



УДК 581.2:579.842.11

Биологические свойства бактерий, выделенных из растений побережья озера Байкал

А. Л. Турская, Ю. А. Маркова, М. А. Живетьев, Т. Н. Беловежец, И. А. Граскова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
E-mail: turskaya-anna@mail.ru

Аннотация. Выделены культуры микроорганизмов из эндосферы растений, произрастающих на побережье оз. Байкал: вероники дубравной, манжетки городковатой, тысячелистника азиатского, одуванчика лекарственного, подорожника большого. Исследованы морфология и биохимические свойства выделенных бактерий, показана их возможная роль в адаптации растений-хозяев к условиям климата Прибайкалья.

Ключевые слова: микроорганизмы, растения, эндосфера, адаптация.

Введение

В природных условиях растительные организмы взаимодействуют с огромным количеством различных видов микроорганизмов. Продуцируя целый комплекс органических соединений, они создают уникальную среду, включающую в себя три основных пространства: ризосферу – почвенную среду обитания микроорганизмов, находящуюся непосредственно под влиянием жизнедеятельности корневой системы растения-хозяина; филлосферу – местообитание микроорганизмов, связанное с поверхностью листа (микроорганизмы-эпифиты); эндосферу – местообитание микроорганизмов внутри растительных тканей (микроорганизмы-эндофиты). Из всех перечисленных сообществ эндофиты являются наименее изученными. Особенно актуален вопрос изучения роли этих микроорганизмов в адаптации растений. Известно, что, снабжая растительный организм полезными веществами, например, фиксированным азотом, фитогормонами, они могут способствовать их адаптации к различным условиям окружающей среды, усиливая фотосинтез и продуктивность, устойчивость к действию фитопатогенов и пр. [1; 9; 11].

Озеро Байкал находится в зоне резко континентального климата, где значительные сезонные и суточные перепады температур заметно влияют на состояние и механизмы функционирования его экосистемы. Действие абиотических стрессоров приводит к активации защитных и приспособительных реакций, в результате чего растение акклиматизируется к новым условиям посредством активации ряда

ферментов и синтеза биологически активных веществ. Не исключено, что устойчивость растений к температурным условиям места произрастания обеспечивается, в том числе, эндофитными микроорганизмами.

Целью данной работы явилось изучение биологических свойств бактерий, выделенных из растений, растущих на побережье оз. Байкал и оценка их вклада в процессы адаптации растений к климатическим условиям Прибайкалья.

Материалы и методы

Выделялись микроорганизмы из эндосферы лекарственных растений, произрастающих на побережье оз. Байкал: вероники дубравной (*Veronica chamaedrys* L.); манжетки городковатой (*Alchemilla subscrenata* Buser); тысячелистника азиатского (*Achillea asiatica* Serg.); одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.); подорожника большого (*Plantago major* L.). Растения были собраны в пойме левого берега р. Выдриной в 600 м от береговой черты оз. Байкал.

Навеску листьев растений в 3 г промывали проточной водой, стерилизовали в течение 10 мин 10%-ным раствором гипохлорита натрия, отмывали дистиллированной стерильной водой, растирали в ступке и высевали на мясопептонный агар. Чашки с агаром инкубировали при температуре 26 °С.

Морфология бактериальных культур изучалась с помощью микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss), тинкториальные свойства бактерий оценивались с помощью КОН-теста, каталазную активность и показатели окисле-

ния/ферментации среды определяли с помощью стандартных тест-наборов (НИЦФ, Санкт-Петербург, Россия). Для идентификации полученных культур проводили описание их роста на плотной питательной среде и на бульоне, а также определяли ферментативную активность бактерий.

Определение целлюлолитической активности бактерий. Чашки с колониями, выращенными на среде с карбоксиметилцеллюлозой, окрашивали в течение 15 мин 0,1%-ным водным раствором Конго красного, затем отмывали 1 М раствором хлорида натрия. Зоны гидролиза карбоксиметилцеллюлозы проявлялись как жёлтые ореолы вокруг бактериальных колоний на ярко-красном фоне [10].

Определение протеолитической активности. Микроорганизмы высевали уколом на мясопептонный желатин, культивировали 7–10 суток при комнатной температуре. Протеолиз желатина отмечали визуально.

Определение амилолитической активности. Метод основан на использовании гидролитического расщепления крахмала под действием амилаз. Исследуемые микроорганизмы высевали штрихом по диаметру чашки. Продолжительность культивирования составила 2–10 суток. Гидролиз крахмала обнаруживали после обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Среда, содержащая крахмал, окрашивается в синий цвет, а зона гидролиза остаётся бесцветной или приобретает красную окраску [5].

Определение способности фиксировать атмосферный азот. Эта характеристика исследовалась методом посева культур на среду Эшби, не содержащую азота.

Образование биоплёнок. Образование биоплёнок изучали по способности к адгезии на поверхности 96-луночной полистироловой панели. Из лунок панели удаляли планктонные клетки и окрашивали плёнки. Для этого в лунку, не взбалтывая, вносили 150 мкл дистиллированной воды и 20 мкл 1%-ного кристаллвиолета, инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. После тщательного трёхкратного промывания дистиллированной водой в лунки для экстракции краски из плёнки добавляли 200 мкл 96%-ного этанола и измеряли оптическую плотность этого раствора при длине волны 540 нм. Интенсивность окрашивания содержимого лунок соответствовала степени плёнокообразования. Количественным выражением степени образования биоплёнки служили

значения оптической плотности, измеряемые на спектрофотометре [7].

Определение фитотоксичности бактерий. Тест проводили на растениях лука. Луковицы инокулировались через шприц 0,5 мл бактериальной суспензией в дистиллированной воде. В качестве контроля были взяты луковицы, инокулированные водой. Инокулированные луковицы помещали во влажную камеру при 26 °С. Симптомы патогенеза регистрировали через неделю после заражения по следующей шкале: 0 – ткань остаётся неповреждённой и необесцвеченной; 1 – незначительно обесцвеченные ткани на расстоянии 1 см вокруг точки инокуляции, ткани не повреждены; 2 – внутренние чешуйки обесцвечены или вялые; 3 – внутренние чешуйки вялые или обесцвеченные от верхушки к основанию; 4 – вялые и обесцвеченные ткани чешуйки половины или полной луковицы [8].

Эксперименты проводили в трёхкратных аналитических и биологических повторностях. Полученные данные статистически обработаны с использованием программы Excel (MS Office 2003), рассчитаны средние арифметические значения и их среднеквадратичные отклонения.

Результаты и обсуждение

Культуральные и биохимические свойства выделенных бактерий представлены в табл. 1. Было выявлено, что в эндосфере исследованных растений в основном преобладали грамотрицательные палочки, каталазаположительные, с окислительным типом метаболизма глюкозы.

Важным фактором взаимодействия эндوفитов с растением служит фиксация атмосферного азота [4]. Для изучения этого процесса бактерии высевались на среду Эшби, не содержащую азота. 9 из 17 исследованных культур образовали на этой среде колонии, что позволяет предположить наличие у них азотфиксирующей способности (см. табл. 1).

Особым фактором, способствующим выживанию и колонизации растений, служит образование биоплёнок. Биоплёнки – это высокоорганизованные бактериальные сообщества, в которых бактерии могут жить прикрепленными к поверхности, где они значительно более устойчивы к действию антибактериальных агентов иммунной защиты организма, а также неблагоприятных факторов, таких как изменения температуры, pH среды, осмолярности [2; 6].

Таблица 1

Морфологические характеристики и идентификационные свойства бактерий, выделенных из тканей растений, произрастающих на побережье оз. Байкал

Вид растения	Условный номер культуры / Месяц выделения	Морфология, тинкториальные свойства	Каталазная активность	ОФ-тест		Рост на среде Эшби
				без масла	с маслом	
Манжетка городковатая	15 / август	грам «+» палочки	+	+	-	+
	18 / август	грам «-» палочки	+	+	-	-
	41 / октябрь	грам «-» палочки	+	+	-	+
Вероника дубравная	20 / август	грам «-» палочки	+	+	+	-
	22 / август	грам «-» изогнутые палочки	+	+	+	-
	22-1 / август	грам «-» изогнутые палочки	+	+	+	-
	24 / август	грам «-» палочки	+	+	-	-
	37 / октябрь	грам «-» палочки	+	+	-	-
	38 / октябрь	грам «-» палочки	+	+	+	+
Одуванчик лекарственный	27 / август	грам «+» кокки	+	+	+	+
	35 / октябрь	грам «+» палочки	+	+	+	+
	36 / октябрь	грам «+» коккобациллы	Н	-	-	+
Тысячелистник азиатский	26 / август	грам «-» палочки	+	+	+	-
	T1 / август	грам «-» палочки	+	+	-	+
	T2-1 / август	грам «-» палочки	+	+	-	-
	T2-2 / август	грам «+» палочки	Н	Н	Н	+
Подорожник большой	П3 / август	грам «-» палочки	+	+	-	+

Примечание: Н – исследования не проводились.

В результате исследований установлено, что способность к формированию биоплёнки у исследованных изолятов оказалась различной. Размер биоплёнок был небольшим и из-за различий в оптической плотности колебался от 0,1 до 0,16 нм.

Культуры № 15 и 18, выделенные из тканей манжетки городковатой в августе, характеризовались более высокой степенью образования биоплёнки по сравнению с культурой № 41, выделенной в октябре (рис.). Наиболее высокую способность формировать биоплёнки показала культура № 36, выделенная в октябре из тканей одуванчика лекарственного. Культуры № 20, T1, T2-1, T2-2, и П3 не обладали способностью образовывать биоплёнки.

Прочие культуры отнесены к группе с умеренной способностью образования биоплёнки.

Следующим этапом исследования стало изучение способности полученных культур выделять в безуглеродную культуральную среду растворимые сахара, которые могут вносить свой вклад в адаптацию растений к гипотермии [3]. Нами была показана такая способность у ряда исследованных культур. Исследовались

изменения показателей секреции сахаров бактериальными клетками в окружающую среду в зависимости от внешних температурных условий. Для двух из четырёх изученных культур в эксперименте наблюдали изменения накопления сахаров в культуральной жидкости в зависимости от температурного режима культивирования. При этом микроорганизмы в культуре № T2-2 при близкой к нулю (+4 °С) температуре культивирования демонстрировали понижение темпов секреции низкомолекулярных углеводов в 2 раза, тогда как культура № П3, выделенная из подорожника большого, наоборот, показала трёхкратное увеличение содержания сахаров в среде культивирования (табл. 2).

Далее выявлялись возможные патогенные свойства выделенных культур по отношению к растительному организму. Результаты представлены в таблице 3. Наиболее высокую фитотоксичность на растениях лука проявила культура № 18, выделенная из манжетки городковатой. Средней фитотоксичностью обладали культуры № T2-1 и T2-2, выделенные из тысячелистника азиатского.

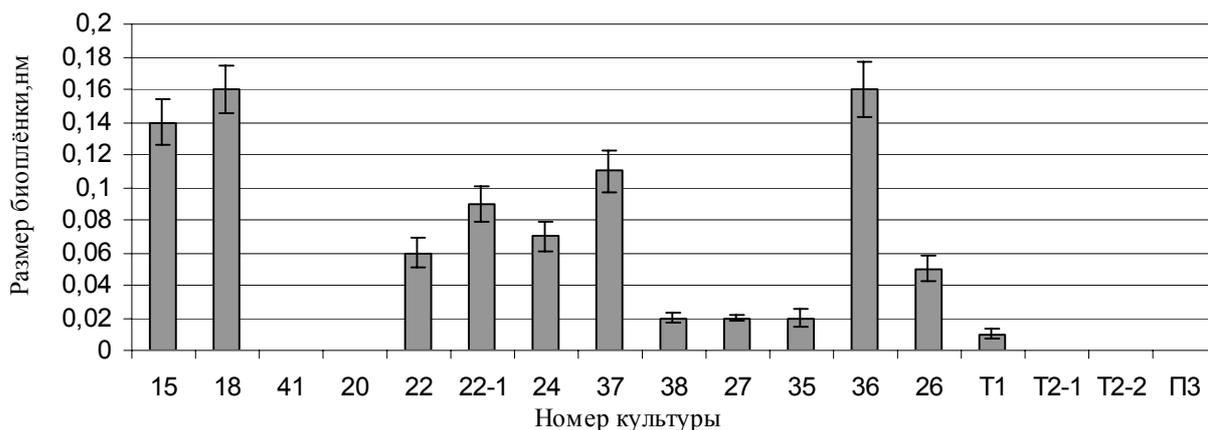


Рис. Характеристика способности культур микроорганизмов, выделенных из тканей исследованных растений, к образованию биоплёнок. Номера культур: 15, 18, 41 – манжетка городковатая; 20, 22, 22-1, 24, 37, 38 – вероника дубравная; 27, 35, 36 – одуванчик лекарственный; 26, T1, T2-1, T2-2 – тысячелистник азиатский; ПЗ – подорожник большой

Таблица 2

Содержание сахаров в культуральной жидкости выделенных из тканей исследованных растений микроорганизмов при разных температурных условиях культивирования, 10^{-3} мг/мл

Условный номер культуры	Температура культивирования	
	+26 °C	+4 °C
T1	3,04±0,13	3,44±0,45
T2-2	2,99±0,19	1,52±0,17
28-П	3,64±0,25	3,56±0,33
П-3	5,13±0,40	16,22±1,53

Таблица 3

Ферментативная активность и фитотоксичность культур микроорганизмов, выделенных из тканей исследованных растений

Вид растения	Условный номер культуры / Месяц выделения	Уровень фитотоксичности (в баллах)	Целлюлолитическая активность	Протеолитическая активность	Амилолитическая активность
Манжетка городковатая	15 / август	0	+	+	–
	18 / август	3	+	+	–
	41 / октябрь	0	+	+	–
Вероника дубравная	20 / август	0	+	+	–
	22 / август	0	+	+	–
	22-1 / август	1	+	+	–
	24 / август	0	+	+	–
	37 / октябрь	0	+	+	–
Одуванчик лекарственный	38 / октябрь	0	+	+	–
	27 / август	1	Н	+	–
	35 / октябрь	0	+	+	–
Тысячелистник азиатский	36 / октябрь	1	+	+	–
	26 / август	1	+	+	–
	T1 / август	0	–	+	–
Тысячелистник азиатский	T 2-1 / август	2	–	+	–
	T 2-2 / август	2	+	+	–
Подорожник большой	ПЗ / август	0	+	Н	Н

Примечание: Н – исследования не проводились.

Низкой фитотоксичностью обладали следующие культуры: № 22–1, выделенная из вероники дубравной; № 27 и 36, выделенные из одуванчика лекарственного; № 26, выделенная из тысячелистника азиатского. Прочие культуры не оказали фитотоксичного влияния на растения лука. Более того, выделенная из подорожника большого культура ПЗ стимулировала прорастание луковицы.

Паразитические свойства микроорганизмов обусловлены среди прочего наличием гидролитических ферментов. В первую очередь это целлюлазы и протеиназы, некоторую роль в процессе патогенеза играет амилаза.

Заключение

Наши исследования показали, что практически все изученные культуры обладали целлюлолитической и протеолитической активностью, амилитическая активность не установлена ни для одной из исследованных культур (см. табл. 3). Они способны синтезировать углеводы, обладают умеренной фитотоксичностью, а некоторые не только не угнетают растения, а усиливают их рост (культура № ПЗ). Половина исследуемых культур обладает способностью фиксировать атмосферный азот. Способность образовывать биоплёнки, способствующие выживанию бактерий и повышающие сопротивляемость бактериоценозов фитоиммунитету растений, отличалась не только у разных видов растений, но и изменялась в разные периоды сезона вегетации (у манжетки городковатой).

Таким образом, показано, что выделенные микроорганизмы могут вносить свой вклад в адаптацию растений к климатическим условиям Прибайкалья.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РФФИ – Сибирь № 08–04–98040.

Biological characteristics of bacteria isolated from plants growing in Lake Baikal coastal zone

A. L. Turskaya, Ju. A. Markova, M. A. Zhivetyev, T. N. Belovezhets, I. A. Graskova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Irkutsk

Abstract. Some cultures of microorganisms were isolated from endosphere of plants growing in Lake Baikal coastal zone: *Veronica chamaedrys* L., *Alchemilla subscrenata* Buser, *Achillea asiatica* Serg., *Taraxacum officinale* Wigg., *Plantago major* L. Morphology and biochemical properties of isolated bacteria were studied. It was shown their potential role in adaptation of plant-hosts under climatic conditions of Baikal region.

Key words: microorganisms, plants, endosphere, adaptation.

Литература

1. Ассоциативный симбиоз / О. В. Бухарин [и др.]. – Екатеринбург : УрО РАН, 2007. – 264 с.
2. Ермилова Е. В. Молекулярные аспекты адаптации прокариот / Е. В. Ермилова. – СПб. : Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2007. – 299 с.
3. Иванова Е. Г. Аэробные метанотрофы как симбионты растений / Е. Г. Иванова, Н. В. Дороница, Ю. А. Троценко // Тр. Ин-та микробиологии им. С. Н. Виноградского. – М. : Наука, 2006. – С. 263–284.
4. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) / Е. А. Цавкелова [и др.] // Приклад. биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 133–143.
5. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студ. вузов / под ред. А. И. Нетрусова. – М. : Академия, 2005. – 602 с.
6. Способность к формированию биоплёнок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium* / Ю. М. Романова [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № 4. – С. 38–42.
7. Формирование биоплёнок клиническими штаммами бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик / И. А. Шагинян [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2007. – № 1. – С. 3–9.
8. Comparative Rflp-Its Analysis Between Enterobacter Cloacae Strains Isolated From Plants And Clinical Origin / J. R. Neto [et al.] // Arq. Inst. Biol., Sao Paulo. – 2003. – Vol. 70, N 3. – P. 367–372.
9. Rosenblueth M. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts / M. Rosenblueth, E. Martinez-Romero // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2006. – Vol. 19, N 8. – P. 827–837.
10. Stable Coexistence of Five Bacterial Strains as a Cellulose-Degrading Community / S. Kato [et al.] // Applied and Environmental microbiology. – 2005. – Vol. 71, N 11. – P. 7099–7106.
11. Sturz A. V. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production / A. V. Sturz, B. R. Christie, J. Nowak // Crit. Rev. Plant Sci. – 2000. – Vol. 19. – P. 1–30.

Турская Анна Леонидовна
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук, научный сотрудник
тел. (3952) 42–50–09, факс (3952) 51–07–54,
E-mail: turskaya-anna@mail.ru

Маркова Юлия Александровна
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
тел. (3952) 42–50–09; факс: (3952) 51–07–54
E-mail: juliam06@mail.ru

Живетьев Максим Аркадьевич
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук, младший научный сотрудник
тел. (3952) 42–50–09
E-mail: nik.19@mail.ru

Беловежец Татьяна Николаевна
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
студент
тел. (3952) 42–50–09; факс: (3952) 51–07–54
E-mail: tan.bel@bk.ru

Граскова Ирина Алексеевна
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник
тел. (3952) 42–49–03
E-mail: graskova@sifibr.irk.ru

Turskaya Anna Leonidovna
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 66403
Ph. D. in Biology, research scientist
phone: (3952) 42–50–09, fax: (3952) 51–07–54
E-mail: turskaya-anna@mail.ru

Markova Julia Aleksandrovna
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
Ph. D. in Biology
senior research scientist
phone: (3952) 42–50–09, fax: (3952) 51–07–54
E-mail: juliam06@mail.ru

Zhivetyev Maxim Arkadyevich
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 66403
Ph. D. in Biology, junior research scientist
phone: (3952) 42–50–09
E-mail: nik.19@mail.ru

Belovezhets Tatyana Nikolaevna
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
student
phone: (3952) 42–50–09, fax: (3952) 51–07–54
E-mail: tan.bel@bk.ru

Graskova Irina Alekseevna
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
D.Sc. of Biology, leading research scientist
phone: (3952) 42–49–03
E-mail: graskova@sifibr.irk.ru