

УДК 579.852.1+631.573

И.К. Курдиш¹, Л.В. Булавенко¹, Д.И. Дыренко¹, Д.А. Климчук²

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев МСП, Д03680, Украина

²Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
ул. Терещенковская, 2, Киев 1, 01601, Украина

КОЛОНИЗАЦИЯ РИЗОСФЕРЫ ОГУРЦОВ ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ РОДА *BACILLUS*

*Исследована способность фосфатмобилизирующих бактерий четырех видов рода *Bacillus* колонизировать корневую зону огурцов. Установлено, что все исследованные штаммы способны прижиться в корневой зоне этих растений, колонизируя в различной степени ее участки. Отмечается существенная неравномерность заселения поверхности корня бактериями. В некоторых его зонах образуются микроколонии этих микроорганизмов. Эти особенности, по-видимому, обусловлены как различиями в количестве и составе экссудатов определенных зон корня растений, так и особенностями трофических потребностей штаммов исследованных бактерий.*

*Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, корни растений, колонизация.*

© И.К. Курдиш, Л.В. Булавенко, Д.И. Дыренко, Д.А. Климчук, 2009

Интенсивное применение в растениеводстве химических удобрений и пестицидов сопровождается загрязнением окружающей среды, снижением видового разнообразия и устойчивости агроэкосистем, а также плодородия почв. Учитывая это, в последние десятилетия большое внимание уделяется биологизации земледелия, разработке и использованию микробных препаратов для стимулирования роста растений, их защиты от фитопатогенов, фитофагов и повышения урожайности [3, 5].

Весьма перспективными для создания микробных препаратов являются бактерии рода *Bacillus*. Нами выделено ряд штаммов этого рода, активно мобилизующих фосфат из труднорастворимых неорганических и органических соединений [9]. К тому же, эти бактерии обладают высокой антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным бактериям и грибам [11], а также заметно стимулируют рост растений и повышают их урожайность [4].

В процессе роста растения выделяют корневые экссудаты, которые обуславливают интенсивное развитие микроорганизмов в почве, непосредственно примыкающей к поверхности корня – ризосфере [1, 7, 13]. Поэтому, интродукция в агроэкосистему микробных препаратов в значительной степени будет определяться способностью применяемых бактерий колонизировать ризосферу растений [12]. Целью работы является сравнительное исследование способности фосфатмобилизующих бактерий рода *Bacillus* колонизировать ризосферу растений.

Материалы и методы. Объектами исследования служили штаммы фосфатмобилизующих бактерий рода *Bacillus*, ранее выделенные в нашем отделе из почв Украины: *Bacillus subtilis* (шт. 11, 13, 15), *B. megaterium* (шт. 1, 2, 9, 12, 16), *B. cereus var. mycoides* (шт. 6, 10, 14), *B. pumilus* (шт. 3, 4) [9] в том числе *B. subtilis* ИМВ В-7023, отобранный по признаку высокой ростовой, фосфатмобилизующей и антагонистической активности [8]. Кроме того, в опытах использовали стрептомицинрезистентный штамм *B. subtilis* ИМВ В-7023 str⁺, устойчивый к 1600 мг/л данного антибиотика [10].

Способность бактерий колонизировать поверхность корней растений исследовали на растениях огурцов (*Cucumis sativus L.*) сорта «Конкурент». Семена огурцов стерилизовали смесью 50 % перекиси водорода и 96 % этилового спирта (1:1) в течение 7 минут, после чего их трехкратно промывали стерильным физиологическим раствором и проращивали на картофельном агаре в темноте при температуре 28 °С в течение 2-х суток. Пророщенные семена асептически помещали по одному в пробирки диаметром 20 мм и высотой 200 мм, заполненные 10 мл 0,6 % голодного агара, и выращивали в стерильных условиях. Предварительно в агар вносили суспензии бацилл, равномерно распределяя их по толще агара. Микроорганизмы выращивали на пептонной среде следующего состава (в г/л): пептон – 10; NaCl – 3,0; MgSO₄·7H₂O; KCl – 0,3; KH₂PO₄ – 0,1; K₂HPO₄·3H₂O – 0,1; MnSO₄ – 0,001; FeSO₄·7H₂O – 0,001. Численность бацилл задавали в количестве 10⁸ кл/мл. Затем пробирки с проростками размещали на световой площадке (16 ч день / 8 ч ночь) при температуре 25 °С и освещении 12 тыс. люкс. Способность бактерий колонизировать прикорневую зону растений оценивали по образованию микроколоний бактерий возле поверхности корня после 3–10 суток инкубирования проростков.

После 14 суток инкубации отбирали по 6–8 растений каждого варианта, стерильно отделяли корневую систему, и исследовали наличие на ней бактерий. Для этого использовали методы оптической микроскопии (микроскоп МБИ – 15 «Ломо») и сканирующей электронной микроскопии (микроскоп JSM-6060 (Япония)). Для изучения в световом микроскопе использовали срезы нативных корней, корней фиксированных в 4 % параформальдегиде и дифференцированно окрашенных смесью красителей (виктории голубой (0,1 %) и акридинового оранжевого (1:10000)) в соотношении 1:40. Анализировали содержание бацилл на следующих участках корня: апикальной части (включающей корневую чехлик), базальной (прилегающей к семени) и средней (промежуточной между базальной и апикальной, включающей зону корневых волосков).

Для изучения корней в сканирующем электронном микроскопе использовали методику, описанную в работе Lübeck [13]. Просматривали не менее 70–80 % площади видимой стороны каждого участка корня в 3–5 повторностях. Исследования проводили в 5 независимых экспериментах.

Колонизацию исследуемыми бактериями поверхности корней огурцов также изучали в микровегетационных экспериментах, используя стерильный песок, увлажненный до 60 % от полной влагоемкости питательным раствором Кюпа следующего состава (в г/л): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,44; KNO_3 – 0,25; KCl – 0,12; FeCl_3 5% раствор – 1 капля; KH_2PO_4 – 0,25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,51. В раствор предварительно вносили 1 мл суспензии, содержащей 10^6 клеток стрептомицинрезистентного штамма *B. subtilis* ИМВ В-7023 str^r, выращенного на пептонной среде.

Стерильные пророщенные семена огурцов асептически помещали на 1–1,5 см вглубь песка. Растения выращивали в пластиковых сосудах, содержащих 300 г песка, на световой площадке с 16 часовым световым днем (12000 лк) при 60 % влажности в течение 14 суток.

Для определения численности бактерий в ризосфере, корни вынимали из стаканчиков, освобождали от песка, который учитывали как образец ризосферы (Рс). Затем корни помещали в 100 мл физиологического раствора и встряхивали на качалке при 180 об/мин в течение 15 мин.

Для определения численности стрептомицинрезистентных бактерий ризопланы, отмытые корни после определения их массы гомогенизировали в ступке с 10 мл физиологического раствора. Из гомогенатов готовили серию последовательных разведений, которые высевали на агаризованную пептонную среду в чашки Петри, содержащую 1500 мг/л стрептомицина. В качестве контроля исследовали почву без растений. Посевы инкубировали в термостате при температуре 28 °С в течение 2–7 суток. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий рассчитывали на 1 г массы свежих корней или песка (КОЕ/г).

Результаты и их обсуждение. Использование метода выращивания проростков растений в полужидком агаре, инокулированном бактериями, позволяет за относительно короткий период времени сравнить способность исследуемых бактерий размножаться в прикорневом пространстве растений и, таким образом, дать первичную оценку их колонизирующей способности.

Начиная с первых суток развития растения, внесенные бактерии образовывали в полужидком агаре видимые микроколонии (своеобразное облако вокруг корня). Это позволяло уже на 3–5 сутки визуально наблюдать образование зон микроколоний бактерий в полужидком агаре.

Представленные данные свидетельствуют о том, что все исследуемые бактерии рода *Bacillus* характеризовались способностью колонизировать прикорневое пространство огурцов, различаясь между собой по интенсивности этого процесса. Чаще всего разные штаммы одного и того же вида бацилл образовывали подобные микроколонии. Например, штаммы 3 и 4 *Bacillus pumilus* достаточно интенсивно колонизировали базальную часть корней растений. С увеличением времени инкубирования интенсивность колонизации прикорневой зоны этими бактериями возрастала. Наиболее заметно они колонизировали среднюю часть корня, а также зону расположения корневых волосков (рис. 1). Распределение бактерий *B. cereus* шт. 6 и 10 в прикорневом пространстве огурцов было подобным для *B. pumilus* шт. 3, 4.

Несколько отличалась колонизация прикорневого пространства огурцов бактериями *B. cereus* var. *mycoides* 14. Этот штамм колонизировал толщу агара по всей длине корня, начиная с его базальной части, и максимально в зоне растяжения, апикальной части и кончика корней (рис. 1).

Менее интенсивно размножались в толще агара штаммы *Bacillus subtilis* 13 и 15. Штамм 11 этого вида бактерий всегда формировал видимый чехол вокруг корней растений. Наиболее активно клетки развивались у основания корня, и постепенно к концу корня зона их распространения уменьшалась (рис. 2).

В то же время штаммы *B. megaterium* 1, 2 и 16 слабо колонизировали корневую зону растений. В отличие от них, *B. megaterium* 9 и 12 активно развивались в прикорневом пространстве по всей длине корня. Эти бактерии особенно обильно заселяли среднюю часть корня и зону корневых волосков.

Особый интерес представляет *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомицинустойчивый вариант, отличающиеся высокой активностью мобилизации фосфата из органических

и труднорастворимых неорганических соединений [9], а также широким спектром антагонистического действия по отношению к фитопатогенным микроорганизмам [11]. Исследуемые бактерии интенсивно колонизировали прикорневое пространство огурцов (рис. 3), более активно – родительский штамм этих бактерий.

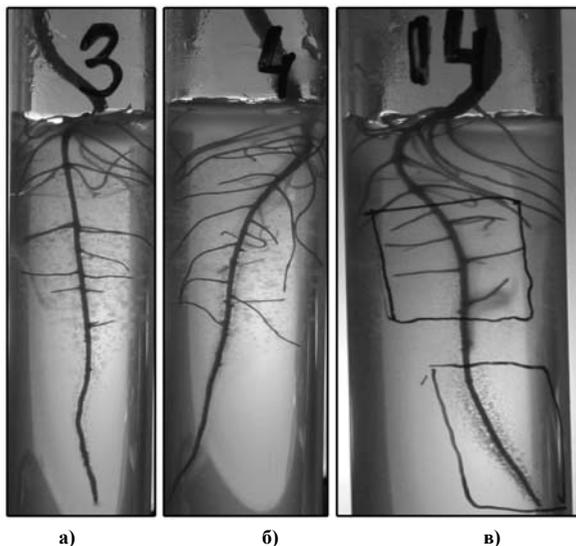


Рис. 1. Колонизация прикорневого пространства огурцов бактериями рода *Bacillus*: *Bacillus pumilus* штаммы 3 и 4 (а, б); *Bacillus cereus var. mycooides* 14 (в)

Поскольку в наших экспериментах был использован голодный агар, корневые выделения растений являлись для интродуцированных бактерий основным источником углерода и энергии. Согласно литературным данным, корень растения представляет собой весьма неоднородную сферу местообитания микроорганизмов. Его различные части отличаются как интенсивностью выделения, так и составом корневых выделений [7, 14]. При интродукции бактерий в корневую зону растений именно их корневые экзосметаболиты в значительной степени определяют интеграцию микроорганизмов с растением и дальнейшее совместное функционирование [1, 12].

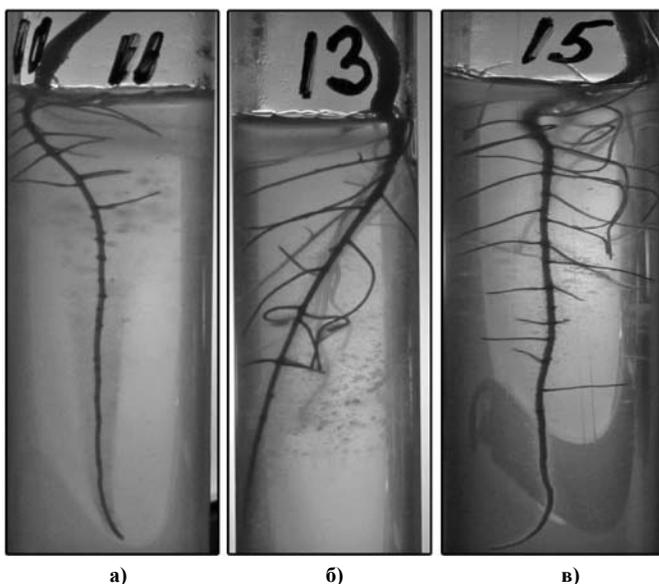


Рис. 2. Колонизация разными штаммами бактерий *Bacillus subtilis* корней огурца: штамм 11 (а); штамм 13 (б); штамм 15 (в)

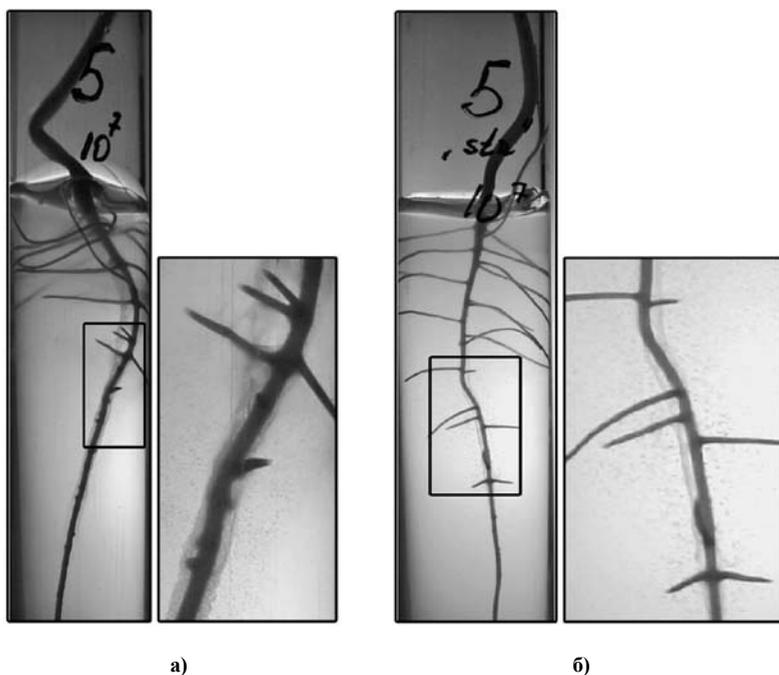


Рис. 3. Заселение прикорневого пространства огурцов сорта «Конкурент» штаммом бактерий *Bacillus subtilis* ИМВ – 7023 (а) и стрептомицинустойчивым штаммом *Bacillus subtilis* ИМВ – 7023 str^r (б)

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о наличии определенной избирательности в заселении бациллами прикорневого пространства огурцов, в основе которой лежат различия в количественных и качественных характеристиках экссудатов разных участков корня [1], а также, по-видимому, штаммовые отличия в трофических потребностях исследованных микроорганизмов, их способности потреблять те или другие компоненты корневого экссудата.

Следует отметить, что примененный нами пробирочный метод исследования способности бактерий развиваться в прикорневом пространстве растений позволяет выявить те штаммы, которые наиболее активно концентрируются в этой зоне, однако не дает ответа на вопрос о заселении ими ризосферы и ризопланы растений. Для получения подобной информации нами исследовано распределение ризобактерий в корневой зоне огурцов в микровегетационных экспериментах, а также с помощью методов микроскопии. Представленные данные (табл. 1) подтверждают результаты исследований, полученные методом выращивания растений в полужидком агаре, свидетельствующие о том, что исследуемые бактерии заселяют не только ризосферу, но и поверхность корня (ризоплану). Этот процесс наблюдается уже на первичных этапах развития растения, а наиболее интенсивное заселение поверхности корня наблюдается после нескольких суток выращивания растений.

Исследование поверхности корней с помощью сканирующей электронной микроскопии показало, что бактерии *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 обильно заселяют определенные зоны ризопланы огурцов (рис. 4, 5). Эти бактерии способны не только активно развиваться в прикорневом пространстве огурцов, но и колонизировать ризоплану этих растений, образуя микроколонии на поверхности корней.

Таким образом, показано, что все исследованные штаммы фосфатмобилизирующих бактерий рода *Bacillus* способны в различной степени колонизировать прикорневую зону огурцов сорта «Конкурент». Колонизация поверхности корня бактериями неравномерна.

Значительная часть его поверхности не содержит бактерий, тогда как в некоторых зонах корня образуются микроколонии. Такое распределение бактерий, по-видимому, обусловлено различиями в выделении экссудатов определенными зонами корня и особенностями трофических потребностей исследованных микроорганизмов.

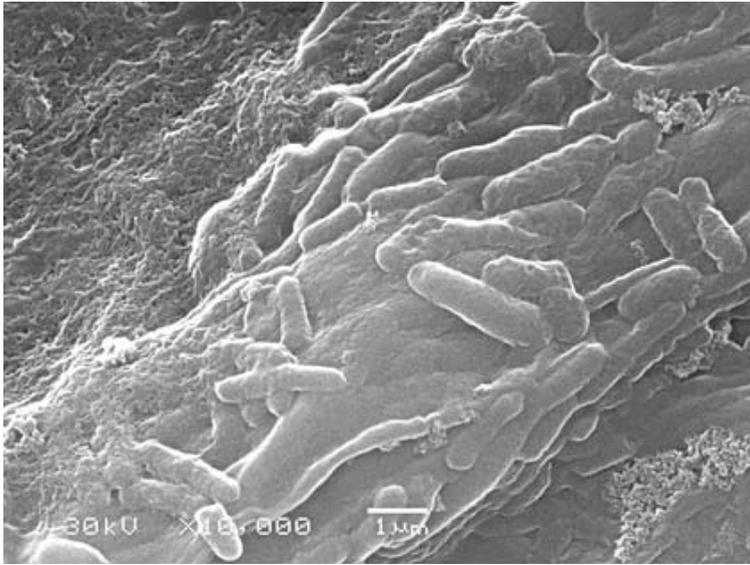


Рис. 4. Колонизация *Bacillus subtilis* ИМВ – 7023 зоны корневых волосков огурца сорта „Конкурент” (сканирующий электронный микроскоп JSM-6060 (Япония), напыление золотом, увеличение – $\times 10000$ раз)

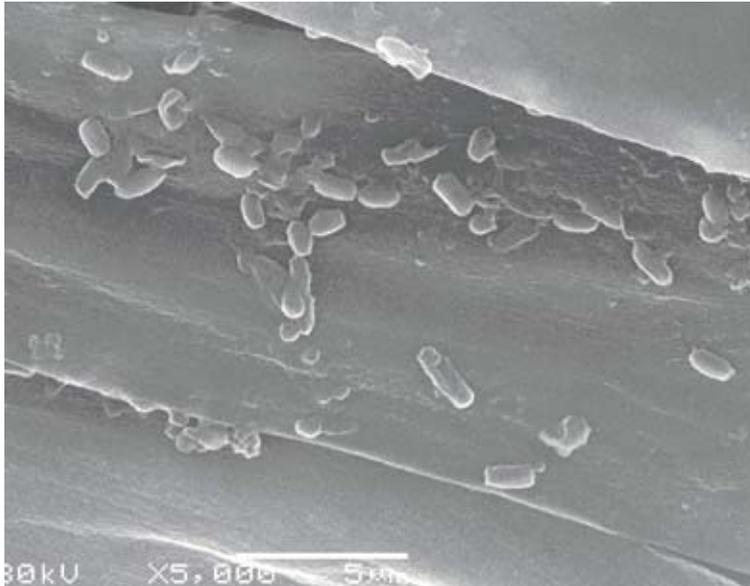


Рис. 5. Фрагмент поверхности корня огурца сорта «Конкурент» с колонизированными на нем бактериями *Bacillus subtilis* ИМВ – 7023 (сканирующий электронный микроскоп JSM-6060 (Япония), напыление золотом, увеличение – $\times 5000$ раз)

Колонізація корней огурцов сорта „Конкурент” *Bacillus subtilis* ИМВ – 7023 (str⁺)
в зависимости от времени развития растений

Время, сутки	КОЕ/ на 1 г корней (песка)	
	ризосфера	ризоплана
3	$\frac{(2,1 \pm 0,3) \cdot 10^8}{(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^6}$	$\frac{(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^5}{(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^6}$
6	$\frac{-}{(8,3 \pm 0,1) \cdot 10^6}$	$\frac{(2,3 \pm 0,3) \cdot 10^6}{(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^6}$
9	$\frac{(2,6 \pm 0,3) \cdot 10^8}{(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^7}$	$\frac{(2,5 \pm 0,3) \cdot 10^6}{(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^6}$
14	$\frac{(1,7 \pm 0,3) \cdot 10^8}{(8,4 \pm 0,2) \cdot 10^6}$	$\frac{(4,1 \pm 0,1) \cdot 10^6}{(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^6}$

Примечание: ” – “ – не определяли; в числителе приведены данные по численности КОЕ в пересчете на 1 г сырых корней, а в знаменателе – в пересчете на 1 грамм песка.

І.К. Курдиш¹, Л.В. Булавенко¹, Д.І. Диренко¹, Д.О. Климчук²

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

²Інститут ботаніки ім. Н.Г. Холодного НАН України, Київ

КОЛОНІЗАЦІЯ РИЗОСФЕРИ ОГІРКІВ ФОСФАТМОБІЛІЗІВНИМИ БАКТЕРІЯМИ РОДУ *BACILLUS*

Резюме

Досліджено здатність фосфатмобілізівних бактерій, віднесених до чотирьох видів роду *Bacillus*, колонізувати кореневу зону огірків. Встановлено, що всі досліджені штами здатні приживатися у кореневій зоні цих рослин, колонізуючи у різній степені її ділянки. Відмічається суттєва нерівномірність заселення поверхні коріння бактеріями. У деяких його зонах утворюються мікроколонії цих мікроорганізмів. Ця особливість, мабуть, обумовлена як різницею у кількості і складі ексудатів деяких зон коріння рослин, так і особливостями трофічних потреб штамів досліджених бактерій.

Ключові слова: бактерії роду *Bacillus*, *Bacillus subtilis* IMV B-7023, коріння рослин, колонізація.

І.К. Kurdish¹, L. V. Bulavenko¹, D. I. Direnko¹, D. O. Klimchuk²

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Kholodny Institute of Botany,

National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

COLONIZATION OF CUCUMBER RHIZOSPHERE BY PHOSPHATE-MOBILIZING BACTERIA OF *BACILLUS* GENUS

Summary

An ability of phosphate-mobilizing bacteria, related to four species of *Bacillus* genus, to colonize the cucumber root zone has been investigated. It has been found that all the studied strains can adapt to the root zone of those plants colonizing its parts to different extent. Essential nonuniformity of the root surface populating with bacteria is noted. Microcolonies of these organisms are formed in some root zones. This peculiarity is probably caused both by the difference in the number and composition of exudates of some zones of the plant roots, and by peculiarities of trophic requirements of the strains of studied bacteria.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у о р д s: bacteria of *Bacillus* genus, *Bacillus subtilis* IMV B-7023, plant roots, colonization.
T h e a u t h o r s a d d r e s s: *І.К. Kurdish*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Кравченко Л.В., Азарова Т.С., Леонова-Ермо Е.И. и др. Корневые выделения томатов и их влияние на рост и антифунгальную активность штаммов *Pseudomonas* // Микробиология. - 2003. - 72, № 1. - С. 48–53.
2. Кравченко Л.В., Макарова Н.М., Азарова Т.С. и др. Выделение и фенотипическая характеристика ростостимулирующих ризобактерий (PGPR), сочетающих высокую активность колонизации корней и ингибирования фитопатогенных грибов // Микробиология. - 2002. - 71, № 4. - С. 521–525.
3. Курдиш И.К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика. - К.: КВЦ, 2001. - 142 с.
4. Курдиш И.К., Рой А.А., Чуйко Н.В. и др. Взаимодействие бактерий компонентов препарата комплексного действия с некоторыми видами растений. Матер. Всерос. конф. с междунар. участием. Тез. докл. Саратов, 2007. - С. 11.
5. Микробні препарати у землеробстві. Теорія і практика. / За ред. В.В. Волгогона. - Київ: Аграрна наука, 2006. - 311 с.
6. Надькта В.Д., Исмаилов В.Я. Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Мат. докл. междунаучно-практ. конф. Краснодар, 2004. - Вып. 2. - С. 46–57.
7. Оразова М.Х., Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г. Гетерогенность корня как местообитания микроорганизмов // Микробиология. - 1994. - 63, № 4. - С. 706–714.
8. Патент України № 54923. Штамм *Vacillus subtilis* для одержання бактеріального препарату для рослинництва. / Курдиш І.К., Рой А.О. - Опублік. 17.03.2003, Бюл. № 3.
9. Рой А.А., Булаченко Л.В., Курдиш И.К. Новые штаммы почвенных бацилл, минерализующие органические соединения фосфора // Микробиол. журнал. - 2001. - 63, № 4. - С. 9–15.
10. Рой А.А., Гордиенко А.С., Курдиш И.К. Некоторые свойства родительского и резистентного к стрептомицину штамма *Vacillus subtilis* ИМВ В-7023 – компонента бактериальных препаратов для растениеводства. // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии. (1–2 июня 2006 г., Минск). - Минск: Раков, 2006.
11. Рой А.А., Залоило О.В., Чернова Л.С., Курдиш И.К. Антагонистическая активность фосфатмобилизирующих бацилл к фитопатогенным грибам и бактериям // Агроэкологический журн. - 2005. - № 1. - С. 50–55.
12. Bloemberg G. V., Lugtenberg B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria// Curr.Opin.Plant Biol. - 2001. - N 4. - P. 343–350.
13. Lübeck P.S., Hansen M., Sorensen J. Simultaneous detection of the establishment of seed-inoculated *Pseudomonas fluorescens* strain DR54 and native soil bacteria on sugar beet root surfaces using fluorescence antibody and in situ hybridization techniques // FEMS Microbiol. Ecol. - 2000. - 33. - P.11–19.
14. Lynch Y.M. The Rhizosphere. New York: Wiley, 1990. - 233 p.

Отримано 17.01.2008