

УДК 579.262

UDC 579.262

03.00.00 Биологические науки

Biological sciences

РОСТОСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *BACILLUS* ФИЛЛОПЛАНА ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ Г. СТАВРОПОЛЯ**GROWTH PROMOTING ACTIVITY OF SOME MEMBERS OF THE GENUS *BACILLUS* OF LEAF SURFACE MICROFLORA ARBOREAL PLANTS IN STAVROPOL**

Коптева Татьяна Сергеевна

Kopteva Tatiana Sergeevna

Ерина Надежда Викторовна

Erina Nadezhda Viktorovna

Заикина Ирина Аркадьевна
ФГАОУ ВПО Северо-Кавказский федеральный университет, Россия

Zaikina Irina Arcadieвна
Northern Caucasus Federal University, Russia

В статье представлены результаты изучения ростостимулирующей активности микроорганизмов рода *Bacillus* филоплана древесных растений г. Ставрополя. Выделены и идентифицированы штаммы эпифитных микроорганизмов рода *Bacillus* с листовой пластинки растений: *Quercus robur* L., *Carpinus caucasica* Grossh., *Fraxinus excelsior* L., *Acer campestre* L.. Изучены ростостимулирующие свойства 43 штаммов аэробных спорообразующих бактерий: *Bacillus subtilis*, *Bac. megaterium*, *Bac. pumilis*, *Bac. cereus*, *Bac. licheniformis*. Отобранные штаммы являются потенциально перспективными в разработке микробиологических препаратов для растений. Создана региональная коллекция штаммов эпифитных микроорганизмов

The article presents the results of studying the growth-stimulating activity of the microorganisms of the genus *Bacillus* of leaf surface microflora arboreal plants in Stavropol. Isolated and identified strains of epiphytic microorganisms of the genus *Bacillus* with the leaf surface of plants: *Quercus robur* L., *Carpinus caucasica* Grossh., *Fraxinus excelsior* L., *Acer campestre* L.. Growth stimulating properties of 43 strains of aerobic spore-forming bacteria (*Bacillus subtilis*, *Bac. megaterium*, *Bac. pumilis*, *Bac. cereus*, *Bac. licheniformis*) are researched. Selected strains are potentially promising in the development of microbial preparations for plants. A regional collection of strains of epiphytic organisms was formed

Ключевые слова: ЭПИФИТНЫЕ БАКТЕРИИ, АЭРОБНЫЕ СПОРООБРАЗУЮЩИЕ БАКТЕРИИ, ФИЛЛОПЛАН, РОД *BACILLUS*, БАКТЕРИИ, СТИМУЛИРУЮЩИЕ РОСТ РАСТЕНИЙ, ПОВЕРХНОСТЬ ЛИСТОВОЙ ПЛАСТИНКИ

Keywords: EPIPHYTIC BACTERIA, AEROBIC SPORE-FORMING BACTERIA, LEAF SURFACE MICROFLORA, GENUS *BACILLUS*, PLANT GROWTH PROMOTION BACTERIA, LEAF SURFACE

Plant growth promotion bacteria (PGPB) - ризосферные, эпифитные и эндофитные бактерии, благоприятно воздействующие на рост и развитие своих хозяев. Они используют сходные механизмы стимуляции роста растения-хозяина. PGPB влияют на развитие растений прямо или косвенно. Влияние, связанное с продукцией метаболитов, таких как антибиотики, токсины, гидролитические ферменты, сидерофоры, которые снижают развитие фитопатогенов, называют косвенным. Прямой эффект наблюдается в улучшении минерального питания растения, синтезе

гормонов роста и витаминов ассоциативными бактериями. Синтезируя все важнейшие фитогормоны - ауксины (индолил-3-уксусная кислота), гибберелины, цитокинины, этилен, микроорганизмы оказывают положительное влияние на рост растения [3, 9, 10].

Некоторые микросимбионты являются представителями сразу нескольких экологических групп. К числу таких микроорганизмов относят представителей рода *Bacillus* в связи с тем, что эти бактерии являются доминирующими видами в ризосфере, во внутренних частях растений и по данным ряда исследователей, типичными обитателями эпифитной микрофлоры [1, 2, 4, 10]. Наиболее изученными являются ризосферные микроорганизмы. Представители рода *Bacillus* отличаются от других бактерий высокой выживаемостью во внешней среде и толерантностью к антропогенным воздействиям.

Этому способствует разнообразная биологическая активность бацилл, выраженная в продуцировании фитогормонов, антибиотиков, ферментов, токсинов и других метаболитов. Способность к спорообразованию, высокая приспособляемость к условиям внешней среды, в том числе и абиотическим, обуславливают конкурентоспособность бацилл в ризо- и филлосфере и в тканях растения-хозяина.

Эпифитные бациллы способны синтезировать индолил-3-уксусную кислоту, с синтезом которой связано накопление в растении триптофана-предшественника ИУК [9].

Обладая высокой физиологической активностью, они составляют значительную часть микрофлоры «здорового» растения, участвуют в стимуляции роста своих хозяев, улучшают их водное и минеральное снабжение, а также способствуют появлению у растительных партнеров устойчивости к фитопатогенам [3]. Перечисленные положительные

свойства штаммов рода *Bacillus* позволяют рассматривать их в качестве перспективных объектов при разработке микробиологических препаратов.

Поэтому выделение и идентификация эпифитных аэробных спорообразующих бактерий филлосферы древесных растений г. Ставрополя для тестирования на ростостимулирующие свойства представляется **актуальным**.

Цель исследования: выделение, идентификация и поиск перспективных штаммов эпифитных микроорганизмов в условиях города Ставрополя.

Задачи исследования:

- выделить штаммы эпифитных микроорганизмов рода *Bacillus* с листовой пластинки исследуемых растений методом отпечатка;
- идентифицировать штаммы аэробных спорообразующих бактерий, выделенных с филлоплана некоторых древесных растений г. Ставрополя;
- изучить ростостимулирующие свойства некоторых штаммов эпифитных микроорганизмов.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования послужили микроорганизмы, выделенные с листовых пластинок древесных растений: *Quercus robur* L. (Дуб черешчатый), *Carpinus caucasica* Grossh. (Граб кавказский), *Fraxinus excelsior* L. (Ясень обыкновенный), *Acer campestre* L. (Клен полевой).

Выделение эпифитов производили методом отпечатка с поверхности филлоплана. Культивирование бациллярной флоры проводили при $t=28\pm 2^\circ\text{C}$, $35\pm 2^\circ\text{C}$, $42\pm 2^\circ\text{C}$, в течение 24-48 часов в аэробных условиях на питательных средах: МПА, Питательная среда для культивирования эпифитной микрофлоры (Патент № 2366701, Заикина И. А., Мануйлов И. М.).

При описании и идентификации бактерий изучали следующие параметры: культуральные и тинкториальные свойства, морфологические характеристики, физиолого-биохимические свойства.

Идентификация микроорганизмов проводилась в ФГБУ «Ставропольская межобластная ветеринарная лаборатория» классическими и инструментальными методами (Экспертиза № 8218-8277 от 28.05.2012), а также руководствуясь методическими рекомендациями [5, 6, 7, 8].

Применяли стерилизацию семян 96%-м этанолом в течении 5 мин. После стерилизации семена отмывали от 3 до 5 раз стерильной дистиллированной водой [5].

В качестве модельного объекта исследования фитостимулирующей активности представителей рода *Bacillus* были использованы семена пшеницы *Triticum aestivum* L. Бактеризацию проводили с помощью суспензии бактерий в концентрации 10^6 кл/мл. Зерна раскладывали в чашки Петри (20 зерен в каждую чашку) на слой фильтровальной бумаги, смоченной 10 мл культуральной жидкости и оставляли в термостате на 3 суток при 28°C.

О наличии или отсутствии фитостимулирующей способности штаммов бацилл судили при сравнении длины надземной части и длины корней проростков, обработанных соответствующим разведением в опытном и контрольном вариантах.

Экспериментальная часть

С поверхностей листовых пластинок древесных растений были выделены эпифиты, идентифицированные как аэробные спорообразующие бактерии, принадлежащие к 5 видам: *Bacillus subtilis*, *Bac. megaterium*, *Bac. pumilis*, *Bac. cereus*, *Bac. licheniformis*.

Всего было протестировано 43 штамма эпифитов, из них – 19 штаммов - *Bacillus subtilis*, 14 штаммов - *Bacillus pumilis*, 6 штаммов - *Bacillus licheniformis* и по 2 штамма - *Bacillus megaterium* и *Bacillus cereus*.

Данные по опыту представлены в таблице 1.

Таблица 1

Ростостимулирующая активность эпифитных представителей рода *Bacillus* в отношении семян пшеницы (на 3 сутки)

№ штамма	средняя длина надземной части, мм Хср± mх	средняя длина подземной части, мм Хср± mх
<i>Bacillus subtilis</i>		
1	21,6± 1,07	28,5±3,14
13	33,8±2,58	40,8±0,50
20	24,0±1,47	29,6±4,63
21	24,3±3,65	26,1±1,0
34	21,3±2,22	27,9±4,25
40	27,4±2,93	36,7±4,55
41	22,0±1,84	26,8±4,11
46	23,1±4,14	26,3±1,21
49	19,5±3,74	26,6±2,62
50	29,6±4,37	34,0±5,86
52	11,1±0,90	2,5±4,62
55	27,4±3,68	28,8±4,82
58	23,5±3,56	32,9±5,42
59	19,4±5,20	21,1±3,23
60	36,7±3,82	31,2±4,39
63	22,5±3,30	14,2±3,12
66	21,2±5,08	12,6±2,64
73	41,8±3,82	31,9±3,05
79	27,7±5,28	26,9±4,51
<i>Bacillus pumilis</i>		
10	35,4±3,67	23,6±4,12
14	17,2±5,41	10,3±3,23
43	40,1±4,41	26,1±5,16
44	39,8±3,43	27,3±4,34
48	26,9±2,36	23,0±4,52
51	9,9±4,98	5,0±3,47

53	19,3±2,79	13,4±3,88
56	21,8±1,86	18,3±5,06
57	25,2±1,84	23,6±4,35
68	22,1±3,06	21,0±4,60
69	22,3±4,56	17,0±4,58
70-1	41,1±4,27	28,6±3,66
74	22,1±1,68	19,1±3,34
75	19,2±3,95	13,8±4,81
<i>Bacillus licheniformis</i>		
8	28,1±3,19	23,9±4,75
22	47,6±5,14	45,1±3,08
31	36,7±4,45	25,4±3,94
47	15,7±4,98	10,8±3,86
62	41,4±2,92	34,2±4,29
67	38,9±4,23	33,8±3,62
<i>Bacillus megaterium</i>		
3	39,7±3,48	35,7±2,55
32	10,3±3,23	6,3±4,5
<i>Bacillus cereus</i>		
17	38,2±3,79	30,9±3,14
65	17,7±3,98	11,7±1,51
контроль	24,4±1,66	26,0±3,25

**Фитостимулирующая активность эпифитных представителей рода
*Bacillus***

Из представленных в таблице данных видно, что только семь штаммов *Bacillus subtilis* (№ 13, 40, 50, 55, 60, 73, 79) проявляли фитостимулирующее действие. Показатели активности остальных культур были ниже контроля. В отношении подземной части семян пшеницы проявляли фитостимулирующее действие 14 штаммов *Bacillus subtilis*. Штаммы № 21, 41, 46, 49, 52, 59, 63, 66 не обладают данными свойствами в отношении подземной части семян пшеницы.

В отношении надземной части семян пшеницы семь штаммов *Bacillus pumilis* (№ 10, 43, 44, 48, 57, 70-1) проявляли фитостимулирующее действие. Показатели активности остальных культур оказались ниже

контроля. Ростостимулирующая активность эпифитных *Bacillus pumilis* в отношении подземной и надземной части семян пшеницы сильно отличается. Только два штамма (№ 44, 70-1) обладают изучаемыми свойствами.

Анализируя результаты эксперимента видно, что пять штаммов *Bacillus licheniformis* (№ 8, 22, 31, 62, 67) оказывали положительное влияние на рост надземной части семян пшеницы. Показатель активности штамма № 47 значительно отличался от контроля. Фитостимулирующая активность *Bacillus licheniformis* в отношении подземной и надземной части семян пшеницы не одинакова, т. е. только три штамма (№ 22, 62, 67) проявляли фитостимулирующее действие.

В ходе эксперимента ростостимулирующие свойства выявлены так же у штамма № 3 *Bacillus megaterium* и штамма № 17 *Bacillus cereus* в отношении подземной и надземной части семян пшеницы.

Некоторые культуры ингибировали развитие растений. Это может быть связано с накоплением активных метаболитов, высокие концентрации которых подавляют прорастание семян и развитие корневой системы.

Выводы

На основании полученных результатов можно сделать заключение о том, что эпифитные штаммы № 13, 40, 50, 55, 60, 73, 79 (*Bac. subtilis*), штаммы № 44, 70-1 (*Bac. pumilus*) и штаммы № 22, 62, 67 (*Bac. licheniformis*), а также № 3 (*Bac. megaterium*) и № 17 (*Bac. cereus*) обладают ростостимулирующей активностью как в отношении подземной, так и надземной частей семян модельного растительного объекта.

Часть штаммов проявляли фитостимулирующие свойства только в отношении надземной - штаммы № 10, 43, 48, 57 (*Bac. pumilus*), № 8, 31 (*Bac. licheniformis*), или подземной - штаммы *Bac. subtilis* № 1, 20, 34, 41, 46, 49, 58, частей пшеницы.

Из 43 протестированных штаммов, проявили фитосмулирующую активность в отношении подземной и надземной частей семян пшеницы 14 штаммов всех видов бацилл. Положительно оказывали влияние на рост только надземной части растений - 6 штаммов (4 штамма - *Bac. pumilus*, 2 штамма - *Bac. licheniformis*), на рост только подземной части – 7 штаммов (*Bac. subtilis*).

Выделение фитогормонов бактериальными клетками в окружающую среду считается одним из важнейших составляющих эффективного растительно-бактериального симбиоза. Стимулирующий эффект выражается в том, что фитогормоны вызывают усиленный рост надземной части, корневой системы растения, что в свою очередь приводит к улучшению минерального питания. На основании результатов эксперимента *in vitro*, целесообразно отобрать эти штаммы для дальнейших опытов *in vivo*.

Таким образом, были выделены и идентифицированы некоторые представители рода *Bacillus* филлоплана древесных растений г. Ставрополя, обладающие ростостимулирующими свойствами. Отобранные штаммы являются потенциально перспективными в разработке микробиологических препаратов для растений.

Создана региональная коллекция штаммов эпифитных микроорганизмов, осуществляется формирование фонда перспективных штаммов с фиторегуляторной активностью, способных к синтезу индольных соединений, витаминов, активно колонизирующих ткани растений.

Экспериментальная проверка и реализация свойств и активности микроорганизмов перспективна в традиционных и новых областях биотехнологии.

Библиографический список:

1. Возняковская Ю.М. Микрофлора здоровых растений: дис. ... докт. биол. наук. М., 1964. 568 с.
2. Заикина И.А. Экологическая роль бактериального сообщества эпифитов филлосферы в жизнедеятельности растений: автореф. дис....канд. биол. наук. Ставрополь, 2008. 21 с.
3. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии рода *Bacillus Cohn.* в агроэкосистемах. – Москва Наука, 2007. 121 с.
4. Недорезков В. Д. Биологическая защита пшеницы от болезней в условиях Южного Урала . – М.: Изд-во МСХА, 2002. – 172 с.
5. Нетрусов А. И. Экология микроорганизмов: Учеб. для студ. вузов / А.И. Нетрусов, Е. А. Бонч-Осмоловская, В. М. Горленко и др.; Под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 272 с.
6. Определитель бактерий Берджи. В 2 - х т. Т. 1, 2: Пер. с англ./ Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. - М.: Мир, 1997. 432 с., ил.
7. Пивоваров Ю.Н., Королик В.В. Санитарно-значимые микроорганизмы (таксономическая характеристика и дифференциация). - М.: Издательство ИКАР, 2000. 268 с.
8. Скворцова И.Н. Идентификация почвенных бактерий рода *Bacillus.* М.: Изд- во Моск. ун-та, 1983. 26 с.
9. Холмецкая М. О., Лобанок Е. В. Продукция ИУК бактериями, взаимодействующими с растениями // Тез. докл. Всерос. конф. «Сельскохозяйственная микробиология в XIX-XXI веках», 14-19 июня, 2001, Санкт-Петербург. – С.-Пб., 2001. – С. 78-79.
10. Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., Barka E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects // Appl. Environ. Microbiol. 2005. - V.71. - P.4951^1959.

References

1. Voznyakovskaya Yu.M. Mikroflora zdorovyih rasteniy: dis. ... dokt. biol. nauk. M., 1964. 568 s.
2. Zaikina I.A. Ekologicheskaya rol bakterialnogo soobshchestva epifitov fillosferyi v zhiznedeyatel'nosti rasteniy: avtoref. dis....kand. biol. nauk. Stavropol, 2008. 21 s.
3. Melentev A.I. Aerobnyie sporoobrazuyuschie bakterii roda *Bacillus Cohn.* v agroekosistemah. – Moskva Nauka, 2007. 121 s.
4. Nedorezkov V. D. Biologicheskaja zashhita pshenicy ot boleznej v uslovijah Juzhnogo Urala . – M.: Izd-vo MSHA, 2002. – 172 s.
5. Netrusov A. I. Ekologiya mikroorganizmov: Ucheb. dlya stud. vuzov / A.I. Netrusov, E. A. Bonch-Osmolovskaya, V. M. Gorlenko i dr.; Pod red. A. I. Netrusova. – M.: Izdatelskij tsentr «Akademiya», 2004. – 272 s.
6. Opredelitel bakteriy Berdzhi. V 2 - h t. T. 1, 2: Per. s angl./ Pod red. Dzh. Houлта, N. Kriga, P. Snita, Dzh. Steyli, S. Uillyamsa. - M.: Mir, 1997. 432 s., il.
7. Pivovarov Yu.N., Korolik V.V. Sanitarno-znachimye mikroorganizmyi (taksonomicheskaya harakteristika i differentsiatsiya). - M.: Izdatelstvo IKAR, 2000. 268 s.
8. Skvortsova I.N. Identifikatsiya pochvennyih bakteriy roda *Bacillus.* M.: Izd- vo Mosk. un-ta, 1983. 26 s.
9. Holmeckaja M. O., Lobanok E. V. Produktija IUK bakterijami, vzaimodejstvujushhimi s rastenijami // Tez. dokl. Vseros. konf.

«Sel'skhozjajstvennaja mikrobiologija v XIX-XXI vekah», 14-19 ijunja, 2001, Sankt-Peterburg. – S.-Pb., 2001. – S. 78-79.

10. Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., Barka E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects // Appl. Environ. Microbiol. 2005. - V.71. - P.4951^1959.