

УДК 579.64

НОВЫЙ ШТАММ *PSEUDOMONAS KOREENSIS* ИБ-4. ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРАКТИКЕ

Г.Ф. Рафикова

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия, biolab316@yandex.ru

В работе определены физиолого-биохимические свойства и совокупность полезных для растений свойств нового PGPR-штамма, идентифицированного, как *Pseudomonas koreensis* ИБ-4.

Ключевые слова: PGPR-штаммы, род *Pseudomonas*, ген 16S рРНК, МАЛДИ-масс-спектрометрия, жирные кислоты, антигрибная активность, нитрогеназная активность, ИУК, цитокинины.

Система интенсивного сельскохозяйственного производства подразумевает химизацию земледелия. Широкое применение пестицидов и удобрений для увеличения продуктивности земель зачастую пагубно сказывается на качестве продукции и состоянии экосистемы в целом (загрязнение продуктов растениеводства, формирование устойчивости у возбудителей заболеваний сельскохозяйственных культур, увеличение степени эвтрофикации водоемов и др.). В последние годы в нашей стране, так же как и за рубежом, растет интерес к экологически чистым и сравнительно безопасным в применении микробиологическим препаратам. Поэтому использование PGPR микроорганизмов (от Plant Growing-Promoting Rhizobacteria – ризосферные бактерии, способствующие росту растений) в растениеводстве представляет особый интерес. PGPR-штаммы могут обладать одним или несколькими полезными для роста и развития растений свойствами: способностью подавлять или снижать рост фитопатогенов благодаря возможности синтезировать вещества бактерицидного и фунгицидного действия, стимулировать рост и развитие растений за счет образования биологически активных веществ и способности к азотфиксации. Известен ряд биологических препаратов с антигрибными свойствами, но микроорганизмы, составляющие их основу, как правило, обладают лишь одним или несколькими полезными свойствами, характерными для PGPR-микроорганизмов. В связи с чем, поиск и изучение более эффективных штаммов с комплексом полезных свойств ускоряющих рост и развитие растений, до сих пор остается актуальной проблемой.

Целью работы являлось изучение физиолого-биохимических свойств, таксономического положения и наличия совокупности полезных для растений свойств нового PGPR-штамма.

Объектом исследования являлся штамм бактерий ИБ-4, выделенный из пахотных почв Мечетлинского района Республики Башкортостан, проявляющий антагонизм по отношению к патогенам, принадлежащим к родам *Fusarium*, *Bipolaris*, *Alternaria*.

По совокупности культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств штамм был предварительно идентифицирован как принадлежащий к р. *Pseudomonas* и получил условное (рабочее) название *Pseudomonas* sp. ИБ-4.

Для более точной идентификации бактерии было проведено секвенирование гена 16S рРНК. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (KP306893) с известными структурами из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) позволяет с высокой долей

вероятности утверждать, что изучаемый микроорганизм относится к виду *Pseudomonas koreensis* (99.71 % сходства с типовым штаммом вида *P. koreensis* Ps 9-14(T)).

Для определения сходства тотальных геномов была проведена ДНК-ДНК-гибридизация штаммов *Pseudomonas* sp. ИБ-4 и *P. koreensis* Ps 9-14(T) (Корейская Коллекция Сельскохозяйственных Культур). Уровень гомологии составил 71 %, что позволяет говорить о видовом сходстве этих штаммов. Содержание ГЦ-пар в ДНК штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 составило 61.5 мол.%, а у штамма *P. koreensis* Ps 9-14(T) – 60.7 мол.% [Kwon et. al. 2003]. Близкие значения полученных данных свидетельствуют о вероятной принадлежности сравниваемых штаммов к одному виду.

В результате проведения МАЛДИ-масс-спектрометрии клеточных белков штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 удалось установить его сходство с микроорганизмом *P. koreensis* Ps 9-14(T) и несколькими типовыми штаммами рода *Pseudomonas* (*P. umsongensis* LMG 21317(T), *P. jessenii* CIP 105274(T), *P. tolaasii* LMG 2342(T)).

Выполненный анализ жирных кислот штаммов *Pseudomonas* sp. ИБ-4 и *P. koreensis* Ps 9-14(T) свидетельствует о различиях в составе и содержании доминирующих жирных кислот в клеточных стенках. Основными жирными кислотами штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 являются: гексадекановая (C_{16:0}) – 32.4%, цикло-гептадекановая (cyclo-C_{17:0}) – 29.92%, цис-11-октадеценная (C_{18:1w7}) – 11.23 % и гексадеценная (C_{16:1}) – 8.27%.

Анализ хинонов показал, что доминирующим хиноном является убихинон Q9, что полностью согласуется с результатами исследований других представителей р. *Pseudomonas*.

Изучение влияния штамма *P. koreensis* ИБ-4 на фитопатогенные виды грибов показало, что микроорганизм обладает высокой антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным видам микромицетов: *Fusarium avenaceum*, *F. gibbosum*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. nivale*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *Alternaria alternata*, *Bipolaris sorokiniana*. В то время как исследованный нами штамм *P. koreensis* Ps 9-14(T) не проявляет каких-либо фунгицидных и фунгистатических свойств по отношению к фитопатогенным грибам.

Установлено, что исследуемый штамм обладает азотфиксирующей способностью. Уровень нитрогеназной активности штамма *P. koreensis* ИБ-4 составлял 0.65 мкгN₂/мл/ч и был сопоставим с данным показателем для таких азотфиксаторов, имеющих в коллекции ВКМ, как *Azotobacter vinelandii* В-1617 и *A. chroococcum* В-1616.

С помощью метода ИФА у штамма *P. koreensis* ИБ-4 выявлена способность к синтезу ИУК и цитокининоподобных веществ на уровне 40 и 119 нг/мл КЖ соответственно.

Проведенные фенологические наблюдения в условиях защищенного грунта показали, что КЖ штамма *P. koreensis* ИБ-4 и используемые в качестве эталона препараты «Планриз» и «Елена» ускоряли наступление основных фаз развития на 1–2 дня. Отмечено, что обработка вегетирующих растений приводила к значительному увеличению урожайности по сравнению с контролем. Так, при использовании биопрепаратов «Планриз» и «Елена» увеличение массы клубней составило примерно 12–26% и 17–38% соответственно, тогда как при обработке растений КЖ штамма *P. koreensis* ИБ-4 – 37–45%.

В полевых условиях обработка посевного материала и вегетирующих растений КЖ *P. koreensis* ИБ-4 также способствовала максимальному увеличению продуктивности картофеля (40–47%) по сравнению с другими препаратами. Выход количества клубней и стандартной фракции семян увеличился соответственно на 39–43% и 35–37%, что превосходит значения, полученные при обработке препаратами «Планриз» и «Елена».

В течение всего вегетационного периода на обработанных растениях картофеля как в условиях защищенного, так и открытого грунта не было обнаружено признаков грибных заболеваний. Тогда как в контрольном варианте в полевых условиях наблюдалось поражение картофеля фитотрофом, развитие болезни составляло 14.5%.

Штамм был запатентован в Российской Федерации в качестве микробного препарата против заболеваний, вызываемых фитопатогенными грибами и для увеличения урожайности (Пат. РФ 2529958).

Таким образом, несмотря на некоторые расхождения в результатах исследования фенотипических и хемотаксономических признаков с большой долей вероятности можно отнести штамм *Pseudomonas* sp. ИБ-4 к виду *Pseudomonas koreensis*. Штамм *P. koreensis* ИБ-4 обладает комплексом полезных для роста и развития растений свойств, не характерных для типового штамма *P. koreensis* Ps 9-14(T). В частности, он проявляет фунгицидную активность в отношении большого количества фитопатогенных грибов, в том числе и основных возбудителей корневых гнилей злаковых культур; высокую нитрогеназную активность и способность к синтезу ИУК и цитокининоподобных веществ.

Библиографический список (References)

Kwon S.W., Kim J.S., Park I.C., Yoon S.H., Park D.H., Lim C.K., Go S.J. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and

Pseudomonas jinjuensis sp. nov., novel species from farm soils in Korea // Int. J. Syst. Evol. Micr. 2003. V. 53. P. 21–27.

Plant Protection News, 2016, 3(89), p. 139–140

A NEW BACTERIAL STRAIN, *PSEUDOMONAS KOREENSIS* IB-4. PROSPECTS FOR ITS USE IN AGRICULTURAL PRACTICE

G.F. Rafikova

Institute of Biology Ufa Scientific Centre RAS, biolab316@yandex.ru

A bacterial strain IB-4, antagonistic to plant pathogenic fungi of the genera *Fusarium*, *Bipolaris*, and *Alternaria*, was isolated from arable soils of the Mechetlinskii district, Bashkortostan. Physiological, biochemical, and culture morphological properties of strain IB-4 supported its classification within the genus *Pseudomonas*. In spite of some discrepancies in the results of phenotypic and chemotaxonomic research, analysis of the 16S rRNA gene sequence, DNA–DNA hybridization, GC-content, and MALDI mass spectral data provide considerable evidence supporting its identification as a *Pseudomonas koreensis* strain. *P. koreensis* strain IB-4 was shown to possess the valuable features characteristic of PGPR microorganisms: antifungal and nitrogenase activities and ability to synthesize indole-3-acetic acid (IAA) and cytokinin-like compounds. Field test, in which potato plants were treated with the culture liquid of *P. koreensis* strain IB-4 revealed a positive effect on potato yield and resistance to plant pathogens.