

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2014 * № 3

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2014

УДК 579.222:547.36

А.И. Сагитова, Н.В. Жарикова, Е.Ю. Журенко, В.В. Коробов, Т.Р. Ясаков,
Т.В. Маркушева

ОСОБЕННОСТИ МЕЖБАКТЕРИАЛЬНЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ХЛОРАРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ РОДОВ *RHODOCOCCUS*, *SERRATIA*, *BACILLUS* И *PSEUDOMONAS*

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

Цель. Выявить характер взаимоотношений природных штаммов-деструкторов хлорфеноксиуксусных кислот родов *Rhodococcus*, *Serratia*, *Bacillus* и *Pseudomonas*, а также определить возможность их совместного применения.

Материалы и методы. В качестве объектов служили природные изоляты деструкторов хлорфеноксиуксусных кислот. Чистые культуры получали методом Коха. Идентификация микроорганизмов проведена согласно культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим характеристикам, а также принципам генетического типирования по последовательности гена 16S рРНК. Взаимоотношения штаммов изучали методом агаровых блоков.

Результаты. Установлено, что *Bacillus subtilis* 21SW, *Pseudomonas aeruginosa* 36 DCP, *Rhodococcus* sp. 17S и *Serratia marcescens* 22 S не оказывают антагонистического взаимовлияния, за исключением штамма *Serratia marcescens* 22 S, способного подавлять рост *B. subtilis* 21SW, что необходимо учитывать при их практическом использовании.

Заключение. Выявлены возможности совместного применения деструкторов *B. subtilis* 21SW, *P. aeruginosa* 36 DCP, *Rhodococcus* sp. 17S и *S. marcescens* 22 S для биоремедиации среды от галогенированных ароматических производных.

Ключевые слова: антагонизм, бактерии-деструкторы, хлорароматические кислоты.

A.I. Sagitova, N.V. Zharikova, E.Yu. Zhurenko, V.V. Korobov, T.R. Yasakov,
T.V. Markusheva

ANTAGONISTIC INTERACTIONS OF CHLOROPHENOXYACETIC ACIDS-DEGRADING BACTERIA OF *RHODOCOCCUS*, *SERRATIA*, *BACILLUS* AND *PSEUDOMONAS* GENUS

Institute of biology USC RAS, Ufa, Russia

Objective. Investigation of relationship between natural chlorophenoxyacetic acid bacteria-degrading strains of *Rhodococcus*, *Serratia*, *Bacillus* and *Pseudomonas* genera and the possibility of their joint application.

Materials and methods. Pure cultures have been obtained by Koch's method. Identification of microorganisms was carried out according to the cultural-morphological, physiological and biochemical characteristics, as well as the principles of genetic typing by 16S rRNA gene sequence. Relationship between strains was investigated by the method of agar blocks.

Results. It has been established that *Bacillus subtilis* 21SW, *Pseudomonas aeruginosa* 36 DCP, *Rhodococcus* sp. 17S and *Serratia marcescens* 22 S do not demonstrate antagonistic mutual influence, except the strain *Serratia marcescens* 22 S, capable of suppressing growth of *Bacillus subtilis* 21SW. The strain properties must be considered in their practical application.

Conclusions Possible joint *B. subtilis* 21SW, *P. aeruginosa* 36 DCP, *Rhodococcus* sp.

17S and *S. marcescens* 22 S use for the environment bioremediation from halogenated aromatic derivatives has been carried out.

Key words: antagonism, bacteria-destructors, chlorophenoxyacetic acids.

Введение

Большинство микроорганизмов в естественных условиях находится в определенных, сложившихся в процессе эволюции, взаимоотношениях друг с другом, а также с организмом своих хозяев – растений, животных, человека. Ассоциативные взаимоотношения или сожительство разных видов микроорганизмов между собой, а также с другими формами жизни известны под названием симбиоза. Формы симбиотических отношений чрезвычайно разнообразны, крайними из них являются мутуализм и антагонизм.

Явление антагонизма – угнетение роста, развития, размножения или иных проявлений жизнедеятельности одних микроорганизмов другими, широко распространено в природных почвенных сообществах.

Впервые бактерии-антагонисты были выявлены среди пигментированных форм, таких как *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pyocyanea* и *Serratia marcescens*, впоследствии были обнаружены антагонистические свойства у таких специфических групп, как молочнокислые бактерии, уробактерии и некоторые другие виды. Среди бактерий большое число антагонистов приходится на споровые грамположительные виды: *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus brevis* и другие. Антагонисты встречаются также и среди группы неспоровых грамотрицательных бактерий, хотя она в этом отношении менее изучена. Наибольшее число антагонистов с широким спектром действия обнаружено у актиномицетов.

В основе микробного антагонизма лежат разные причины: исчерпание питательных веществ, физико-химическое изменение среды – подкисление или подщелачивание, потребление кислорода, выделение в среду протеолитических ферментов, токсических веществ, бактериоцинов и антибиотиков [1].

Исключение антагонистических взаимоотношений между микробными культурами является обязательным условием создания биопрепаратов.

Цель настоящей работы – выявить характер взаимоотношений природных штаммов-деструкторов хлорфеноксиуксусных кислот среди представителей родов *Rhodococcus*, *Serratia*, *Bacillus* и *Pseudomonas*, а также определить возможность их совместного применения.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были использованы штаммы природных бактерий-деструкторов хлорфеноксиуксусных кислот, выделенные из проб почвы, в течение длительного времени подвергавшихся воздействию гербицидов.

Чистые культуры бактерий получали методом Коха с небольшими модификациями. Идентификация бактерий проведена с учетом культурально-морфологических и физиолого-биохимических характеристик, а также принципов генетического типирования по последовательности гена 16S рРНК [2].

Взаимоотношения изолятов изучали методом агаровых блоков в 3-х кратной повторности. Эксперименты проводили в два этапа: культуру-продуцент высевали на поверхность МПА, из которой после формирования газона вырезали агаровые блоки, которые аккуратно размещали на поверхности среды другой чашки Петри, предварительно засеянной тест-культурой. Чашки с блоками выдерживали в термостате при 28-30^oC в течение 1-8 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов. В случае чувствительности тест-культуры к продуценту вокруг агаровых блоков образовывались зоны подавления роста [3].

Результаты и обсуждение

Авторами данной работы ранее выделены почвенные изоляты бактерий, способные использовать в качестве источника углерода и энергии хлорфеноксиуксусные кислоты [4-6]. На основании физиолого-биохимических характеристик и результатов определения последовательностей генов 16S рРНК бактериальные штаммы были дифференцированы как представители линии грамположительных бактерий рода *Bacillus*, актиномицетов рода *Rhodococcus* а также нескольких родов гамма-подкласса протеобактерий, а именно: *Pseudomonas* и *Serratia* [7-9].

В ходе изучения взаимодействий штаммов деструкторов хлорфеноксиуксусных кислот *Bacillus subtilis* 21SW, *Rhodococcus* sp. 17S и *Pseudomonas aeruginosa* 36 DCP с использованием метода агаровых блоков было обнаружено, что эти культуры не оказывают антагонистического влияния на рост друг друга (табл.1).

Таблица 1. Оценка антагонистической активности бактерий

Штамм-продуцент	Диаметр зоны подавления роста тест-организма, мм			
	<i>Bacillus subtilis</i> 21SW	<i>Rhodococcus</i> sp. 17S	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 36 DCP	<i>Serratia marcescens</i> 22 S
<i>Bacillus subtilis</i> 21SW		0	0	0
<i>Rhodococcus</i> sp. 17S	0		0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 36 DCP	0	0		0
<i>Serratia marcescens</i> 22 S	9±0,1	0	0	

В то же время из таблицы 1 видно, что при тестировании был отмечен один случай негативного воздействия на тест-культуру с образованием зоны подавления роста в диапазоне 9±0,1, а именно: продуцент *Serratia marcescens* 22 S подавлял рост *Bacillus subtilis* 21SW.

Заключение

В связи с тем, что проведенные эксперименты выявили антагонистическое воздействие между *S. marcescens* 22 S и *B. subtilis* 21SW можно сделать вывод о том, что при создании эффективного консорциума для утилизации хлорфеноксиуксусных кислот следует избегать совместного применения этих двух штаммов микроорганизмов.

(Работа выполнена при содействии Программы Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития»)

ЛИТЕРАТУРА

1. Павлюшин В.А. Научные основы использования энтомопатогенов и микробов антагонистов в фитосанитарной оптимизации тепличных агробиоценозов. Дисс. в виде науч. докл. ... д-ра биол. наук. СПб, 1998. 66с.
2. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. 9-е изд. В 2-х т. М: Мир. 1997. 799с.
3. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608с.
4. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Кусова И.В. Бактерии-деструкторы фенола и его хлорированных производных. Уфа: Гилем, 2002. 108с.
5. Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В. и др. Биоразнообразие бактерий-деструкторов хлорированных феноксикилот. Вестник оренбургского государственного университета. 2009.6: 121-123.
6. Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Журенко Е.Ю. и др. Особенности скрининга бактериальных деструкторов ксенобиотиков. Аграрная Россия. 2009. 6: 135.
7. Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В. и др. Выделение и анализ биодegradационного потенциала нового природного штамма-деструктора хлорфеноксикилот рода

Rhodococcus. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. 5(2): 169-171.

8. Коробов В.В., Маркушева Т.В., Кусова И.В. и др. Штамм бактерий *Serratia marcescens* В-6493 – деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола. Биотехнология. 2006. 2: 63-65.
9. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В. и др. Штаммы-деструкторы хлорфеноксикислот гамма – подкласса протеобактерий. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011.13. 5(2): 194-195.

Получена 25.07.2014

(Контактная информация: Сагитова Алина Иршатовна – аспирант ИБ УНЦ РАН; адрес: 450054, Уфа, пр. Октября, 69; тел. +79872479164; E-mail - tvmark@anrb.ru)