

АДГЕЗИЯ НА КОРНЯХ ОГУРЦОВ БАКТЕРИЙ – КОМПОНЕНТОВ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА

Гордиенко А.С., Дыренко Д.И., Бега З.Т., Курдиш И.К.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного
НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, г. Киев, 03143, Украина

*Установлено, что на адгезию бактерий *Azotobacter vinelandii* и *Bacillus subtilis* на корнях огурцов могут оказывать влияние различные факторы. Основным условием увеличения эффективности прикрепления клеток бацилл является снижение отрицательного заряда их поверхности. Адгезия клеток азотобактера зависит не только от электроповерхностных свойств бактерий, но и от способности клеток к активному движению.*

Ключевые слова: адгезия бактерий, корни растений, заряд поверхности, подвижность клеток

В институте микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины выделен штамм бактерий *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, способный иммобилизовывать фосфаты из органических и труднорастворимых неорганических соединений [1], а также *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 [2], характеризующийся значительным азотфиксирующим потенциалом [3]. Данные микроорганизмы синтезируют ряд соединений [4,5], которые стимулируют рост растений. Кроме того, штамм *B. subtilis* обладает высокой антагонистической активностью к фитопатогенным бактериям и микромицетам – возбудителям болезней растений [6]. Таким образом, выделенные штаммы являются перспективными для создания бактериальных препаратов комплексного действия, способствующих повышению ростовой активности и урожайности ряда видов культурных растений [7].

Одним из факторов, определяющих возможность влияния микроорганизмов на развитие растений, является их способность колонизировать ризосферу и ризоплану растений. Первоначальным этапом колонизации любой поверхности, в том числе и ризопланы, является адгезия бактерий на поверхности корней [8,9]. Физико-химические факторы, в первую очередь, заряд поверхности

микроорганизмов, являются основными, определяющими эффективность неспецифической адгезии бактерий [10]. Установлено [11,12], что внесение в дисперсионную среду ионов двух- и трехвалентных металлов способствует снижению отрицательного заряда клеток. Это приводит к существенному увеличению адгезии бактерий на твердых материалах. В кислых почвах концентрация ионов Al^{3+} может составлять 7-11 мг/100 г [13]. Широко распространены в почвах также ионы Ca^{2+} , к тому же их концентрация может повышаться при внесении кальцийсодержащих удобрений, например, кальциевой селитры.

Для некоторых бактерий наблюдается прямая зависимость возрастания адгезии с увеличением скорости движения клеток [14]. Показано, например, что клетки подвижного штамма *Pseudomonas putida* в значительно большей степени прикреплялись к корням пшеницы, чем неподвижного штамма [15]. В то же время известно [3], что представители рода *Azotobacter* могут иметь как подвижный, так и неподвижный тип клеток.

Целью представленных исследований было изучение зависимости адгезии бактерий на корнях огурцов от некоторых физико-химических факторов, а также от физиологического состояния культуры азотобактера.

Материалы и методы. Бактерии *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 [2] культивировали в течение различного времени (1-4 суток) на среде Эшби с сахарозой (20 г/л) при 28 °С. Культуру *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 [1] выращивали в течение 18-20 ч (экспоненциальная фаза роста) при 28 °С на среде следующего состава, г/л: пептон – 10,0; NaCl – 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,3; KCl – 0,3; KH_2PO_4 и $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ по 0,1; $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ и $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ по 0,001. Клетки отмывали центрифугированием трижды в растворе NaCl или фосфатном буфере и готовили суспензии бактерий в соответствии с целью данного опыта. pH во всех образцах был постоянным (7,0).

Адгезивные свойства бактерий исследовали, используя корни проростков огурцов сорта Конкурент. Для получения проростков семена стерилизовали смесью этилового спирта и 50 % перекиси водорода в соотношении 1:1 в течение 5 минут, трижды промывали водопроводной водой и раскладывали на МПА или картофельный агар в чашки Петри. Семена проращивали в течение 5 суток при 25 °С. Полученные корни разрезали на сегменты

длиной 1 см, и по 100 мг корней вносили в пробирки диаметром 20 мм, длиной 10 см, содержащие по 3 мл суспензии бактерий. Количество жизнеспособных бактерий составляло $(1-2) \cdot 10^8$ кл. в 1 мл. Пробирки, содержащие корни огурцов в суспензии клеток, помещали на качалку (тип WN-4, 130 об./мин., амплитуда 2 см) при комнатной температуре (19-21 °С). После инкубации с бактериями в течение 1 ч корни трижды отмывали стерильным физиологическим раствором в течение 5 сек. на микрошейкере типа ML – 1 при максимальном числе оборотов, гомогенизировали в ступке и доводили объем физиологическим раствором до 10 мл. Количество адгезированных жизнеспособных клеток определяли по численности выросших колоний (КОЕ) в чашках Петри после посева 0,1 мл суспензии из десятикратных разведений.

Электрофоретические исследования проводили на установке для микроэлектрофореза [16]. Измеряли скорость электрофореза 50 клеток и рассчитывали их ζ -потенциал.

Подвижность бактерий оценивали микроскопически в препарате “висячая капля”.

Результаты и их обсуждение. Установлено (табл. 1), что внесение в суспензию Al^{3+} и Fe^{3+} позволяет снизить отрицательный заряд бактерий, а при определенных концентрациях катионов имеет место перезарядка поверхности клеток. Следует отметить, что концентрации ионов металлов, обеспечивающие данный эффект, превышают в несколько раз значения, которые характерны для других бактерий [11,12,17]. Другой отличительной особенностью бактерий *B. subtilis* и *A. vinelandii* является наличие флокуляции клеток даже при низком содержании в среде данных катионов. Так, для бацилл этот процесс наблюдается при концентрации Al^{3+} и Fe^{3+} , составляющей соответственно 0,5 и 1,0 мг/л, когда клетки имеют отрицательный заряд поверхности (-11,2 мВ и -22,4 мВ). Клетки *A. vinelandii* флокулируют при значениях отрицательного ζ -потенциала, которые существенно не отличаются от показателей контрольных вариантов: -39,0 (концентрация Al^{3+} – 1 мг/л) и -34,7 (концентрация Fe^{3+} – 5 мг/л). Таким образом, применительно к исследуемым штаммам бактерий, использование катионов трехвалентных металлов не позволяет создать условия, при которых можно было бы в широком диапазоне концентраций оценить их влияние на адгезию бактерий – то есть, существенно снизить отрицательный заряд микроорганизмов (фактор

препятствующий первичному этапу прикрепления клеток к любого вида поверхностям) и при этом получить в суспензии отдельные клетки. Наличие флокуляции бактерий не дает возможности сравнить эффективность адгезии клеток в контрольных и опытных вариантах.

Таблица 1. ζ -потенциал клеток бактерий в зависимости от содержания в среде ионов Al^{3+} и Fe^{3+}

Концентрация Al^{3+} и Fe^{3+} в растворе, мг/л	ζ -потенциал клеток бактерий, мВ			
	<i>B. subtilis</i>		<i>A. vinelandii</i>	
	Al^{3+}	Fe^{3+}	Al^{3+}	Fe^{3+}
0	-29,0	-28,0	-40,0	-41,0
0,1	-29,2	-28,1	-40,0	-39,8
0,5	-11,2	-26,5	–	–
1,0	+10,5	-22,4	-39,0	-39,7
2,5	–	–	-21,7	-37,5
5,0	–	+19,3	+19,2	-34,7
10,0	–	–	–	0

Примечание: дисперсионная среда – 0,05 М NaCl, pH 6,0; возраст культуры *A. vinelandii* – 48 ч.

Более перспективным в этом плане оказалось использование кальциевой селитры (табл. 2). При определенных концентрациях $Ca(NO_3)_2$ можно достичь существенного снижения отрицательного заряда бактерий при отсутствии флокуляции клеток. При этом адгезия бактерий *B. subtilis* происходит в соответствии с общепринятыми представлениями об этом процессе, согласно которым снижение энергии электростатического отталкивания способствует увеличению численности прикрепившихся на носителе клеток. Действительно, при содержании в растворе 0,5 г/л $Ca(NO_3)_2$ наблюдается уменьшение отрицательного заряда бактерий (табл. 2) и существенное возрастание их адгезии на корнях огурцов (табл. 3). Регистрируемое в эксперименте снижение количества прикрепившихся клеток при увеличении содержания кальциевой селитры в растворе до 5 г/л (табл. 3) отражает, очевидно, недостатки метода учета количества клеток, адсорбированных на корнях: в этих условиях происходит дальнейшее снижение отрицательного заряда клеток (не исключено и растительной поверхности), что обуславливает возрастание энергии притяжения

между взаимодействующими поверхностями и, как следствие, наличие двух эффектов – увеличения прочности контакта клеток с поверхностью интактных корней и дополнительной адгезии бактерий на частицах гомогената корней.

Таблица 2. ζ -потенциал клеток бактерий в зависимости от содержания в среде $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

Концентрация $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, г/л	ζ -потенциал клеток бактерий, мВ	
	<i>B. subtilis</i>	<i>A. vinelandii</i>
0	-42,1	-48,8
0,05	-40,5	-43,6
0,5	-25,4	-29,9
5,0	-13,4	-16,0

Примечание: дисперсионная среда – 0,01 М NaCl, pH 7,0; возраст культуры *A. vinelandii* – 48 ч.

Таблица 3. Зависимость адгезии бактерий на корнях огурцов от содержания в среде $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

Концентрация $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, г/л	Адгезия бактерий, %	
	<i>B. subtilis</i>	<i>A. vinelandii</i>
0 (контроль)	100,0	100,0
0,05	100,7 ± 5,4	77,6 ± 7,2
0,5	227,3 ± 23,8	63,7 ± 17,7
5,0	115,8 ± 1,0	59,1 ± 13,1

Примечание: возраст культуры *Azotobacter vinelandii* – 24 часа; дисперсионная среда – 0,02 М NaCl, pH 7,0; адгезию бактерий в отсутствие $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ принимаем за 100 %

Адгезия *A. vinelandii* не может быть описана в рамках физико-химических закономерностей этого процесса. А именно: уже при низкой концентрации кальциевой селитры (0,05 г/л) в суспензии бактерий имеет место незначительное снижение количества прикрепившихся на корнях клеток (табл. 3), несмотря на то, что заряд их поверхности не изменяется (табл. 2). Увеличение концентрации $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ до 0,5 и 5,0 г/л обуславливает снижение отрицательного ζ -потенциала бактерий, однако их адгезия не возрастает, а, наоборот, продолжает уменьшаться. Таким образом, по-видимому, эффективность прикрепления клеток *A. vinelandii*

к корням определяется не физико-химическими параметрами, а биологическими, в частности, наличием у клеток способности к активному движению.

В проведенном эксперименте использовали суточную культуру бактерий *A. vinelandii*. Используя метод “висячей капли”, установили, что популяция клеток в этой фазе роста представлена подвижными формами и подвижность бактерий сохраняется при всех концентрациях $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Однако, данный метод носит качественный характер и не позволяет определить количество подвижных клеток в популяции и, тем более, скорость их движения. В то же время известно [14], что для некоторых бактерий с увеличением скорости их движения возрастает количество прикрепившихся на твердой поверхности клеток и что на скорость движения бактерий влияет содержание солей в растворе (в частности, с увеличением концентрации ионов Na^+ она снижается) [14]. Поэтому можно предположить, что ионы Ca^{2+} также могут ингибировать подвижность бактерий *A. vinelandii*, уменьшая скорость движения клеток. Вероятно, это и является причиной снижения адгезии бактерий на корнях при внесении в их суспензию кальциевой селитры.

Роль подвижности клеток в адгезии была продемонстрирована в эксперименте при исследовании прикрепления бактерий *A. vinelandii* к корням огурцов. Установлено, что популяция клеток *A. vinelandii* логарифмической фазы роста культуры (24 ч) и фазы замедления роста (48 ч) представлена подвижными формами клеток, т.е. в поле зрения микроскопа не наблюдается неподвижных клеток. В то же время, в фазе стационарного роста культуры (72 и 96 ч) подвижностью характеризуются только отдельные клетки.

Установлено, что ζ -потенциал клеток *A. vinelandii* логарифмической фазы роста культуры составляет -29,4 мВ (табл. 4). С возрастом культуры отрицательный ζ -потенциал бактерий увеличивается, но существенно не отличается у клеток на поздних фазах роста (48-96 ч). Поэтому незначительное снижение адгезии бактерий в фазе замедления роста культуры (48 ч) по сравнению с более молодыми клетками может быть объяснено с физико-химических позиций, т.е. увеличением отрицательного заряда клеток и, следовательно, возрастанием электростатического отталкивания между поверхностью бактерий и поверхностью корня. В то же время, существенное снижение (в несколько раз) количества

прикрепившихся клеток культуры в фазе стационарного роста (72 ч и 96 ч) по сравнению с бактериями фазы замедления роста культуры (48 ч) может быть вызвано только утратой подвижности клеток более позднего возраста, поскольку по электроповерхностным свойствам они не отличаются (табл. 4).

Таблица 4. Электроповерхностные свойства и адгезия на корнях огурцов бактерий *A. vinelandii* в зависимости от возраста культуры

Время культивирования бактерий, часы	ζ-потенциал бактерий, мВ	Количество бактерий, адгезированных на корешках, кл/г · 10 ⁷
24	-29,4	3,84±0,18
48	-43,6	2,51±0,50
72	-44,2	0,70±0,30
96	-44,8	0,32±0,06

Примечание: дисперсионная среда – фосфатный буфер (рН 7,0; ионная сила – 0,05)

Таким образом установлено, что на адгезию бактерий *A. vinelandii* и *B. subtilis* на корнях огурцов могут оказывать влияние различные факторы. Основным условием увеличения эффективности прикрепления клеток бацилл является снижение отрицательного заряда их поверхности. Адгезия клеток азотобактера зависит не только от электроповерхностных свойств бактерий, но и от способности клеток к активному движению.

1. Пат. № 54923 А Україна. Штам бактерій *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального добрива / Курдиш І.К., Рой А.О. – Опубл. 17.03.2003, Бюл. № 3.

2. Пат. № 72856 А Україна. Штам бактерій *Azotobacter vinelandii* для одержання бактеріального добрива для рослинництва / Курдиш І.К., Бега З.Т. – Опубл. 17.03.2005, Бюл. № 4.

3. Рубенчик Л.И. Азотобактер и его применение в сельском хозяйстве. – К.: Изд-во АН УССР, 1960. – 327 с.

4. Чернова Л.С., Рой А.А., Курдиш И.К. Синтез внеклеточных аминокислот фосфатмобилизирующим штаммом *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 // Сб. “Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии”. – Минск: Микробио, 2004. – С. 261-262.

5. Чернова Л.С., Курдиш И.К. *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 – перспективный продуцент биологически активных веществ для растениеводства // Матер. IV Междунар. конфер. “Регуляция роста, развития и продуктивности растений” (г. Минск, 26-28 октября, 2005). – Минск, 2005. – С. 243.

6. Рой А.А., Залоило О.В., Чернова Л.С., Курдиш И.К. Антагонистическая активность фосфатмобилизующих бацилл к фитопатогенным грибам и бактериям // Агроекол. журн. – 2005. – № 1. – С. 50-55.

7. Курдиш И.К., Рой А.О., Цвей Я.П., Черната Д.М. Перспективи і проблеми інтродукції мікробних препаратів у агроценози // Вісник Чернівецького ун-ту. – 2005. – С. 126-131.

8. Егоренкова И.В., Кононова С.А., Скворцов И.М., Игнатов В.В. Исследование начальных этапов взаимодействия бактерий *Azospirillum brasilense* с корнями проростков пшеницы // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 1. – С. 120-126.

9. Соловова Г.К., Калаптур О.В., Чумаков М.М. Анализ прикрепления агробактерий к корням пшеницы и риса // Микробиология. – 1999. – Т. 68, № 1. – С. 76-82.

10. Bos R., van der Mei H.S., Busscher H.J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanism and methods for study // FEMS Microbiol. Rev. – 1999. – Vol. 23, N 2. – P. 179-230.

11. Кистень А.Г., Кигель Н.Ф., Курдиш И.К., Гордиенко А.С. Влияние некоторых физико-химических факторов среды на адгезию метанотрофных бактерий // Микробиол. журн. – 1996. – Т. 58, № 3. – С. 62-70.

12. Курдиш И.К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика. – К.: КВЦ, 2001. – 140 с.

13. Белимов А.А., Кунакова А.М., Груздева Е.В. Влияние pH почвы на взаимодействие ассоциативных бактерий с ячменем // Микробиология. – 1998. – № 4. – С. 561-568.

14. Morisaki H., Nagai S., Ohshima H. et al. The effect of mobility and cell surface polymers on bacterial attachment // Microbiol. – 1999. – Vol. 145, N 10. – P. 2797-2802.

15. Turnbull G.A., Morgan A.W., Whipps J.M., Saunders J.R. The role of mobility in the *in vitro* attachment of *Pseudomonas putida* Pa W8 to wheat roots // FEMS Microbiol. Ecol. – 2001. – Vol. 35, N 1. – P. 57-65.

16. Глоба Л.И., Гордиенко А.С. Установка для микроэлектрофореза // Мед. техника. – 1980. – № 2. – С. 50-51.

17. Глоба Л.И., Гордиенко А.С., Ротмистров М.Н. Электрокинетические свойства клетки бактерий в водных растворах солей // Химия и биотехнология воды. – 1981. – Т. 3, № 5. – С. 466-468.

АДГЕЗИЯ НА КОРИННІ ОГІРКІВ БАКТЕРІЙ – КОМПОНЕНТІВ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ РОСЛИННИЦТВА

Гордієнко А.С., Диренко Д.И., Бега З.Т., Курдиш И.К.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ,
м. Київ

*Встановлено, що на адгезію бактерій *Azotobacter vinelandii* та *Bacillus subtilis* на корінні огірків можуть впливати різні фактори. Основною умовою збільшення ефективності прикріплення клітин бацил є зниження від'ємного заряду їх поверхні. Адгезія клітин азотобактера залежить не тільки від електроповерхневих властивостей бактерій, але й від здатності клітин до активного руху.*

Ключові слова: адгезія бактерій, коріння рослин, заряд поверхні, рухливість клітин.

ADHESION OF BACTERIA – COMPONENTS OF PREPARATIONS FOR PLANT GROWING ON CUCUMBER ROOTS

Gordienko A.S., Direnko D.I., Bega Z.T., Kurdish I.K.

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
Kyiv

*It was determined that different factors can influence adhesion of bacteria *Azotobacter vinelandii* and *Bacillus subtilis* on cucumber roots. The main reason of the efficiency increase of bacillus cells attachment lies in the reduce of negative charge of their surface. Adhesion of azotobacter cells depends not only on the electro-surface properties of bacteria but on cells capacity to active motility as well.*

Key words: bacterial adhesion, plant roots, surface charge, cell motility.