ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

ФОРМИРОВАНИЕ СОВМЕСТНЫХ БИОПЛЕНОК ГРИБАМИ РОДА *TRICHODERMA* И PGP- БАКТЕРИЯМИ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Галимзянова Н.Ф.*, Актуганов Г.Э., Бойко Т.Ф.,
Гильванова Е.А., Кузьмина Л.Ю., Рябова А.С.,
Сафина В.Р., Мелентьев А.И.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа

*E-mail: galnailya@yandex.ru

Показана возможность образования совместных биопленок грибами рода *Trichoderma* и PGP-бактериями *Pseudomonas extremaustralis*, *P. koreensis*, *P. mandelii* и *Advenella kashmirensis*. Штаммы грибов, использованные в эксперименте, не только проявляют антагонизм к фитопатогенным грибам, но и способствуют ускорению разложения растительных остатков. Обнаружено, что микроскопические грибы, мицелиальное строение которых обеспечивает преимущества в достижении и освоении питательных субстратов, в ходе роста могут способствовать направленному перемещению клеток бактерий. Изученные штаммы бактерий передвигались вдоль мицелия грибов на поверхности среды, а на участках, где среда отсутствовала, бактерии перемещались внутри гиф, выходя из них при достижении мицелием субстрата. Полученный результат показывает возможность создания на основе этих микроорганизмов полифункционального биопрепарата нового поколения для сельского хозяйства, способствующего не только увеличению урожайности растений, защите их от болезней, вызываемых фитопатогенными грибами, но и поддерживающего почвенное плодородие.

Ключевые слова: совместные биопленки, PGP-бактерии, микроскопические грибы, *Pseudomonas*, *Advenella*, *Trichoderma*

IN VITRO FORMATION OF ASSOCIATED BIOFILMS BY *TRICHODERMA* SPP. AND PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA (PGPB)

Galimzianova N.F.*, Aktuganov G.E., Boyko T.F.,
Gilavnova E.A., Kuzmina L.Yu., Ryabova A.S.,
Safina V.R., Melentiev A.I.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa

*E-mail: galnailya@yandex.ru

The capability to formation of combined biofilms by the fungi from *Trichoderma* genus and several PGP-bacteria including *Pseudomonas extremaustralis*, *P. koreensis*, *P. mandelii* and *Advenella kashmirensis* has been demonstrated. The strains of *Trichoderma* used in the experiment not only exert antagonism to phytopathogenic fungi, but also accelerate the decomposition of plant residues. It was found that microscopic fungi whose mycelial structure offers advantages in reaching and assimilating of nutrient substrates, during their growth can favor to directional moving of bacteria cells. The explored bacterial strains moved along the fungal mycelium on the surface of the medium, and in areas where the medium was absent, the bacteria moved inside the hyphae, leaving them when the mycelium reached the substrate. The findings evidence the potential of considered microorganisms for developing of a new generation multifunctional biopreparation for agriculture, contributing not only to crop yield increase and plant protection against phytopathogenic fungi, but also maintaining soil fertility.

Keywords: co-biofilms, plant-growth promoting bacteria, microscopic fungi, *Pseudomonas*, *Advenella*, *Trichoderma*

Поступила в редакцию: 12.08.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-3-324-330](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-3-324-330)

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время стало очевидным, что взаимодействие между бактериями и микромицетами играет важную роль во многих природных и биотехнологических процессах [Frey-Klett et al., 2011]. Комбинированное применение различных PGP-штаммов бактерий и микромицетов в составе средств защиты сельскохозяйственных растений является перспективным подходом к стимулированию их роста и урожайности, а также повышению эффективности биологического контроля фитопатогенов в широком диапазоне условий внешней среды [Whipps, 2001; Leveau, Preston, 2008; Kai, 2019].

Микроскопические грибы, благодаря своему мицелиальному строению, имеют ряд преимуществ перед бактериями. Наличие разветвленной сети гиф способствует быстрому продвижению к субстрату и освоению ими больших площадей. Известно, что грибные экзометаболиты, аккумулируемые на поверхности и вблизи гиф, способствуют формированию специфической зоны – микосферы, в которой могут располагаться и клетки бактерий [Naq et al., 2014]. Исследования последних лет свидетельствуют о возможности создания искусственных микробных консорциумов, в которых бактерии, располагаясь на растущем мицелии грибов и двигаясь вдоль него, способны преодолевать значительные расстояния в гетерогенных средах, таких как почва [Simon et al., 2015]. Актуальность изучения взаимодействия PGP-бактерий и микроскопических грибов рода *Trichoderma*, обладающих комплексом полезных свойств (антагонизм к фитопатогенным грибам, высокая ферментативная активность, синтез антибиотиков и БАВ и т.д.), определяется возможностью создания на их основе полифункциональных биопрепаратов нового поколения для использования в сельском хозяйстве или при биоремедиации загрязненных территорий. Создание искусственного консорциума на основе PGP-бактерий и микромицетов - агентов биоконтроля и понимание их функционирования является важным этапом разработки новых полифункциональных биопрепаратов для сельского хозяйства

Целью нашего исследования стало изучение возможности образования совместных биопленок «бактерия-гриб» и способности штаммов PGP-бактерий из коллекции УИБ УФИЦ РАН передвигаться вдоль мицелия грибов рода *Trichoderma*.

МЕТОДЫ

Способность бактерий формировать совместные биопленки и передвигаться вдоль гиф грибов оценивали в парах гриб-бактерия. В эксперименте использовали штаммы *Trichoderma koningii* ИБ Г-51 или *T. harzianum* ИБ Г-58 и бактерии *Pseudomonas extremaustralis* ИБ-K13-1A (ВКМ В-3249), *P. koreensis* ИБ-4 (ВКМ В-2830D), *P. mandelii* ИБ-Ki14 (ВКМ В-3250), *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* ИБ-51 (ВКМ В-3455D), *Advenella kashmirensis* ИБ-K1 (ВКМ В-3251) или *Paenibacillus ehimensis* ИБ-739 (ВКМ В-2680D). Как ранее нами было показано, использованные в работе штаммы микроорганизмов обладают высоким биотехнологическим потенциалом для создания на их основе полифункциональных биопрепаратов для сельского хозяйства [Мелентьев и др., 2014, Жарикова и др., 2014, Кузьмина и др., 2015, Rafikova et al., 2016, Галимзянова и др., 2018].

Способность изучаемых штаммов бактерий образовывать совместные с грибами биопленки и передвигаться вдоль грибных гиф изучали, используя модификацию метода, описанного в работе [Simon et al., 2015]. В чашки Петри разливали по 20 мл КГА с концентрацией агара 0,7 или 1,5%. В одном из вариантов опыта использовали КГА, разведенный стерильной водопроводной водой в 2 раза (1/2 КГА). В середине чашки вырезали и удаляли полосу среды шириной 5 мм. У края чашки пробочным сверлом диаметром 9 мм делали две лунки на расстоянии 1-2 мм. В одну лунку помещали блок с грибом, вырезанный из чашки с КГА, на которой штамм культивировали в течение 7 сут. при 28° С. В другую лунку помещали блок с культурой бактерий, выращенной на такой же среде в течение 2-4 сут. (в зависимости от штамма). Совместные культуры инкубировали при 28° С в течение 7 сут. (Рисунок 1).

Рис.1. Схема опыта и развитие совместных биопленок грибов и бактерий. А - *T.koningii* и *A.kashmirensis*, Б - *T.harzianum* и *P.koreensis* (1 - гифы гриба, 2 - биопленка бактерии, 3 - выход бактерии из гифы на противоположной стороне разрыва среды)

Оценку развития биопленки проводили, измеряя диаметр колонии гриба или бактерии по границе роста. В качестве контрольных вариантов оценивали развитие колоний, формируемых штаммами бактерий и микромицетов при их отдельном культивировании. Мониторинг совместного развития бактерий и грибов производили ежедневно с помощью светового микроскопа “Leica DL1000” при увеличении $\times 10$ и $\times 100$ с цифровой камерой “Leica DFC290” (“Leica Microsystems”). Повторность экспериментов 3-кратная. При статистической обработке результатов использовали критерий Стьюдента при 0,05% уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показано, что изучаемые штаммы бактерий образуют совместные биопленки с обоими штаммами триходерм. Исключением явились *P. chlororaphis* ИБ-51 и *P. ehimensis* ИБ-739, проявившие высокий уровень антагонизма к этим штаммам грибов, что препятствовало их сближению.

Оценка развития колоний бактерий в контрольном варианте (без грибов) показала, что диаметр колоний колебался в зависимости от плотности среды от $9,1 \pm 0,1$ мм до $13,2 \pm 0,2$ мм. Максимальный диаметр колонии $29,3 \pm 0,4$ мм был выявлен для *P. mandelii* при культивировании на 1/2 КГА при 0,7% агара. Однако клетки ни одного изученного штамма бактерий не достигали разрыва среды.

Использование агара различной плотности не выявило значимого влияния этого фактора на образование совместной биопленки и движение бактерий вдоль мицелия. Динамика продвижения бактерий определялась скоростью роста гриба (табл. 1). При концентрации агара 1,5% в контрольных вариантах (без бактерий) радиальная скорость роста колоний *T. harzianum* снижалась, для *T. koningii* была выявлена противоположная тенденция – при концентрации агара 0,7% за 48 ч диаметр колонии достигал $37,0 \pm 1,1$ мм, а при 1,5% – $39,6 \pm 0,4$ мм. При совместном культивировании *T. harzianum* с *A. kashmirensis* и *P. extremaustralis* эта тенденция сохранялась, а в случае *P. koreensis* – менялась на

противоположную, что очевидно обусловлено сильными антагонистическими свойствами этого штамма.

Таблица 1. Рост *Trichoderma harzianum* при совместном культивировании с бактериями (КГА, диаметр, мм, 48 ч)

Бактерии	<i>T. harzianum</i>	
	0,7% агара	1,5% агара
<i>A. kashmirensis</i>	58,3±2,4	63,3±2,2
<i>P. extremaustralis</i>	36,3±0,4	39,0±2,0
<i>P. mandelii</i>	37,6±1,7	38,3±1,5
<i>P. koreensis</i>	36,0±1,0	33,0±1,5

Разбавление среды культивирования приводило к замедлению роста триходермы на начальных стадиях развития (48-72 часа) независимо от концентрации агара при совместном росте с бактериями. Однако на завершающей стадии культивирования диаметр колоний грибов был одинаковым во всех вариантах опыта (табл. 2).

Движение бактерий происходило непосредственно вдоль мицелия на поверхности среды, а при достижении гифами гриба разрыва в среде, клетки перемещались внутрь мицелия (рисунок 2). Мицелий грибов легко преодолевал разрыв и продолжал рост на его противоположной стороне.

Рис. 2 *T. harzianum* и *A. kashmirensis* после 6 сут совместного культивирования со штаммами бактерий (А-1- гифы грибов, 2 – клетки бактерий внутри гиф, Б - 3- выход бактерий из гиф, увеличение x1000).

Во всех вариантах опыта мицелий достигал разрыва через 72 ч. По достижении мицелием субстрата на противоположной стороне бактерии продолжали движение вдоль него или выходили, формируя микроколонии в микосфере. Развитие гриба (судя по диаметру колонии) при формировании совместной биопленки несколько замедлялось, но не прекращалось совсем (табл. 2). Обращает на себя внимание, что этот эффект отчетливее проявлялся при низкой концентрации агара. Вероятно, это обусловлено тем, что экзометаболиты бактерий, обладающие фунгистатическими свойствами, при низкой плотности среды распространялись в большем ее объеме. Все бактериальные культуры, формирующие совместную биопленку с микроскопическими грибами, успешно преодолевали разрыв в среде. Наиболее активное движение вдоль гиф отмечено для штамма *P. koreensis* ИБ-4.

Таблица 2. Развитие *T. harzianum* при совместном культивировании с бактериями рода *Pseudomonas* на различных вариантах питательной среды

Время культивирования	Диаметр колоний гриба, мм							
	КГА				1/2КГА			
	0,7%		1,5%		0,7%		1,5%	
	контроль	совместно	контроль	совместно	контроль	совместно	контроль	совместно
<i>P. extremotolerans</i>								
1 сутки	20,0±0,9	18,3±2,2	20,0±0,9	19,7±0,8	19,0±0,9	15,5±0,5	11,0±0,8	18,0±1,3
2 сутки	40,0±0,5	36,3±0,4	41,0±0,7	39,0±2,0	37,0±1,0	35,0±1,0	37,0±1,0	37,0±2,0
5 сутки	90,0±0,2	90,0±0,2	90,0±0,3	90,0±0,2	90,0±0,2	90,0±0,3	90,0±0,1	90,0±0,3
<i>P. mandelii</i>								
1 сутки	17,0±0,9	15,3±2,8	15,0±1,6	23,2±2,8	15,0±1,1	15±1,3	8,0±2,3	16±2,6
2 сутки	42,0±1,0	37,6±1,7	37,0±1,2	38,3±1,5	35,0±1,0	36,0±2,0	38,0±1,4	37±1,3
3 сутки	78,0±1,2	56,6±7,1	45,0±1,2	48,3±3,1	47,0±1,2	46±2,3	47,0±1,6	45,3±3,1
5 сутки	90,0±0,3	90,0±0,1	90,0±0,2	90,0 ±0,2	90,0±0,1	90,0±0,3	90,0±0,1	90,0±0,2

Полученный результат свидетельствует о принципиальной возможности создания искусственной ассоциации между изученными штаммами бактерий и микроскопических грибов. В таких ассоциациях микроскопический гриб выполняет несколько функций – не только является антагонистом фитопатогенных грибов и способствует разложению растительных остатков, но и служит специфическим вектором для PGP-бактерий, содействуя их распространению и поддерживая их жизнедеятельность в неблагоприятных условиях. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшей разработки полифункционального биопрепарата нового поколения для сельского хозяйства.

Таким образом, впервые показано, что бактерии *Advenella kashmirensis* ИБ-К1, *Pseudomonas extremaustralis* ИБ-К13-1А, *P. koreensis* ИБ - 4, *P. mandelii* ИБ-Ки14 *in vitro* способны формировать совместные биопленки с микроскопическими грибами *Trichoderma harzianum* и *T. koningii*. Бактерии способны перемещаться вдоль или внутри растущего мицелия грибов, преодолевая зоны, не поддерживающие их рост.

При проведении исследований использовали оборудование ЦКП "Агидель" УФИЦ РАН. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Галимзянова, Н.Ф., Кузьмина Л.Ю., Кудоярова Г.Р., Высоцкая Л.Б., Архипова Т.Н., Сидорова Л.В., Гуватова З.Г., Рябова А.С., Ионина В.И., Габбасова И.М., Мелентьев А.И. Влияние предпосевной бактеризации семян фосфатмобилизующими и ауксинпродуцирующими микроорганизмами на продуктивность пшеницы и подвижность почвенного фосфора в ризосфере // Агрохимия. 2018. № 4. С. 50-58.
2. Жарикова, Н.В., Галимзянова Н.Ф., Журенко Е.Ю., Ясаков Т.Р., Коробов В.В., Сагитова А.И., Маркушева Т.В. Анализ взаимоотношений бактериальных штаммов-деструкторов ксенобиотиков и микромицетов рода *Trichoderma* // Известия Уфимского научного центра Российской Академии наук. 2014. № 1. С. 72-76.
3. Кузьмина, Л.Ю., Высоцкая Л.Б., Галимзянова Н.Ф., Гильванова Е.А., Рябова А.С., Мелентьев А.И. Новые штаммы фосфатмобилизующих бактерий, продуцирующие ауксин, перспективные для сельскохозяйственной биотехнологии // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук . 2015. № 1. С. 40-46.
4. Мелентьев А.И., Габбасова И.М., Галимзянова Н.Ф., Сулейманов Р.Р., Актуганов Г.Э., Бойко Т.Ф., Гарипов Т.Т., Сидорова Л.В., Комиссаров М.А. Способ утилизации сплавнины, извлеченной при очистке водоемов и улучшения плодородных свойств почв сельскохозяйственного назначения. Патент РФ № 2531167. Оpubл. 20.10.2014. Бюл. №29.
5. Frey-Klett, P., Burlinson P., Deveau A., Barret M., Tarkka M., Sarniguet A. Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2011. V. 75, No. 4. P. 583-609.
6. Haq, I.U., Zhang M., Yang P., JVan Elsas .D. The interactions of bacteria with fungi in soil: emerging concepts // Adv. Appl, Microbiol. 2014. V.89. P. 185-215. DOI: 10.1016/B978-0-12-800259-9.00005-6.

7. Kai K. Bioorganic chemistry of signaling molecules in microbial communication // J. Pestic. Sci. 2019. V. 44, No. 3. P. 200-207.
8. Leveau J.H., Preston G.M. Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial–fungal interaction. Tansley review // New Phytologist. 2008. V. 177. P. 859-876.
9. Rafikova G.F., Korshunova T.Yu., Minnebaev L.F., Chetverikov S.P., Loginov O.N. A New Bacterial Strain, *Pseudomonas koreensis* IB-4, as a Promising Agent for Plant Pathogen Biological Control // Microbiology. 2016. V. 85. No. 3. P. 333–341. DOI: [10.1134/S0026261716030115](https://doi.org/10.1134/S0026261716030115)
10. Simon, A., Bindschedler S., Job D. Exploiting the fungal highway: development of a novel tool for the isolation of bacteria migrating along fungal mycelium // FEMS Microbiology Ecology. 2015. V. 91. DOI: [10.1093/femsec/fiv116](https://doi.org/10.1093/femsec/fiv116)
11. Whipps J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 487-511.