

## РОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНОГО СИДЕРОФОРА ПИОВЕРДИНА В АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *PSEUDOMONAS PUTIDA*

The ability of rhizosphere bacteria *Pseudomonas putida* KMBU 4308 to inhibit *Alternaria* phytopathogen fungus rise was investigated. The role of pyoverdine in this interaction has been analyzed. It was shown that *P. putida* KMBU 4308 are characterized by strong antifungal activity, which is not connected with pyoverdine synthesis.

Необходимость дополнения химических приемов защиты растений экологически безопасными биологическими методами уже давно не вызывает сомнений. В настоящее время наиболее интенсивно ведется поиск природных антагонистов фитопатогенов из числа бактерий, способных продуцировать разнообразные биологически активные вещества, осуществлять биodeградацию органических и неорганических загрязнителей почвы и переводить малорастворимые соединения (например, фосфаты) в доступную для растений форму [1–3].

Среди потенциальных кандидатов для создания биопрепаратов микробного происхождения особого внимания заслуживают бактерии рода *Pseudomonas*, относящиеся к ризосферным микроорганизмам, обладающим выраженными антибактериальными, антифунгальными и антинематодными свойствами [1, 3–5]. Многими исследователями отмечалась способность представителей флуоресцирующей группы этого рода осуществлять «биоконтроль» заболеваемости растений за счет подавления находящихся в ризосфере фитопатогенных микроорганизмов [3, 4].

Среди антимикробных веществ, продуцируемых ризосферными бактериями рода *Pseudomonas*, особый интерес вызывают флуоресцирующие пигменты – пиовердины – уникальные соединения, которые характеризуются высокой хелатирующей ионы железа способностью и являются сидерофорами бактерий данного рода [6]. В основе антимикробной активности пиовердинов лежит способность к образованию прочного комплекса с ионами железа и переводу их в недоступную для других микроорганизмов (бактерий и грибов) форму, в результате чего размножение фитопатогенов подавляется, что в итоге предохраняет растения от инфицирования. В ходе нашей работы исследовалось влияние бактерий *P. putida* КМБУ 4308 на развитие фитопатогенов рода *Alternaria*, а также роль пиовердина Pm в обеспечении антагонистической активности указанных бактерий.

### Материал и методика

Объектами изучения являлись бактерии *P. putida* КМБУ 4308, выделенные и описанные ранее [7], их мутанты, не способные к синтезу пиовердина Pm, сверхпродуценты указанного пигмента [8], а также моноспоровые изоляты чистых культур грибов рода *Alternaria nees*. – *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. infectoria*, *A. dauci*, *A. radicina*, *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. capsici*, *A. panax*, выделенные из различных сельскохозяйственных культур на территории Беларуси.

Бактерии выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл в жидкой минимальной среде Канада (100 мл) [9], освобожденной от ионов железа (среда А), а также на агаризованной среде того же состава (среда Б) в зависимости от целей эксперимента. Очистку среды от ионов железа осуществляли методом, описанным в [8]. В качестве источника углерода и энергии использовали сукцинат Na в конечной концентрации 0,4 %. Бактерии культивировали при 28 °С в течение 2 сут до достижения ими плотности  $\approx 10^9$  КОЕ/мл. Освобожденную от клеток культуральную жидкость (ОКЖ) получали путем центрифугирования при 5000 об/мин в течение 15 мин.

Концентрацию бактерий в среде культивирования определяли по калибровочной кривой зависимости оптической плотности жидкой культуры ( $D_{540}$ ) от количества жизнеспособных клеток [8]. Клеточный экстракт получали путем обработки суспензии клеток ультразвуком (30 кГц, 3 раза по 15 с).

Выделение и очистку пиовердина Pm проводили по методике, описанной в [8]. Для определения концентрации пигмента использовали калибровочную кривую зависимости оптической плотности раствора пиовердина Pm при pH 7.0 ( $D_{405}$ ) от его концентрации [8].

Не способные к синтезу пиовердина мутанты получали путем транспозонного мутагенеза по методике, предложенной в [10]. В качестве доноров использовали штаммы *E. coli* S17/1( $pro^-$ ;  $thi^-$ ) pUT(Ap<sup>R</sup>) :: miniTn5(Sm<sup>R</sup>) и *E. coli* S17/1( $pro^-$ ;  $thi^-$ ) pUT(Ap<sup>R</sup>) :: miniTn5(Km<sup>R</sup>), а в

качестве реципиента – бактерии *P. putida*. Отбор трансконъюгантов, воспринявших miniTn5, производили на агаризованной минимальной среде В в присутствии ампициллина (100 мкг/мл) и канамицина (25 мкг/мл) или ампициллина (100 мкг/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). У полученных мутантов исследовали уровень синтеза пиовердина Pm в жидкой среде А. Наличие пиовердина Pm устанавливали по характерной флуоресценции под УФ-светом, а также спектрофотометрически с использованием спектрофотометра Cary 50 Scan фирмы Varian [8].

Споровый материал получали путем культивирования грибов на агаризованной питательной среде (картофельно-морковный агар – КМА) в течение месяца при переменном освещении [11]. Для изучения антифунгальных свойств опытных образцов споры грибов помещали в капли водных растворов исследуемых потенциальных антагонистов на предметных стеклах во влажной камере и через сутки учитывали количество проросших спор (в трех полях зрения микроскопа при 100-кратном увеличении). Эксперимент повторяли 5 раз.

Влияние бактерий на развитие мицелия грибов изучали методом отсроченного антагонизма [12]. Фитопротекторные свойства бактерий определяли в экспериментах по искусственному заражению споровой суспензией патогенных видов *A. tenuissima*, *A. infectoria* и *A. brassicicola* 5-дневных проростков редиса, семена которого предварительно обрабатывали суспензией клеток бактерий-антагонистов ( $10^8$  КОЕ/мл). Повторность всех экспериментов 3-кратная.

### Результаты и их обсуждение

В настоящее время серьезные опасения вызывают не только «традиционные» облигатные фитопатогены, но и так называемые полиморфные группы грибов, включающие как сапротрофные, так и паразитические формы. Типичными представителями такой группы являются грибы р. *Alternaria*, многие из которых известны как биоразрушители, патогены культурных и дикорастущих растений. Они могут являться причиной возникновения альтернариозов многих сельскохозяйственных культур, в том числе пасленовых (возбудитель *A. solani*), бурой пятнистости листьев моркови (возбудитель *A. dauci*), черной пятнистости капусты и рапса (основные возбудители *A. brassicae*, *A. brassicicola*), «черни колоса, или черного зародыша» злаковых культур – пшеницы, ржи, ячменя, тритикале (комплекс *A. infectoria*, *A. tenuissima* и *A. alternata*) [13–15].

Ранее было показано, что бактерии *P. putida* КМБУ 4308 обладают выраженной антагонистической активностью в отношении ряда фитопатогенных бактерий и грибов, а также способны стимулировать рост растений [1, 16]. Интересным представлялось изучение антифунгальной активности данных бактерий в отношении различных представителей фитопатогенов рода *Alternaria*.

С этой целью, а также для выяснения роли синтезируемого ими пиовердина Pm в обеспечении их антагонистических свойств были получены мутанты указанных бактерий с повышенным уровнем продукции пиовердина (штамм С11), способные к его синтезу в присутствии ионов железа (10 мкг/мл) (штамм F17), а также не способные к синтезу пиовердина (штаммы 25 и 46). Определение уровня синтеза пигмента у отобранных мутантных бактерий проводили спектрофотометрическим методом (рис. 1). Было показано, что бактерии штаммов 25 и 46 полностью утратили способность к синтезу флуоресцирующего пигмента, на что указывает отсутствие характерного для пиовердина максимума поглощения в видимой области спектра при длине волны 405 нм (рН 7.0).

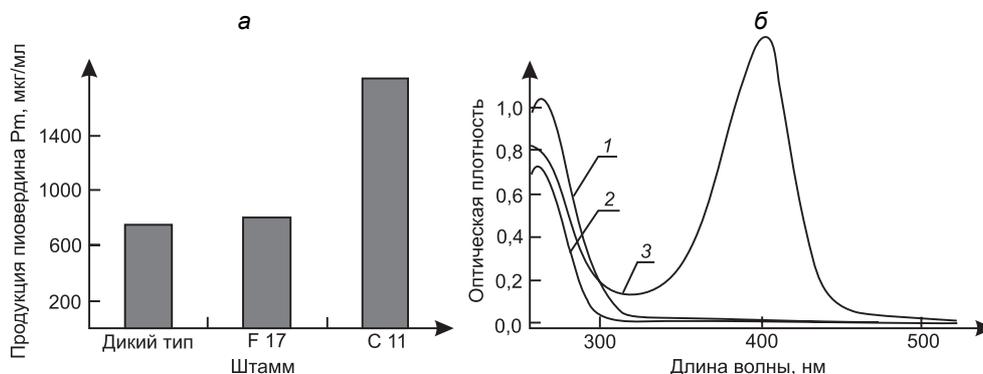


Рис. 1. Способность бактерий *P. putida* КМБУ 4308 к синтезу пиовердина Pm: а – уровень продукции пигмента у мутантных штаммов, б – спектральные характеристики ОКЖ мутантных штаммов 25 (1) и 46 (2), а также пиовердин Pm бактерий дикого типа (3)

Исследование антифунгальных свойств бактерий *P. putida* КМБУ 4308 методом отсроченного антагонизма показало, что они способны эффективно подавлять рост и развитие мицелия грибов *Alternaria*, в частности *A. infectoria*. На 10-е сут культивирования в присутствии метаболитов названных бактерий (перед посевом гриба клетки штамма-антагониста убивали парами хлороформа) наблюдался лишь незначительный рост мицелия ( $d=1,5$  см), в то время как в контроле колония *A. infectoria* достигала диаметра 10 см. Причем мутанты с повышенным синтезом пиовердина Рm (штаммы С11 и F17) обладали более выраженной антифунгальной активностью (рис. 2).

В экспериментах по искусственному заражению проростков редиса смесью спор изолятов *A. tenuissima*, *A. infectoria* и *A. brassicicola* было показано, что в результате предпосевной обработки семян редиса культурой бактерий *P. putida* КМБУ 4308 ( $10^8$  КОЕ/мл) последняя способна проявлять фитопротекторную активность, снижая степень поражения растений альтернариозом и повышая выживаемость проростков до 92 % (табл. 1). Таким образом, было показано, что используемые нами бактерии обладают выраженной антагонистической активностью в отношении представителей рода *Alternaria*, причем мутанты с повышенным синтезом пиовердина (штаммы С11 и F17) проявляют более выраженные фитопротекторные свойства.

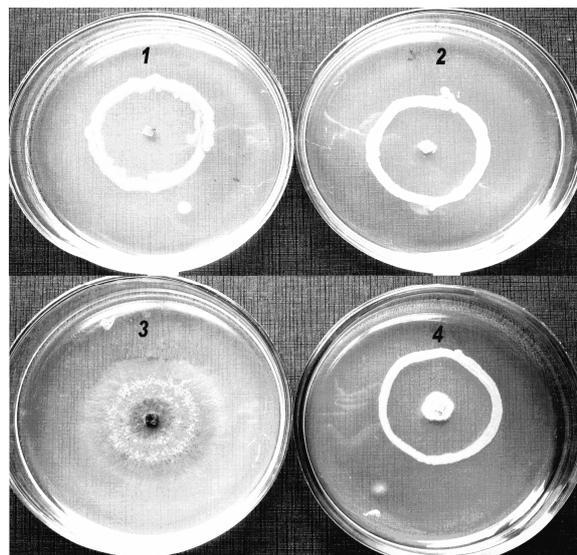


Рис. 2. Антифунгальная активность бактерий *P. putida* по отношению к мицелию *A. infectoria*: 1 – мутант С11, 2 – мутант F17, 3 – рост мицелия *A. infectoria* при отсутствии бактериальных метаболитов, 4 – бактерии дикого типа

Таблица 1

**Влияние бактерий *P. putida* КМБУ 4308 на жизнеспособность проростков редиса в условиях искусственного заражения спорами грибов рода *Alternaria***

Характеристика развития растений	Контроль		Штамм <i>P. putida</i> *		
	Вода	Среда А	Дикий тип	F17	С11
Количество проросших семян, %	70,2 $\pm$ 8,6	62,5 $\pm$ 4,8	80,8 $\pm$ 3,9	80,8 $\pm$ 4,1	84,6 $\pm$ 0,4
Средняя масса 5-дневных проростков, мг	6,5 $\pm$ 0,2	6,01 $\pm$ 0,3	6,74 $\pm$ 0,4	7,97 $\pm$ 0,3	7,08 $\pm$ 0,4
Выживаемость зараженных проростков через 5 дней, %	80 $\pm$ 5	73,3 $\pm$ 3,2	80 $\pm$ 2,6	80 $\pm$ 2,6	82 $\pm$ 1,9
Выживаемость зараженных проростков через 10 дней, %	13,5 $\pm$ 0,5	3,3 $\pm$ 3,3	75 $\pm$ 2,3	81 $\pm$ 2,5	92 $\pm$ 3,9

\*Примечание. Культура бактерий ( $10^8$  КОЕ/мл).

Поскольку основная инфекционная нагрузка при заражении растений в естественных условиях обычно представлена спорами, наиболее актуально направление поиска веществ с антифунгальным эффектом, проявляющимся по отношению к конидиям грибов. С этой целью нами было изучено влияние ОКЖ бактерий *P. putida* КМБУ 4308 на прорастание спор ряда широко распространенных видов рода *Alternaria*.

В результате была выявлена различная степень антифунгальной активности ОКЖ изучаемых бактерий по отношению к различным представителям рода *Alternaria* (табл. 2). Согласно полученным данным, наиболее чувствительными к метаболитам, содержащимся в ОКЖ бактерий *P. putida* КМБУ 4308, оказались споры грибов *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. tenuissima*. Кроме того, следует отметить, что ростковые трубки конидий таких видов, как *A. brassicicola*, *A. capsici*, *A. brassicae*, были деформированы – пузыревидно вздуты (рис. 3), что также свидетельствует о негативном влиянии комплекса метаболитов ОКЖ исследуемых бактерий в отношении грибов рода *Alternaria*.

Влияние комплекса экзогенных метаболитов бактерий *P. putida* КМБУ 4308 на прорастание спор различных видов грибов рода *Alternaria*

Вид гриба	Количество проросших спор, %						
	Контроль		Дикий тип	ОЖК бактерий <i>P. putida</i>			
	Вода	Среда А		F17	C11	25	46
<i>A. alternata</i>	100	100	100	100	100	100	83
<i>A. tenuissima</i>	100	100	87	49	48	95	58
<i>A. infectoria</i>	100	100	100	97	100	97	97
<i>A. dauci</i>	95	100	100	100	100	100	100
<i>A. radicina</i>	95	100	55	70	43	68	89
<i>A. brassicae</i>	93	90	19	38	50	75	50
<i>A. brassicicola</i>	100	100	29	44	53	90	63
<i>A. capsici</i>	100	100	90	75	60	70	66
<i>A. panax</i>	85	100	88	88	90	67	97

Вместе с тем было установлено, что антифунгальный эффект изучаемых бактерий при прорастании спор грибов оказался ниже, чем в отношении мицелия тех же культур (см. табл. 2, рис. 1). В этом случае снижение антифунгального эффекта бактерий в отношении грибных спор могло бы быть объяснено более низкой потребностью грибов в ионах железа при прорастании конидий. Однако неожиданным оказался тот факт, что антифунгальным эффектом обладали не только синтезирующие пиовердин Рm бактерии *P. putida* КМБУ 4308 (штаммы дикого типа, F17 и C11), но и мутанты, не способные к его синтезу (штаммы 25 и 46). Полученные данные позволяют предположить, что антагонистическая активность бактерий *P. putida* в отношении спор грибов рода *Alternaria* не зависит от синтеза пиовердина Рm, а связана с действием иных антифунгальных метаболитов.

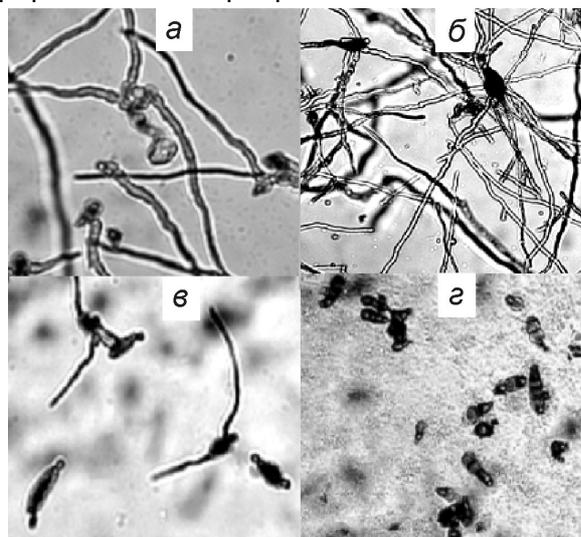


Рис. 3. Влияние метаболитов бактерий *P. putida* на прорастание спор *A. infectoria*: а – прорастание спор в воде, б – в среде А; в – деформирование ростковых трубок конидий, з – угнетение прорастания спор

антифунгального эффекта бактерий из-за присутствия в культуральной жидкости какого-либо внутриклеточного бактериального метаболита. Поэтому дополнительно были исследованы антифунгальные свойства клеток бактерий *P. putida*, разрушенных с помощью ультразвука (табл. 3).

Таблица 3

Влияние пиовердина и клеточного экстракта бактерий *P. putida* КМБУ 4308 на прорастание спор видов рода *Alternaria*

Вид гриба	Количество проросших спор, %		
	Вода	Препарат пиовердин Рm*	Клеточный экстракт бактерий <i>P. putida</i> КМБУ 4308
<i>A. dauci</i>	100	100	100
<i>A. dianthi</i>	85	85	100
<i>A. capsici</i>	100	100	100
<i>A. radicina</i>	80	100	100
<i>A. panax</i>	100	100	100
<i>A. infectoria</i>	100	100	100
<i>A. tenuissima</i>	100	100	100
<i>A. alternata</i>	100	100	100
<i>A. brassicicola</i>	80	80	100
<i>A. brassicae</i>	100	80	100

\*Примечание. Концентрация пигмента 6 мМоль/л.

Приведенные результаты показывают, что очищенный препарат пиовердина Pm, равно как и внутриклеточные метаболиты исследуемых бактерий, не способен подавлять жизнеспособность спор, что делает необходимым дальнейшие исследования в направлении поиска конкретного экзогенного метаболита бактерий *P. putida* КМБУ 4308, определяющего их антифунгальную активность. Такими метаболитами могут являться салициловая кислота, цианиды, антибиотики, хитиназы и др., на синтез которых бактериями рода *Pseudomonas* неоднократно указывалось ранее. Кроме того, имеются сведения, что эти бактерии могут вызывать индукцию неспецифической устойчивости растений к фитопатогенам [17]. Не следует исключать также возможность специфичной резистентности спор *Alternaria* к антагонистическому действию пиовердина, так как конидии представителей этого рода, в отличие от большинства фитопатогенов, способны к эффективному прорастанию в дистиллированной воде и не нуждаются для этого в каких-либо питательных веществах и микроэлементах, в том числе и ионах железа (см. рис. 3).

Таким образом, полученные при изучении влияния бактерий *P. putida* КМБУ 4308 на прорастание спор и развитие мицелия различных представителей рода *Alternaria* результаты свидетельствуют о наличии выраженной антифунгальной активности у изучаемых бактерий, не связанной с синтезом пиовердина Pm.

1. Штамм бактерий *Pseudomonas putida* – биостимулятор роста растений: Пат. 2051586 РФ / Максимова Н.П., Лысак В.В., Игнатович О.В., Фомичев Ю.К. № 2051586; Заявл. 12.07.1991; Опубл. 10.01. 1996. 5 с.
2. Alvaro A.M., Monteiro G., Rui A.R. // Biochemical Engineering Journal. 2000. Vol. 6. № 1. P. 45.
3. Weller D.M., Cook R.J. // Iron, Siderophores and Plant Diseases (Swinburn T.R., Ed.). NATO ASI Ser. A. 1986. Vol. 117. P. 99.
4. Leong J. // Annu. Rev. Phytopathol. 1986. Vol. 24. P. 187.
5. Oosterdorp M., Sikora R.A. // Revue de Nematologie. 1989. Vol. 12. P. 77.
6. Budzikiewicz H. // FEMS Microbiol. Rev. 1993. Vol. 104. № 3-4. P. 209.
7. Максимова Н.П. // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2. 1991. № 3. С. 40.
8. Кулешова Ю.М., Камаева М.В., Максимова Н.П. // Там же. 2006. № 2. С. 48.
9. Kaneda T., Roxburg J. // Canad. J. Mikrobiol. 1959. Vol. 5. № 2. P. 187.
10. De Lorenzo V., Herrero M., Jakubzik U., Timmis K. // J. Bacteriology. 1990. Vol. 172. № 11. P. 6568.
11. Ганнибал Ф.Б. // Микология и фитопатология. 2004. Т. 38. Вып. 3. С. 19.
12. Fredericq P. Colicins // Annu. Rev. Microbiol. 1957. Vol. 2. P. 7.
13. Болезни и вредители овощных культур / Под ред. В.Ф. Самарсова. Мн., 1994.
14. Федорович М.Н. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2005. № 5. С. 91.
15. Федорович М.Н. // Грибы и водоросли в биоценозах – 2006: Материалы Междунар. конф., посвящ. 75-летию биол. фак. МГУ им. М.В. Ломоносова. М., 2006. С. 162.
16. Максимова Н.П., Поликсенова В.Д., Лысак В.В. // Эколого-экономические основы усовершенствования интегрированных систем защиты растений от вредителей, болезней и сорняков: Материалы науч.-произв. конф. Мн., 1996. С. 147.
17. Lavicoli A., Bouted E., Buchala A., Metraux J.-P. // MPMI. 2003. Vol. 16. № 10. P. 851.

Поступила в редакцию 24.04.08.

**Юлия Михайловна Кулешова** – младший научный сотрудник НИЛ молекулярной генетики бактерий БГУ.

**Мария Николаевна Федорович** – ассистент кафедры ботаники.

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

**Валентина Дмитриевна Поликсенова** – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, заведующий кафедрой ботаники.