

***PANTOEA BRENNERI* AS3 И *BACILLUS GINSENGIHUMI* M2.11 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ БИОКОНТРОЛЯ И СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ**

© 2021 г. Д. Л. Иткина^{а, *}, А. Д. Сулейманова^а, М. Р. Шарипова^а

^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

*e-mail: laia9301@mail.ru

Поступила в редакцию 19.07.2020 г.

После доработки 10.10.2020 г.

Принята к публикации 11.11.2020 г.

Исследовали механизмы биоконтрольного действия штаммов *Pantoea brenneri* AS3 и *Bacillus ginsengihumi* M2.11. Установлена способность штаммов к выделению ионов аммония и цианидов, целлюлазной и протеазной активности, фиксации азота, а также к мобилизации почвенных фосфатов и фитатов. Выявлена способность штаммов к синтезу сидерофоров, максимальная продукция которых обнаружена на 48 ч культивирования и составляла 198 ± 8 мкМ у штамма *B. ginsengihumi* M2.11 и 84 ± 7 мкМ у штамма *P. brenneri* AS3. Бактерии продуцировали фитогормон – индолилуксусную кислоту (ИУК), выход которой на 24 ч роста составил 34 ± 3 мкг/мл у *B. ginsengihumi* M2.11 и 29 ± 2 мкг/мл у *P. brenneri* AS3. Установлено, что оба штамма обладали фунгицидной активностью против фитопатогенов рода *Fusarium*: рост представителей разных видов *Fusarium* подавлялся более чем на 90% в присутствии бактерий *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11. Сделано заключение, что обладая множественными полезными для растений характеристиками, штаммы *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 могут быть использованы в качестве объектов для создания технологий биоудобрений и стимуляторов роста растений.

Ключевые слова: *Pantoea*, *Bacillus*, биологическая активность, сидерофоры, ИУК, фунгицидная активность

DOI: 10.31857/S0026365621020063

Борьба с заболеваниями растений, вызванными фитопатогенными микроорганизмами, является главным направлением в развитии агробиотехнологии для увеличения качества и урожайности возделываемых культур. Поиск новых метаболитов микробиологического происхождения, обладающих фунгицидным действием, направлен на создание экологически безопасного производства средств защиты растений и продуктов сельского хозяйства, поскольку использование химических пестицидов и фунгицидов связано с загрязнением окружающей среды и нарушением естественного баланса микрофлоры почвы (Veliz et al., 2017). Кроме того, присутствие остатков пестицидов и фунгицидов на пищевых продуктах может оказывать неблагоприятное воздействие на здоровье человека, в связи с чем становится очевидной необходимость в использовании новых эффективных агентов биологического контроля (Norovsuren et al., 2018).

Все большую значимость приобретает применение бактериальных удобрений на основе ассоциативных ризобактерий, стимулирующих рост

растений (plant growth-promoting rhizobacteria – PGPR), которые являются неотъемлемой частью ризосферной биоты (Muller et al., 2017). В связи с высокой адаптацией в широком диапазоне активных сред, быстрым темпом роста и биохимической универсальностью метаболизма, ризобактерии рассматриваются как необходимый компонент в управлении сельскохозяйственной агрокультурой. Микробиологический способ защиты растений от болезней основан на природном явлении антагонизма бактерий по отношению к фитопатогенам, используя различные механизмы, такие как способность к конкурированию за питательные вещества и пространство, продукция сидерофоров, литических ферментов, антибиотиков и др. (Коряжкина, 2012; Хрусталева, Аллахвердиев, 2016).

Представители рода *Pantoea* связаны с широким спектром растений-хозяев: бактерии способны колонизировать корни растений, его листья и стебли, могут приносить пользу путем биосинтеза фитогормона – индолилуксусной кислоты (ИУК), осуществляют мобилизацию почвенных фосфа-

тов или азотфиксацию (De Maayer et al., 2012). Описаны штаммы *Pantoea*, которые обеспечивают эффективную защиту растений от различных бактериозов и микозов, а также сохранность урожая продовольственных зерновых культур (Smits et al., 2011).

Бактерии рода *Bacillus* населяют ризосферу, филосферу растений, являясь основными эндоситами. Многие штаммы бацилл обладают рядом хозяйственно-ценных свойств: они способны синтезировать биоконтрольные вещества, фитогормоны и витамины, фиксировать азот атмосферы. Важной особенностью бацилл является их высокая конкурентоспособность при колонизации растений и образовании бактериально-растительных ассоциаций. Все вышеперечисленные свойства позволяют отнести бациллы к PGPR-микроорганизмам (Коряжкина, 2012). Установлено, что 40% бацилл, выделенных из внутренних тканей растений, проявляют антагонистическую активность к возбудителям болезней растений, таких как *Fusarium culmorum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus nidulans*, *Bipolaris sorokiniana*. Антагонизм микроорганизмов рода *Bacillus* по отношению ко многим грибам-фитопатогенам объясняется способностью разных видов бацилл синтезировать различные вещества: антибиотики, сидерофоры, токсины, целлюлазы, гемицеллюлазы (Коряжкина, 2012; Khan et al., 2018).

Целью работы явилось изучение механизма биологического контроля и стимуляции роста растений новых PGPR-штаммов *Pantoea brenneri* AS3 и *Bacillus ginsengihumi* M2.11 для оценки их потенциала при использовании в качестве биоудобрений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили бактериальные штаммы *P. brenneri* AS3 ВКПМ В-12911 и *B. ginsengihumi* M2.11 ВКПМ В-11988, выделенные из почвы Республики Татарстан по признаку максимальной фитазной активности на дифференциальной среде PSM и идентифицированные молекулярно-генетическими методами (Suleimanova et al., 2015; Akhmetova et al., 2015; Сулейманова и соавт., 2017).

Культивирование микроорганизмов проводили на среде LB (г/л): триптон – 1.0; дрожжевой экстракт – 0.5; NaCl – 0.5; pH 8.5. Агаризованная среда LB включала дополнительно 2% агара. Бактерии культивировали в термостате при температуре 37°C и в термостате-шейкере фирмы “IKA®KS 4000” (Германия) при 37°C и интенсивности качания 200 об./мин. Оптическую плотность культуры измеряли на спектрофотометре “Bio-Rad” (США) при длине волны 590 нм.

Определение способности к продукции аммиака (NH₃), синильной кислоты – цианидов (HCN) и целлюлолитической активности штаммами *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 исследовали по методу Сю и Ким (Ху, Kim, 2014).

Протеолитическую активность определяли на среде с молочным агаром Эйкмана (1 и 2% молока) путем внесения 5 мкл инокулята. После 72 ч инкубации при 37°C, чашку заливали 15% ТХУ на 15 мин при комнатной температуре и оценивали зоны просветления вокруг бактериальных колоний, означающие расщепление белков молока (Шепелин, Дятлов, 2017).

Фосфат-мобилизующую способность определяли на агаризованной среде NBRIP, содержащей нерастворимый фосфат кальция Ca₃(PO₄)₂ в качестве единственного источника фосфора. Бактерии инкубировали на чашках Петри в течение 3 сут при 37°C, затем оценивали зоны просветления (растворения нерастворимого фосфата) вокруг бактериальной колонии. Среда NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) (г/л dH₂O): глюкоза – 10.0; Ca₃(PO₄)₂ – 5.0; MgCl₂ · 6H₂O – 5.0; MgSO₄ · 7 H₂O – 0.25; KCl – 2.0; (NH₄)₂SO₄ – 0.1; агар – 2; pH 6.8–7.0.

Количественное определение содержания свободных фосфатов определяли калориметрически с помощью молибдата аммония. Метод основан на способности неорганических фосфатов в кислой среде образовывать с молибдатом аммония соединение желтого цвета – фосфорно-молибденовокислый аммоний (Горшкова и соавт., 2015). В две опытные пробирки вносили по 100 мкл культуральной жидкости штаммов бактерий *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11, выращенные на жидкой среде NBRIP. В качестве контроля использовали стерильную питательную среду NBRIP. Во все пробирки вносили по 750 мкл свежеприготовленного реагента ААМ (10 мМ гептамолибдат аммония, раствор 5 н H₂SO₄ и ацетон в соотношении 1 : 1 : 2). Затем в пробирки добавляли по 50 мкл 1 М лимонной кислоты. Пробирки центрифугировали в течение 5 мин при 8000 об./мин. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре “iMark™ Bio-Rad” (США) в сравнении с плотностью дистиллированной воды при длине волны излучения λ = 355 нм в 1 см кювете. Концентрацию свободных фосфатов определяли по калибровочному графику стандартного раствора фосфорнокислого калия, молярная концентрация фосфатов в котором составляла 5 мкмоль/мл, готовили серию разведений. При внесении штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 в питательную среду, концентрация фосфатов в среде составляла около 100 мкмоль/мл. Это значение взято за исходный показатель для оценки активности штамма.

Фитат-мобилизующую способность определяли на агаризованной среде PSM, содержащей нерас-

творимый фитат кальция в качестве единственного источника фосфора. PSM (Phytase Screening Medium) (г/л dH₂O): CaCl₂ – 2; NH₄NO₃ – 5; KCl – 0.5; MgSO₄ · 7H₂O – 0.5; FeSO₄ · 7H₂O – 0.01; MnSO₄ · H₂O – 0.01; глюкоза – 20; фитат натрия – 4; агар – 2; pH 6.8–7.0. Фитат-гидролизующую способность оценивали после инкубации в течение 3 сут при 37°C по наличию зон просветления вокруг бактериальной колонии.

Способность штаммов к фиксации атмосферного азота определяли на селективной питательной среде Эшби, не содержащей источника азота, поэтому только бактерии, обладающие способностью фиксировать азот из атмосферы, образовывали колонии на данной среде (Концевая, 2017).

Синтез сидерофоров определяли на дифференциальной среде с хромазулолом S (агаризованная CAS среда) (Payne et al., 1994). Для посева бактерии *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 на CAS среду использовали 12-часовой инокулят, выращенный на среде LB при 37°C и 200 об./мин. Выращенный инокулят центрифугировали при 6 тыс. об./мин в течение 2 мин, осажденные клетки трижды промывали минимальной средой M9. На CAS среду посев проводили путем внесения 5 мкл суспензии промытых клеток в среде M9. В качестве контрольного штамма использовали *Salmonella typhimurium*, который образует сидерофоры (Muller et al., 2017). Плотность клеток опытного и контрольного штамма (ОП₆₀₀) составляла 0.1.

Способность штаммов к биосинтезу сидерофоров катехолового ряда определяли на минимальной солевой среде M9 в объеме 20 мл с добавлением 2,2-бипиридила (3.36 мкл) по методу Арноу (Payne et al., 1994). Метод Арноу позволяет детектировать формирование сидерофоров катехолового типа по их способности связывать гидроксильные группы с металлом (Na₂MoO₄), в результате чего образуется розовая окраска. Количество продуцируемых сидерофоров определяли с помощью калибровочной кривой по 2,3-дигидроксибензойной кислоте (2,3-DHBA), растворенной в спирте.

Определение продукции ИУК тестировали по модифицированному методу Брик (Bric et al., 1991). Концентрацию ИУК в супернатанте определяли с помощью калибровочной кривой, построенной с использованием раствора синтетической ИУК с шагом 20 мкг/мл.

Для определения фунгицидной активности штаммов использовали метод лунок Petatan-Sagahon (Petatan-Sagahon et al., 2011). В качестве тест-организмов в работе использовали следующие штаммы микромицетов: *Fusarium solani*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*. Данные штаммы микромицетов выделены из пораженных клубней картофеля в отделе сельскохозяйственной биотехнологии ГНУ Татарский НИИ сельского хозяйства Россельхозакадемии и идентифицированы нами

ранее с помощью анализа последовательностей 5.8S рРНК со стандартными праймерами ITS1 и ITS4.

Статистический анализ проводили с использованием программы Microsoft Excel. Для описания и сравнения признаков использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Коммерциализация биоудобрений на основе бактерий ограничена в связи со сложностью использования лабораторных штаммов в полевых условиях из-за ряда факторов, таких как физико-химические свойства почвы, взаимодействие с другими ризосферными организмами, экологических факторов. Важной стратегией для преодоления этих ограничений является использование нативных микроорганизмов, адаптированных к климатическим условиям региона. Многие биотические и абиотические факторы оказывают влияние на рост бактерий и ограничивают их использование в качестве биоудобрений (Martins et al., 2018). Мы проводили изучение влияния абиотических факторов (температуры, pH и солености) на рост штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11. Штамм *P. brenneri* AS3 показал оптимальный рост при температурах в диапазоне 26–28°C и pH 6.0–7.0. Оптимальными условиями для роста штамма *B. ginsengihumi* M2.11 явились температура 26–37°C при значениях pH 7.0 и 8.0. Данные свидетельствуют, что штаммы *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 являются мезофильными микроорганизмами. Концентрация соли в среде для культивирования штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 в диапазоне от 0 до 1000 мМ не имела значительного влияния на рост штаммов, что указывает на их галотолерантность.

К свойствам PGPR, которые усиливают рост растений и подавляют развитие фитопатогенов, относится биосинтез биологически активных соединений. Например, выделение аммиака оказывает разрушительное воздействие на клеточные стенки микромицетов (Minaxi et al., 2012). Цианиды обладают высокой проникающей способностью и ингибируют ферменты дыхательной цепи микромицетов (Хан, 2011). Бактериальные ферменты, целлюлазы и протеазы, ингибируют развитие фитопатогенных грибов, благодаря гидролизу компонентов их клеточной стенки (Kavamura et al., 2013). Мы изучали способность штаммов к продукции этих соединений.

Исследуемые штаммы *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 способны к продукции внеклеточных протеаз, на что указывали зоны просветления (гидролиз казеина) вокруг колоний на молочном агаре (рис. 1а). Наличие зон просветления вокруг бактериальных колоний на среде CYEA с КМ-

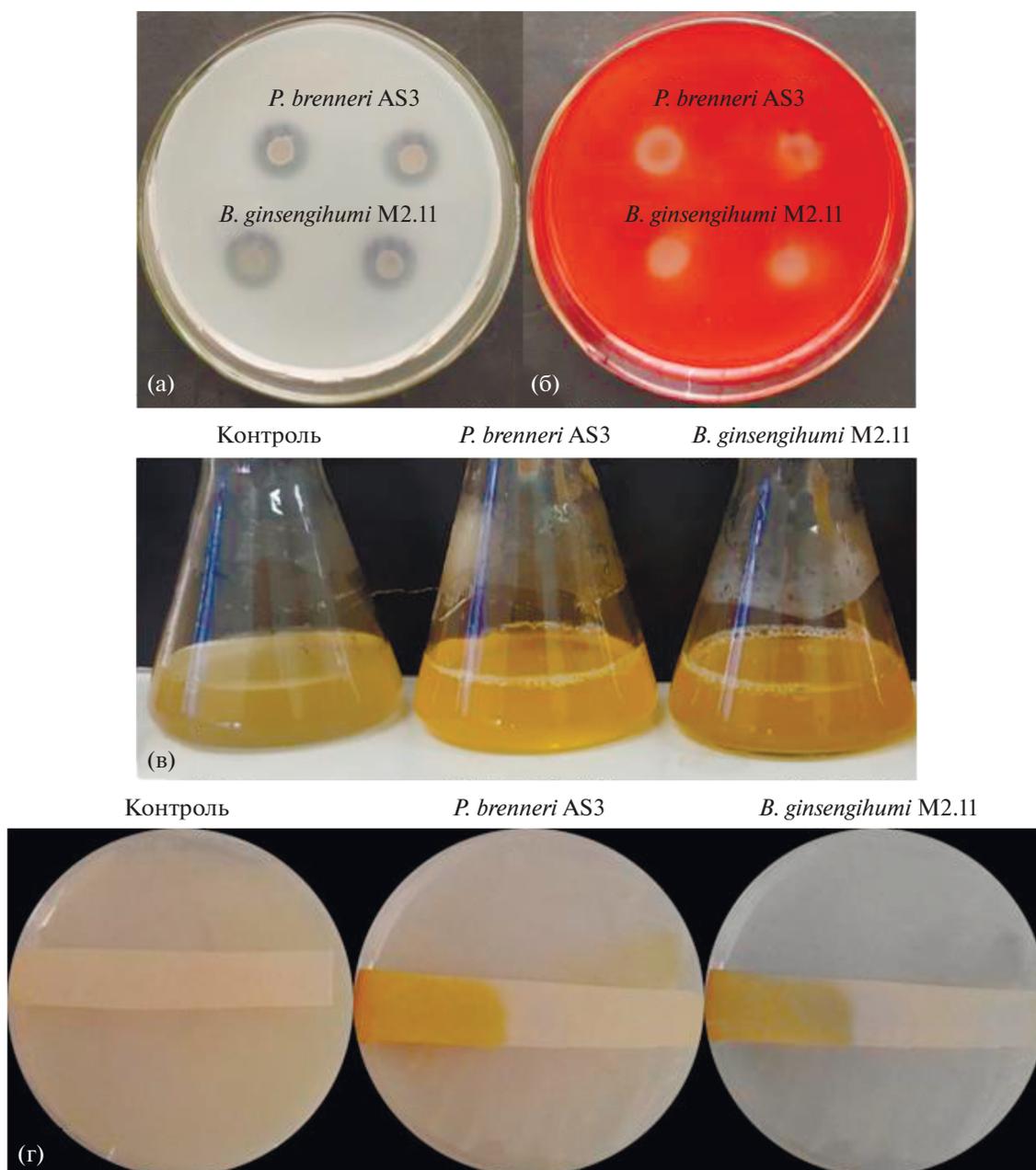


Рис. 1. Физиолого-биохимические свойства штаммов *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11: а – зоны гидролиза казеина; б – целлюлазная активность; в – продукция аммиака (NH_3); г – продукция синильной кислоты (HCN).

целлюлозой свидетельствовало о продукции штаммами внеклеточных целлюлаз (рис. 1б). При росте штаммов на пептонной воде после добавления реагента Несслера произошло изменение цвета инокулята до ярко-желтого, что указывало на продукцию аммиака в процессе культивирования бактерий (рис. 1в). Культивирование штаммов *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 на среде TSA привело к изменению цвета фильтровальной бумаги, предварительно смоченной пикриновой кислотой, что свидетельствовало о способности штаммов синтезировать синильную кислоту (HCN)

(рис. 1г). Таким образом, при исследовании биохимических свойств штаммов *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 нами установлена способность к синтезу аммиака (NH_3) и цианидов (HCN), протеолитическая и целлюлазная активности, которые могут играть важную роль при защите растений от фитопатогенных микромицетов.

Способность штаммов *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 к разложению соединений фосфора и фиксации атмосферного азота. Фосфор является лимитирующим фактором в питании растений. Не

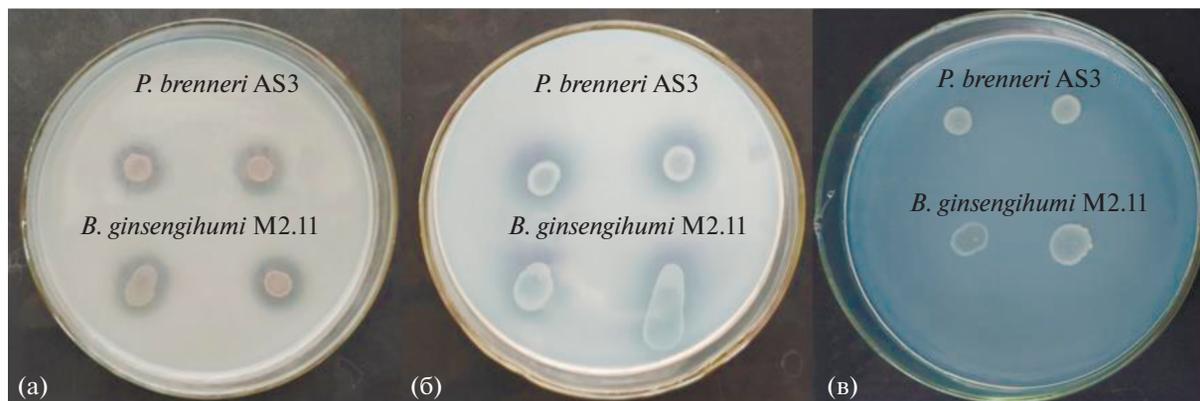


Рис. 2. Фосфат-мобилизующая (а) и фитат-гидролизующая (б) активности и фиксация атмосферного азота (в) штаммами *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11.

более 3–5% от вносимого с химическими удобрениями фосфора используется растениями, это явление носит название “фосфорный парадокс”. Почвенные микроорганизмы способны растворять фосфаты из нерастворимых неорганических и органических фосфат-соединений и способствуют росту растений за счет увеличения биодоступности фосфора (Bhattacharya, 2019). Способность к высвобождению фосфатов из нерастворимых фосфорных соединений лежит в основе создания инновационных агробиотехнологий, поскольку повышение уровня усвояемости минерального питания и внесение биоудобрений способствует снижению колонизации корней растений фитопатогенными грибами.

Способность штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 к разложению труднодоступных почвенных соединений фосфора исследовали на среде NBRIP с нерастворимым фосфатом кальция $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и среде PSM с нерастворимым фитатом кальция в качестве единственного источника фосфора. Оба штамма способны расти и образовывать выраженные зоны гидролиза на этих средах (рис. 2а, 2б). По нашим данным исследуемые штаммы обладают фосфат-мобилизующей активностью, позволяющей использовать в качестве источника фосфора неорганические и органические почвенные фосфаты.

Определяли концентрацию свободных фосфатов в среде при культивировании штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11. Через 48 ч культивирования штамма *P. brenneri* AS3 концентрация свободного и доступного для вовлечения в питание растений фосфата составляла 18050 ± 900 мкг/мл. Через 94 ч культивирования при 37°C концентрация свободных фосфатов достигала максимума ($42\,743 \pm 2130$ мкг/мл), у *B. ginsengihumi* M2.11 – 55020 ± 2700 мкг/мл, что свидетельствует о 6-кратном увеличении концентрации свободных фосфатов в среде при росте штамма бактерий *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11, по сравнению с кон-

тролем (100 мкмоль/мл, 7200 мкг/мл). Известно, что фосфатрастворяющий штамм бактерий *Pseudomonas* sp. 181a (Патент RU 2451069), используемый для защиты растений от болезней, вызываемых грибами рода *Fusarium* и повышения урожайности, обладает высокими фосфат-мобилизующими свойствами: переводит в раствор до 2620 мкг/мл фосфата, что более чем в 6 раз ниже исследуемых нами штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11. Максимальная концентрация высвобождающегося фосфора штаммом *B. megaterium* составляла 483 ± 50 мкг/мл (Prochownik et al., 2018), штаммом *P. agglomerans* lma2 – 1061.49 мкг/мл (Silini-Cherif, et al., 2012), что существенно ниже полученных нами показателей.

Изучали способность исследуемых штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 к фиксации атмосферного азота с помощью дифференциальной питательной среды Эшби. При культивировании на питательной среде без источника азота, штаммы формировали колонии на 12 ч роста, что говорит об их способности к использованию молекулярного азота (рис. 2в). Сформированные колонии были с ровными краями, гладкие, плоские, блестящие, непигментированные. Способность фиксировать азот бактериями рода *Bacillus* и *Pantoea* также выявлена другими исследователями (Dutkiewicz et al., 2016).

Таким образом, способность исследуемых почвенных штаммов к разложению соединений фосфора и фиксации атмосферного азота значима для улучшения питания растений сельскохозяйственных культур. Увеличение концентрации свободных фосфатов в среде не менее чем в 6 раз за 94 ч культивирования является важным фактором при использовании этих штаммов в качестве стимуляторов роста растений.

Биосинтез сидерофоров. Железо является важным питательным компонентом, в почве оно находится в нерастворимой трехвалентной форме (Fe^{3+}). Сиде-

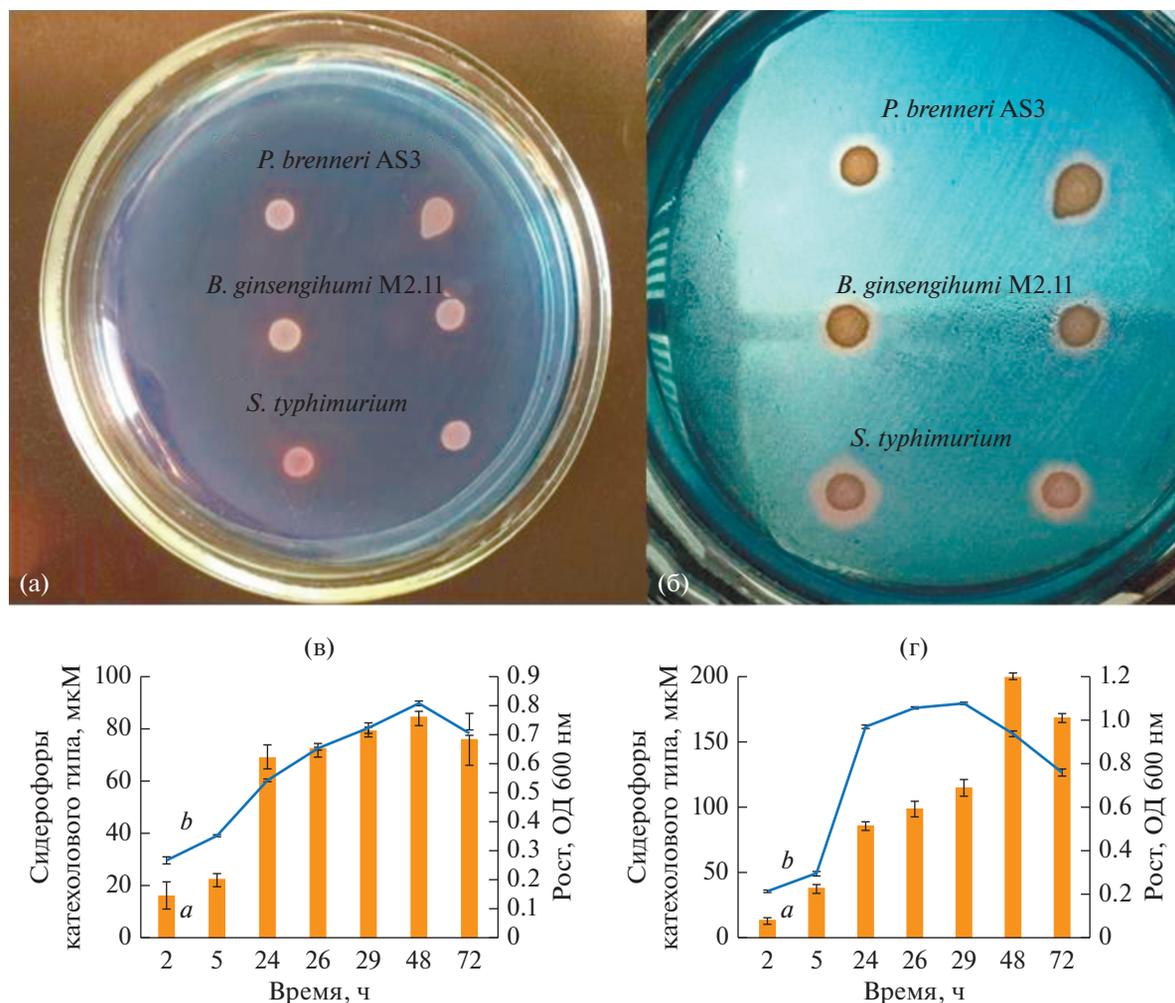


Рис. 3. Синтез сидерофоров на дифференциальной CAS-среде на 12 ч (а) и 72 ч (б) роста; динамика биосинтеза сидерофоров и роста штаммов *P. brenneri* AS3 (в) и *B. ginsengihumi* M2.11 (г).

сидерофоров — низкомолекулярные редокс-активные соединения, которые восстанавливают Fe^{3+} до Fe^{2+} . Связывание железа сидерофорами приводит к ограничению роста фитопатогенных организмов. Важная роль сидерофоров в антагонистических взаимоотношениях бактерий с почвенными фитопатогенами и в стимуляции роста растений показана при инокуляции растений штаммами, продуцирующими сидерофоры; отмечено супрессирующее действие сидерофоров на фитопатогены и стимулирующее — на рост растений (Kramer et al., 2019).

Определяли способность штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 к синтезу сидерофоров на дифференциальной CAS-среде с хромозуром *S. typhimurium*. Формирование зоны просветления (0.7 см) на CAS-агаре происходило через 12 ч инкубации при 37°C (рис. 3а). Максимальную зону просветления (2.0 см) наблюдали на третьи сутки инкубации (рис. 3б). Синий цвет среды обусловлен формиро-

ванием комплекса красителя с железом (Fe^{3+}), который разрушается при восстановлении сидерофорами железа до двухвалентной формы, что приводит к изменению цвета среды.

Известно, что представители родов *Pantoea* и *Bacillus* синтезируют сидерофоры катехолового типа — энтеробактин и бацилбактин соответственно (Cornelis, 2010). Мы определяли продукцию бактериями сидерофоров катехолового ряда методом Арноу на жидкой среде М9, основанном на образовании комплекса металла с гидроксильной группой сидерофора. Сидерофоры катехолового типа в концентрации 22 ± 5 мкМ обнаружены на 5 ч культивирования штамма *P. brenneri* AS3 (рис. 3в). Штамм *B. ginsengihumi* M2.11 на 5 ч культивирования продуцировал 38 ± 6 мкМ сидерофора (рис. 3г). Максимальная продукция сидерофоров обнаружена у *B. ginsengihumi* M2.11 в количестве 198 ± 8 мкМ на 48 ч культивирования. Максимум продукции сидерофоров штаммом *P. brenneri* AS3

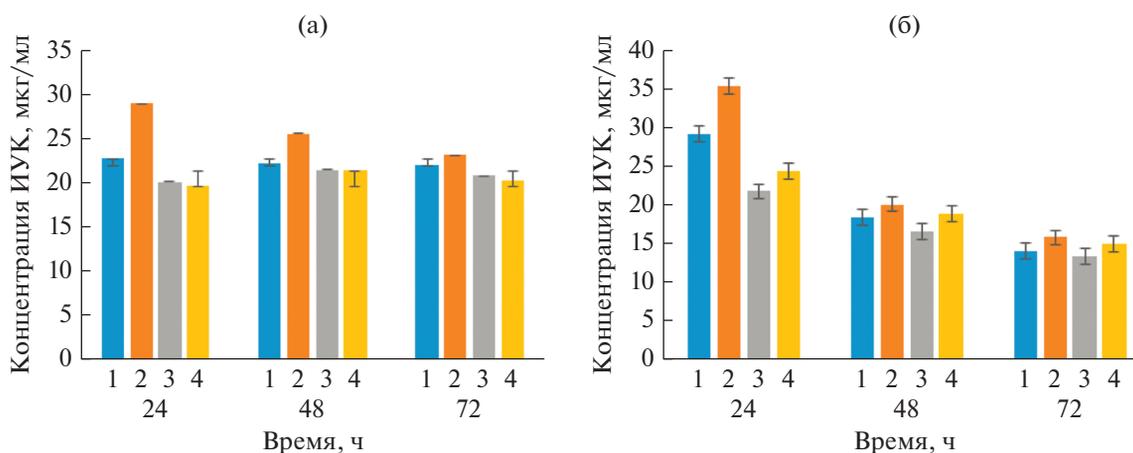


Рис. 4. Биосинтез ИУК штаммами *P. breunneri* AS3 (а) и *B. ginsengihumi* M2.11 (б).

так же пришелся на 48 ч культивирования и составил 84 ± 7 мкМ, т.е. вдвое меньше, чем у *B. ginsengihumi* M2.11. В момент максимального накопления сидерофоров плотность клеток (OD_{590}) составляла 0.809 у штамма *P. breunneri* AS3 и 0.733 у *B. ginsengihumi* M2.11. По данным литературы известно, что концентрация сидерофоров штамма *B. megaterium* достигала максимального уровня через 24 ч, когда бактерии находились в стационарной фазе, и составляла 140 мкМ (Kavamura et al., 2013). Штаммы *B. subtilis* и *P. allii* синтезировали на 24 ч роста по 60 мкМ (Carlos et al., 2019), а штамм *Bacillus* sp. STJP продуцировал 80 мкМ сидерофор (Prakash, Aroga 2019), что существенно меньше по сравнению с исследуемыми нами штаммами.

Таким образом, по сравнению с другими представителями родов *Pantoea* и *Bacillus*, нами установлен высокий уровень продукции сидерофоров катехолового типа штаммами *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11, что важно для использования этих микроорганизмов в качестве биоудобрений для решения проблем, связанных с недостатком железа в питании растений.

Биосинтез индолилуксусной кислоты. Ауксин индолил-3-уксусная кислота (ИУК) способствует росту и развитию растений посредством стимуляции деления клеток, роста и дифференцировки растения, увеличения объема корня, площади его поверхности и диаметра. ИУК является одним из естественных ауксинов, предшественником которой является аминокислота L-триптофан. Показано, что некоторые бактерии из рода *Pantoea* и *Bacillus* способны синтезировать ИУК, например, *P. agglomerans* lma2, *P. ananas* (Walterson et al., 2015), *B. subtilis* (Mt3b) и *Bacillus* sp. (Chagas et al., 2015). Поскольку естественной средой обитания штаммов *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 является почва, мы исследовали способность этих штаммов синтезировать фитогормон ИУК.

ИУК-продуцирующая активность PGPR варьирует в зависимости от вида и контролируется условиями культивирования и стадией роста (Acuna et al., 2011). Для оптимизации условий синтеза ИУК использовали различные среды (LB, dLB – разбавленная в 10 раз LB) и с разными значениями pH в диапазоне от 5.0 до 7.0. Динамика биосинтеза ИУК представлена на рис. 4. Оптимальной средой для биосинтеза ИУК являлась среда dLB с pH 7. *B. ginsengihumi* M2.11 синтезировал ИУК в количестве 34 ± 3 мкг/мл на 24 ч культивирования, затем количество ИУК в среде снижалось (рис. 4а). Штамм *P. breunneri* AS3 синтезировал 29 ± 2 мкг/мл ИУК на 24 ч культивирования (рис. 4б). Бактерии, способные синтезировать ИУК более 13 мкг/л, рассматриваются как PGPR (ростстимулирующие ризобактерии) (Barazani, Friedman, 2000). Исходя из этого, исследуемые штаммы *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 можно отнести к PGPR-бактериям. Известно, что *B. cereus* (So3II) и *B. subtilis* (Mt3b) продемонстрировали высокий выход ИУК – 35.8 и 36.6 мкг/мл соответственно (Wagi, Ahmed, 2019). Штамм *Bacillus* sp. STJP продуцировал 30.59 мкг/мл ИУК (Prakash, Aroga, 2019), что коррелирует с полученными нами данными.

Таким образом, продукция исследуемыми штаммами фитогормона – индолил-3-уксусной кислоты может способствовать стимуляции роста растений за счет развития их корневой системы.

Фунгицидная активность штаммов *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 исследована на агаризованной среде LB. Установлено, что изучаемые нами штаммы обладали способностью к ингибированию роста микромицетов (рис. 5). Максимальная ингибирующая способность проявлялась по отношению к *Fusarium solani* – возбудителю корневой гнили и трахеомикозного увядания (Kosmidis, Denning, 2017): рост гриба в присутствии *P. breunneri* AS3 ингибировался на 90%, в

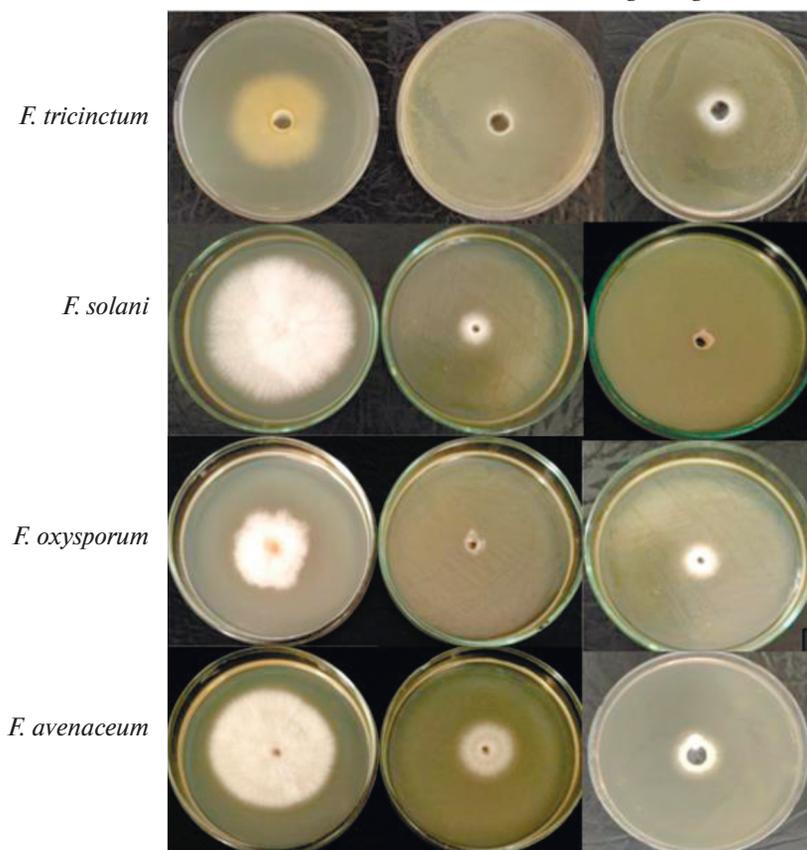
P. brenneri AS3 *B. ginsengihumi* M2.11

Рис. 5. Антагонистические свойства штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 по отношению к фитопатогенным микромицетам рода *Fusarium*.

присутствии *B. ginsengihumi* M2.11 – на 93%. Высокий ингибирующий эффект (от 63 до 87%) исследуемые бактерии проявляли по отношению ко всем исследуемым представителям рода *Fusarium* – *F. tricinctum*, поражающего колос зерновых культур, *F. oxysporum*, вызывающего вилт и увядание,

F. avenaceum, вызывающего фузариоз зерна (табл. 1) (Kosmidis, Denning, 2017).

Таким образом, бактериальные изоляты *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 проявляют антимикробное действие по отношению к микромицетам-фитопатогенам рода *Fusarium*. Ингибирование

Таблица 1. Ингибирование роста мицелия микромицетов рода *Fusarium* штаммами *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11

Вид микромицетов	Заболевание	Ингибирование роста мицелия штаммом <i>P. brenneri</i> AS3, %		Ингибирование роста мицелия штаммом <i>B. ginsengihumi</i> M2.11, %	
		5 сут	10 сут	5 сут	10 сут
<i>F. tricinctum</i>	Фузариоз колоса зерновых культур	80 ± 3	86 ± 3	75 ± 3	80 ± 3
<i>F. solani</i>	Корневая гниль	85 ± 4	90 ± 3	87 ± 4	93 ± 4
<i>F. oxysporum</i>	Фузариоз колоса, корневая гниль	78 ± 2	87 ± 2	81 ± 3	90 ± 4
<i>F. avenaceum</i>	Фузариоз зерна	58 ± 2	63 ± 2	62 ± 3	70 ± 3

роста фитопатогенов рода *Fusarium* представителями рода *Pantoea* и *Bacillus* описано многими авторами (Liu et al., 2013; Khan et al., 2018, Хадиева и соавт., 2018).

Потребность сельского хозяйства в средствах защиты растений увеличивается с каждым годом, и проблема совершенствования технологии биологической защиты растений представляется чрезвычайно актуальной. Грамотное применение бактериальных препаратов на основе ростостимулирующих ризобактерий, как элемента экологического земледелия в технологиях выращивания сельскохозяйственных культур, позволяет существенно снизить химическую нагрузку на экосистемы вследствие уменьшения количеств применяемых минеральных удобрений и химических средств защиты растений, приводит к повышению урожайности и улучшению качества экологически чистой сельскохозяйственной продукции (Martins et al., 2018).

Исследуемые штаммы *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 обладают множественными положительными эффектами, способными повлиять на рост и жизнедеятельность растений. Штаммы обладают целлюлазной и протеазной активностью что играет важную роль в разложении органического вещества для питания растений. Оба штамма выделяют ионы аммония и синильной кислоты, что способствует росту растений и подавляет развитие фитопатогенов, благодаря выделению в ризосферу ионов водорода и повышению кислотности почвы (Xu, 2014). Штаммы *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 имеют способность к разложению фосфатов и фитатов, фиксации молекулярного азота, продукции сидерофоров и ИУК, что, в свою очередь, качественно улучшает питание растение макро- и микроэлементами и предотвращает хелатирование почвы. Выявлена высокая (до 93% ингибирования) фунгицидная активность исследуемых штаммов. Таким образом, обладая множественными полезными для растений характеристиками, штаммы *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 могут быть использованы в качестве объектов для создания технологий биоудобрений и стимуляторов роста растений. Полученные нами результаты полезны для определения стратегий использования этой группы бактерий, обладающих способностью продуцировать целый ряд метаболитов, которые стимулируют рост растений и уменьшают воздействие патогенных микроорганизмов, в качестве агентов биологического контроля.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-38-90208.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

В настоящей статье отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горшкова О.М., Горецкая А.Г., Корешкова Т.Н., Краснушкин А.В., Марголина И.Л., Потапов А.А., Працкина Е.М., Шкиль А.Н. Методы лабораторных и полевых исследований / Под ред. Слипенчука М.В. М.: Географический факультет МГУ, 2015. 220 с.
- Концевая И.И. Микробиология: культивирование и рост бактерий. Практическое руководство для студ. биологич. спец. вузов. г. Гомель. Полиграф. Министерство образования РБ, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины, 2017. 44 с.
- Коряжкина М. Ф. Особенности взаимодействия *Bacillus atrophaeus* В-9918 с растениями и фитопатогенными грибами. Дис. ... канд. биол. наук. 14.03.2012. Саратов: ИБФРМ РАН, 2012. 158 с.
- Сулейманова А.Д., Иткина Д.Л., Шарипова М.Р. Штамм бактерий *Pantoea breunneri*, обладающий фосфатмобилизующей и фунгицидной активностью. Патент РФ № 2654595. Заявка № 2017130448 от 28.08.2017.
- Дунайцев И.А., Клыккова М.В., Кондрашенко Т.Н., Сомов А.Н., Старшов А.А., Аитов Р.С., Дятлов И.А. Фосфатрастворяющий штамм *Pseudomonas species* 181a с фунгицидными свойствами. Патент РФ № 2451069. Заявка № 2010143691/10 от 27.10.2010.
- Хадиева Г.Ф., Лутфуллин М.Т., Мочалова Н.К., Ленина О.А., Шарипова М.Р., Марданова А.М. Новые штаммы *Bacillus subtilis* как перспективные пробиотики // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 356–365.
- Khadieva G.F., Lutfullin M.T., Mochalova N.K., Lenina O.A., Sharipova M.R., Mardanova A.M. New *Bacillus subtilis* strains as promising probiotics // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 463–470.
- Хан В.В. Закономерности взаимодействия организма с веществами раздражающего, пульмотоксического и общеядовитого действия. Учебно-методическое пособие для студентов V курсов лечебного, педиатрического, IV курса стоматологического факультетов. Краснодар, 2011.
- Хрусталева Г.А., Алахвердиев С.Р. Способ ингибирования активности бактерий *Salmonella enteritidis* в почве // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 3. С. 413.
- Шепелин А.П., Дятлов И.А. Питательные среды для энтеробактерий. М.: Династия, 2017. 232 с.
- Acuna J.J., Jorquera M.A., Martinez O.A., Menezes-Blackburn D., Fernandez M.T., Marschner P., Greiner R., Mora M.L.

- Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals // *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2011. V. 11. P. 1–12.
- Akhmetova A.A., Suleimanova A.D., Toymentseva A.A., Balaban N.P., Iljukhina D.L., Sharipova M.R. Heterologous expression of *Bacillus ginsengihumi* phytase gene // *Research J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2015. V. 6. P. 117–122.
- Barazani O., Friedman J. Effect of exogenously applied l-tryptophan on allelochemical activity of plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) // *J. Chem. Ecol.* 2000. V. 26. P. 343–349.
- Bhattacharya A. Changing environmental condition and phosphorus-use efficiency in plants // *Changing Climate and Resource Use Efficiency in Plants* / Ed. Bhattacharya A. London: Elsevier, Academic Press, 2019. V. 5. P. 241–305.
- Bric J.M., Bostock R.M., Silverstone S.E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. P. 535–538.
- Carlos M.H.F., Vilas-Boas A., Sousa C.A., Soares M.V.M., Soares E.V. Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions // *AMB Express.* 2019. V. 9. Art. 78. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0796-3>
- Chagas A.F. Oliveira A.G., Oliveira L.A., Santos G.R., Chagas L.F.B., Lopes A.L. Production of indole-3-acetic acid by *Bacillus* isolated from different soils // *Bulgar. J. Agric. Sci.* 2015. V. 21. P. 282–287.
- Cornelis P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 86. P. 1637–1645.
- De Maayer P., Aliyu H., Vikram S., Blom J., Duffy B., Cowan D.A., Smits T.H.M., Venter S.N., Coutinho T.A. Phylogenomic, pangenomic, pathogenomic and evolutionary genomic insights into the agronomically relevant enterobacteria *Pantoea ananatis* and *Pantoea stewartii* // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 17–55.
- Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Lemieszek M.K., Golec M., Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects // *Ann. Agric. Environ. Med.* 2016. V. 23. P. 206–222.
- Kavamura V.N., Santos S.N., da Silva J.L., Parma M.M., Avila L.A., Visconti A., Zucchi T.D., Taketani R.G., Andreote F.D., de Melo I.S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought // *Microbiol. Res.* 2013. V. 168. P. 183–191.
- Khan N., Martinez-Hidalgo P., Ice A., Maymon M., Humm A., Nejat N., Sanders R., Kaplan D. Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 23–63.
- Kosmidis C.D., Denning W. Opportunistic and Systemic Fungi // *Infectious Diseases (Fourth Edition)*. 2017. V. 2. P. 1681–1709.
- Kramer J., Ozkaya O., Kummerli R. Bacterial siderophores in community and host interactions // *Nature Rev. Microbiol.* 2019. V. 18. P. 152–163.
- Liu W., Chen Z., Zhang T., Lu C. Application of *Pantoea agglomerans* strain Z01 to control *Fusarium* wilt and its effect on the quality parameters of rockets // *Ann. Microbiol.* 2013. V. 64. P. 1443–1446.
- Martins V.M., Paula M.M., Takita M.A., De Souza A.A. Persistence in phytopathogenic bacteria: do we know enough? // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 1099.
- Minaxi L.N., Yadav R.C., Saxena J. Characterization of multifaceted *Bacillus* sp. RM-2 for its use as plant growth promoting bioinoculant for crops grown in semiarid deserts // *Appl. Soil Ecol.* 2012. V. 59. P. 124–135.
- Muller A., Schader C., Scialabba N.E., Bruggemann J., Isensee A., Erb K., Smith P., Klocke P., Leiber F., Stolze M., Niggli U. Strategies for feeding the world more sustainably with organic agriculture // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 1290–1304.
- Norovsuren J., Boykova I.V., Savich V.I., Zenova G.M. Ecological functions of soil actinomycetes of Mongolia // *Proc. 21th ISTRO Conference, Paris, France.* 2018. P. 357–358.
- Payne M. Detection, isolation, and characterization of siderophores // *Methods Enzymol.* 1994. V. 235. P. 329–344.
- Petatan-Sagahon I., Anducho-Reyes M.A., Silva-Rojas H.V., Arana-Cuenca A., Tellez-Jurado A., Cardenas-Alvarez I.O., Mercado-Flores Y. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora* // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. V. 12. P. 5522–5537.
- Prakash J., Arora N.K. Phosphate-solubilizing *Bacillus* sp. enhances growth, phosphorus uptake and oil yield of *Mentha arvensis* L. // *3 Biotech.* 2019. V. 9. P. 126. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1660-5>
- Prochownik E., Dobrowolska-Iwanek J. Phosphorus solubilization by *Bacillus* species // *Molecules.* 2018. V. 23. Art. 2897.
- Silini-Cherif H., Silini A., Ghoul M., Yadav S. Isolation and characterization of plant growth promoting traits of a Rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* Ima2 // *Pakistan J. Biol. Sci.* 2012. V. 15. P. 267–276.
- Smits T.H.M., Rezzonico F., Kamber T., Blom J., Goesmann A., Ishimaru C.A., Frey J.E., Stockwell V.O., Duffy B. Metabolic versatility and antibacterial metabolite biosynthesis are distinguishing genomic features of the fire blight antagonist *Pantoea vagans* C9-1 // *PLoS One.* 2011. V. 6. e22247.
- Suleimanova A.D., Beinhauer A., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Balaban N.P., Shakirov E.V., Greiner R., Sharipova M.R. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. P. 6790–6799.
- Veliz E.A., Martinez-Hidalgo P., Hirsch A.M. Chitinase producing bacteria and their role in biocontrol // *AIMS Microbiol.* 2017. V. 3. P. 689–705.
- Wagi S., Ahmed A. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA // *Peer J.* 2019. V. 23. e7258.
- Walterson A.M., Stavrinides J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2015. V. 39. P. 968–984.
- Xu S.J., Kim B.S. Biocontrol of *Fusarium* crown and root rot and promotion of growth of tomato by *Paenibacillus* strains isolated from soil // *Mycobiol.* 2014. V. 42. P. 158–166.

***Pantoea brenneri* AS3 and *Bacillus ginsengihumi* M2.11 as Potential Biocontrol and Plant Growth-Promoting Agents**

D. L. Itkina^{1,*}, A. D. Suleimanova¹, and M. R. Sharipova¹

¹*Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420008 Russia*

**e-mail: laia9301@mail.ru*

Received July 19, 2020; revised October 10, 2020; accepted November 11, 2020

Abstract—The mechanisms of biocontrol action of the strains *Pantoea brenneri* AS3 and *Bacillus ginsengihumi* M2.11 were investigated. The ability of the strains to release ammonium and cyanide ions was established, as well as their cellulase and protease activity and ability to fix nitrogen and to mobilize soil phosphates and phytates. The strains were able to synthesize siderophores, with their maximum production observed 48 h of cultivation reaching $198 \pm 8 \mu\text{M}$ in *B. ginsengihumi* strain M2.11 and $84 \pm 7 \mu\text{M}$ in *P. brenneri* strain AS3. The bacteria produced a phytohormone, indoleacetic acid (IAA), with the yields of 34 ± 3 and $29 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ for *B. ginsengihumi* M2.11 and *P. brenneri* AS3, respectively, after 24 h of growth. It was found that both strains had fungicidal activity against plant pathogens of the genus *Fusarium*: the growth of different *Fusarium* species was inhibited by more than 90% in the presence of *P. brenneri* AS3 or *B. ginsengihumi* M2.11. It was concluded that the strains *P. brenneri* AS3 and *B. ginsengihumi* M2.11, which possess multiple characteristics useful to plants, may be used as objects for creating biofertilizers and plant growth stimulators.

Keywords: *Pantoea*, *Bacillus*, biological activity, siderophores, IAA, fungicidal activity