avenaceum*, and also nonspecific phytotoxic action concerning wheat was removed. It is shown, that *P. aurantiaca* bacteria, producing phenazine antibiotics, are capable to stimulate plants growth on 19÷45 %.

Бактерии, обладающие совокупностью полезных для растений свойств, принято обозначать как PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), т. е. ризобактерии, способствующие росту растений. Среди PGPR различных таксономических групп выделяются ризосферные бактерии рода *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens*), которые наряду с ростостимулирующей активностью проявляют антагонизм в отношении фитопатогенных микроорганизмов и являются потенциальными объектами агробиотехнологии. Среди них наиболее известны штаммы *P. fluorescens* 2-79, *P. fluorescens* СНА0, *P. chlororaphis* МА342 и *P. chlororaphis* 30-84, которые с успехом используются в качестве основы препаратов для защиты растений от заболеваний различной этиологии [1–3].

Существует несколько механизмов, определяющих антимикробную активность бактерий *Pseudomonas* в отношении фитопатогенов, например синтез сидерофоров, цианида и антибиотиков (ациклического и ароматического строения, производных хинолина, полипептидов, β -лактамных антибиотиков и др.). Среди синтезируемых бактериями антибиотиков наибольший интерес представляют антибиотики феназинового ряда. Феназины обладают широким спектром антимикробного действия относительно грибов и бактерий, в основе которого лежит нарушение клеточного дыхания, что приводит к избыточному накоплению O_2^- и H_2O_2 и в конечном счете к гибели клетки. За исключением нескольких штаммов *P. fluorescens*, синтезирующих лишь феназин-1-карбоксилат, бактерии *Pseudomonas* обычно образуют два и более типа антибиотиков феназинового ряда. Целью работы явилось получение штаммов *Pseudomonas aurantiaca*, способных к сверхпродукции антибиотиков феназинового ряда, и изучение их антагонистической активности в отношении фитопатогенных грибов, вызывающих заболевания пшеницы.

Материал и методика

Объектом исследований служил штамм *P. aurantiaca* В-162 из коллекции кафедры генетики БГУ. Бактерии культивировали в течение 2 сут при 28 °С на круговой качалке (180 об/мин) в жидкой питательной среде М9 [4]. Для изучения синтеза антибиотиков феназинового ряда бактерии выращивали на среде следующего состава (г/л): Difco пептон – 20, глицерол – 10, NaCl – 5, KNO_3 – 1, pH 7,2. Продукцию феназиновых соединений определяли спектрофотометрически (длина волны 369 нм) по методу, предложенному Левич [5].

Мутанты получали с помощью N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (НГ) (200 мкг/мл) в цитратном буфере (pH 5,5) при 28 °С (время обработки 40 мин). Отмытые от мутагена с помощью центрифугирования (8000 g) клетки высевали на агаризованную среду М9, содержащую соответствующий аналог (*m*-фтор-DL-фенилаланин, азасерин или 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин) в необходимой концентрации, и культивировали 5 сут.

Штаммы фитопатогенных микроорганизмов культивировали в соответствии с методами, изложенными в [6]. Фитопатогенные грибы рода *Fusarium* выращивали в течение 7 сут на агаризованной картофельной среде, содержащей глюкозу (0,4 %). Для изучения способности бактерий *P. aurantiaca* В-162 подавлять вегетативную функцию грибов в системе *in vitro* на 1,5 % картофельную агаризованную среду высевали суспензию спор ($10^4 \div 10^5$ спор/мл) исследуемого фитопатогенного гриба и в центр чашки помещали участок агара (диаметр 0,5 см) с 48-часовой бактериальной культурой и инкубировали при 28 °С. Способность бактерий *P. aurantiaca* В-162 подавлять вегетативный рост фитопатогенных грибов (в зависимости от их вида) определяли через 7–10 сут путем измерения диаметра зоны задержки роста мицелия вокруг агарового диска.

С целью изучения способности феназин-продуцирующих бактерий *P. aurantiaca* подавлять развитие фитопатогенных грибов в системе *in planta* стерильный грунт (200 мл) обрабатывали водной суспензией (30 мл), содержащей 28-часовую культуру исследуемого бактериального штамма (10^7 КОЕ/мл) и мицелий гриба, выращенного в жидкой картофельной среде в течение 7 сут (8 мл культуры/30 мл суспензии) [7], контрольный вариант содержал стерильную полноценную питательную среду для культивирования бактерий. Семена растений помещали на подготовленный грунт и покрывали слоем земли (1 см), растения выращивали при температуре 15 ± 1 °С с 12-часовым фотопериодом. Измерения массы проростков и корней проводили на 20-е сут [8].

Результаты и их обсуждение

Ранее с использованием HPLC-анализа было установлено, что комплекс феназиновых антибиотиков бактерий *P. aurantiaca* представлен феназином, 1-оксифеназином и их общим предшественником феназин-1,6-дикарбоксилатом [9]. В серии предварительных экспериментов с использованием НГ-

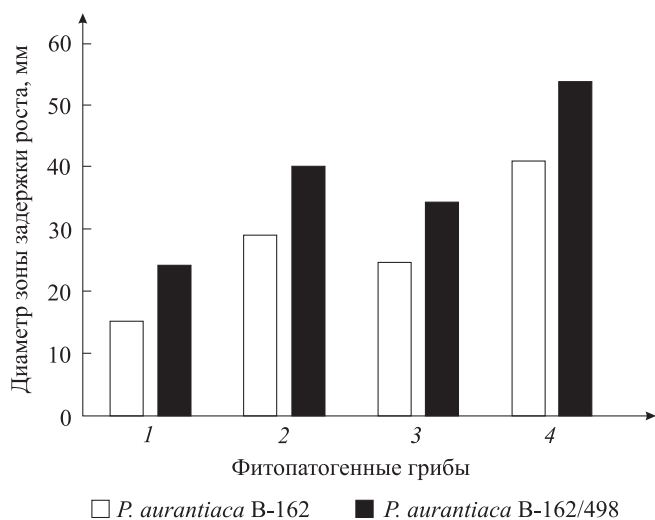


Рис. 1. Антифунгальная активность *P. aurantiaca* B-162 и *P. aurantiaca* B-162/498 в системе *in vitro*: 1 – *F. avenaceum*, 2 – *F. culmorum*, 3 – *F. semitectum*, 4 – *F. moniliforme*

активности, чем исходный штамм *P. aurantiaca* B-162. Для подтверждения данного предположения было проведено сравнение способности штаммов *P. aurantiaca* B-162 и *P. aurantiaca* B-162/498 подавлять развитие грибов *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. semitectum* и *F. moniliforme*, вызывающих заболевания пшеницы, в системах *in vitro* и *in planta*.

Установлено, что антифунгальная активность мутанта *P. aurantiaca* B-162/498 с повышенным уровнем образования феназинов зависит от количества продуцируемых им феназиновых антибиотиков в системе *in vitro*: диаметр зоны задержки роста тест-культур увеличивался в 1,3–1,6 раза по сравнению с контролем (исходный штамм *P. aurantiaca* B-162) в случае *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. semitectum* и *F. moniliforme* (рис. 1) и в 1,4 раза в случае *F. culmorum* (рис. 2).

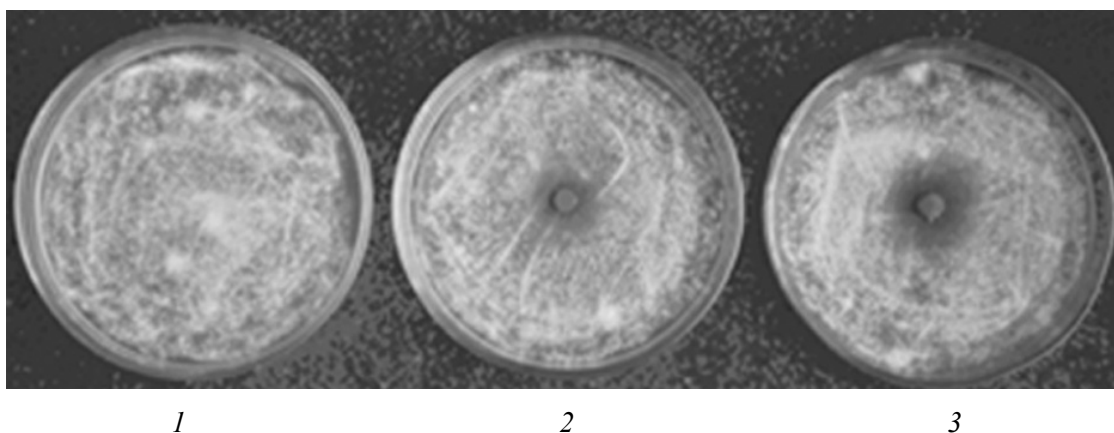


Рис. 2. Подавление развития *F. culmorum* бактериями *P. aurantiaca* B-162 и *P. aurantiaca* B-162/498. 1 – контроль, 2 – *P. aurantiaca* B-162, 3 – *P. aurantiaca* B-162/498

Интересным представлялось исследование антагонистических свойств штамма-продуцента антибиотиков феназинового ряда *P. aurantiaca* B-162/498 в условиях *in planta*. Для этого растения пшеницы высаживали в инфицированную фитопатогенными грибами почву и обрабатывали бактериальной культурой (10^7 КОЕ/мл), полученной на основе штамма *P. aurantiaca* B-162/498. Изучение антифунгальной активности штаммов *P. aurantiaca* в ризосфере пшеницы проводилось по схеме, предложенной в [11].

Повышение эффективности подавления фитопатогенных организмов в присутствии сверхпродуцентов антибиотиков феназинового ряда прослеживалось в экспериментах со всеми исследованными возбудителями фузариоза пшеницы: *F. culmorum*, *F. semitectum*, *F. moniliforme* и *F. avenaceum*. Установлено, что при выращивании растений на инфицированной фитопатогенными грибами почве сред-

мутагенеза и последующим отбором на токсических аналогах метаболитов ароматического пути (азасерине, *m*-фтор-DL-фенилаланине и 6-диазо-5-оксо-L-норлейцине) были получены регуляторные аналого-резистентные мутанты *P. aurantiaca*, способные к сверхпродукции антибиотиков феназинового ряда [10]. Наибольший уровень синтеза феназиновых соединений, зарегистрированный у штамма *P. aurantiaca* B-162/498, составлял $205,32 \pm 1,91$ мг/л, что в 2,8–3 раза превышает таковой у исходного штамма (продукционная способность *P. aurantiaca* B-162 $71,11 \pm 2,72$ мг/л) и в 10 раз у известных в этом отношении бактерий *P. chlororaphis* и *P. aeruginosa* [5].

Было сделано предположение, что регуляторные мутанты, способные к сверхпродукции феназиновых соединений, характеризуются более высоким уровнем антимикробной

няя масса проростков была в $1,37 \div 1,54$ раза ниже, чем у обработанных бактериями *P. aurantiaca* В-162 (рис. 3). Обработка же зараженных растений клетками бактерий-сверхпродуцентов феназиновых антибиотиков *P. aurantiaca* В-162/498 привела к большему подавлению фитопатогенных грибов, вследствие чего средняя масса проростков увеличилась в $1,46 \div 1,74$ раза. Ингибирование роста *F. culmorum*, *F. semitectum*, *F. moniliforme* и *F. avenaceum* при внесении бактерий *P. aurantiaca* В-162 и *P. aurantiaca* В-162/498 выражалось и в увеличении массы корней растений пшеницы в $1,12 \div 1,33$ и $1,15 \div 1,43$ раза соответственно.

Результаты экспериментов свидетельствуют о более эффективном подавлении продуцентами феназиновых антибиотиков развития инфекции, вызванной представителями рода *Fusarium*.

Сходные результаты описаны в работе с генно-инженерными продуцентами *P. fluorescens* z34-97 и *P. fluorescens* z33-97, полученными путем клонирования феназинового оперона из *P. fluorescens* 2-79 в бактериях *P. fluorescens* Q8r1-96 и способными к сверхпродукции антибиотиков феназинового ряда. Уровень продукции феназин-1-карбоксилата у указанных штаммов был в $1,5 \div 2,7$ раза выше, чем у исходного штамма. При обработке растений бактериальными суспензиями *P. fluorescens* z34-97 и *P. fluorescens* z33-97 было зарегистрировано снижение поражения пшеницы фитопатогенными грибами *G. graminis* и *R. solani* на 40 % [12].

Следует отметить, что клетки как исходного штамма *P. aurantiaca* В-162, так и мутантных бактерий *P. aurantiaca* В-162/498, синтезирующие 205,32 мг/л феназиновых антибиотиков, не вызывали угнетения развития растений. Установлено, что при внесении в почву суспензии клеток бактерий *P. aurantiaca* В-162 либо *P. aurantiaca* В-162/498 наблюдается стимуляция роста побегов (в 1,45 раза) и корневой системы (в 1,19 раза) пшеницы (таблица). Известно, что стимуляция роста растений может быть вызвана синтезом бактериями гиббереллинов, ауксинов и цитокининов, а также витаминов группы В.

Стимуляция роста побегов и корней растений пшеницы феназин-продуцирующими бактериями *P. aurantiaca* В-162 и *P. aurantiaca* В-162/498

Вариант опыта	Масса проростков пшеницы, мг	Масса корней пшеницы, мг
Контроль	21,89±1,46	54,44±1,38
<i>P. aurantiaca</i> В-162	31,55±1,37	67,33±0,81
<i>P. aurantiaca</i> В-162/498	31,78±2,3	67,22±1,14

Таким образом, помимо антифунгальной активности бактерии исследуемых штаммов способны стимулировать рост и развитие растений.

1. Weller D.M., Cook R.J. // Phytopathol. 1981. Vol. 71. P. 1007.
2. Weller D.M., Cook R.J. // Ibid. 1983. Vol. 73. P. 463.

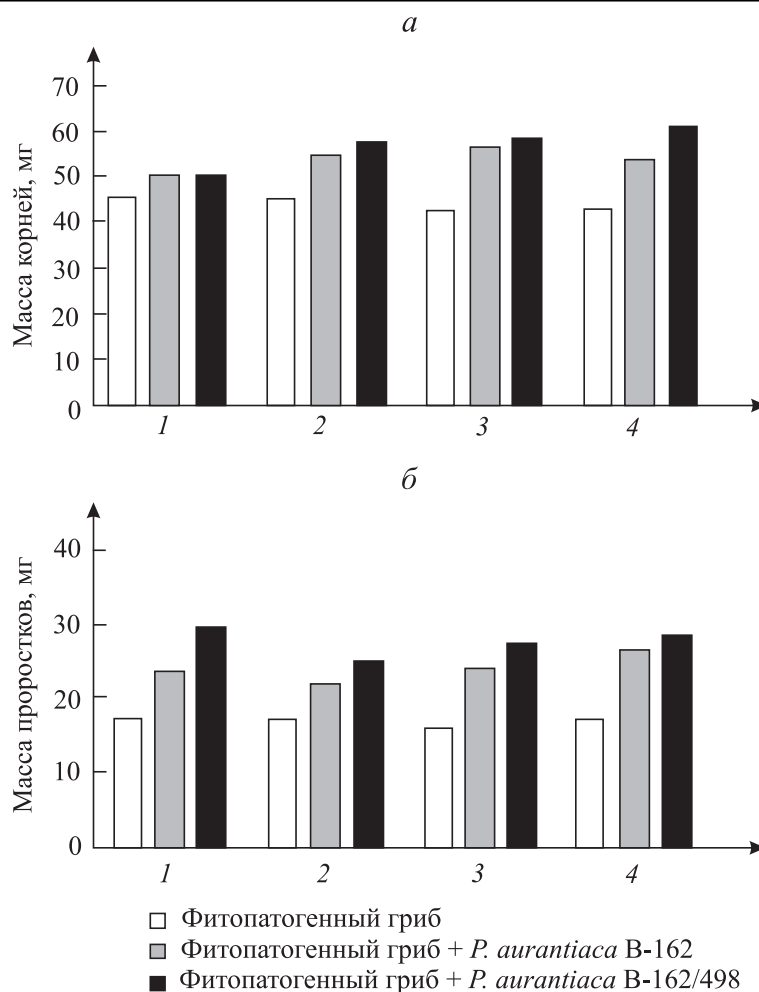


Рис. 3. Влияние бактерий *P. aurantiaca* В-162 и *P. aurantiaca* В-162/498 на массу корней (а) и проростков (б) растений пшеницы, культивируемых на почве, инфицированной *F. avenaceum* (1), *F. culmorum* (2), *F. semitectum* (3) и *F. moniliforme* (4)

3. Weller D., Rovira A. // Ibid. 1984. Vol. 74. P. 806.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984.
5. Levitch M. E. // J. Bacteriol. 1970. Vol. 103. P. 16.
6. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии. М., 1984.
7. Rodriguez F., Pfender W. // Phytopathol. 1997. Vol. 87. P. 614.
8. Vincent M. N., Harrison L. A., Brackin J. M. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1991. Vol. 57. P. 2928.
9. Феклистова И. Н., Максимова Н. П. // Вестн. БГУ. Сер. 2. 2005. № 2. С. 66.
10. Feklistova I. N., Maximova N. P. // Microbiology. 2008. Vol. 77. P. 176.
11. Thomashow L. S., Weller D. M. // J. Bacteriol. 1988. Vol. 170. P. 3499.
12. Huang Z., Bonsall R. F., Mavrodi D. V. et al. // FEMS Microbiol. Ecol. 2004. Vol. 49. P. 243.

Поступила в редакцию 02.03.09.

Ирина Николаевна Феклистова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ молекулярной генетики бактерий.

Наталья Павловна Максимова – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой генетики.