

Идентификация и применение аборигенных изолятов *Bacillus subtilis* в агроценозе сахарной свёклы

Т.С. РУДЕНКО, мл. научн. сотрудник

А.С. ХУССЕЙН, ст. научн. сотрудник, канд. биолог. наук

Н.В. БЕЗЛЕР, вед. научн. сотрудник, д-р с/х. наук, профессор

А.А. НАЛБАНДЯН, ст. научн. сотрудник, канд. биолог. наук, зав. лаб. маркер-ориентированной селекции
(e-mail: arpnal@rambler.ru)

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

Введение

Сахарная свёкла — одна из важнейших технических культур, имеющих стратегическое значение и определяющих продовольственную безопасность страны. Однако её продуктивность ограничена рядом причин, среди которых важное место занимают эпифитотийные заболевания листового аппарата грибной этиологии: церкоспороз (*Cercospora beticola*) и мучнистая роса (*Erysiphe betae*). Преждевременные потери ассимиляционной площади листового аппарата вызывают затраты пластических веществ корней на новообразование листьев, что влечёт за собой снижение урожайности и ухудшает технологические качества корнеплодов. В настоящее время хозяйственно значимым способом борьбы с болезнями листового аппарата сахарной свёклы является использование фунгицидов. Однако, будучи высокотоксичными ядами, они оказывают угнетающее действие на микробное сообщество в агрофитоценозах [1].

На современном этапе развития сельского хозяйства представляется перспективным развитие экологически безопасных биологических методов борьбы с заболеваниями сельскохозяйственных растений с помощью микробиологических препаратов на основе аборигенных штаммов микроорганизмов — антагонистов почвенных патогенов, к которым относятся представители рода *Bacillus*. Известно, что данные бактерии способны не только повышать урожайность важных сельскохозяйственных культур и улучшать развитие корней, но и укреплять повышать их стрессоустойчивость к био- и абиотическим факторам [2–4].

Идентификация бактерий морфологическими, культуральными, физиолого-биохимическими методами считается недостаточной, так как многие виды характеризуются высоким уровнем фенотипической изменчивости. Молекулярно-генетические методы детекции микроорганизмов не подвержены влиянию внешних факторов [5]. Сегодня для изучения филогене-

тики бактерий анализируется последовательность гена *16S pPHK* — участка, универсального для всех прокариот. Ген *16S pPHK* консервативен, устойчив к мутациям, влияющим на его структуру [6]. Однако он имеет «видовые» полиморфные области, поэтому анализ его последовательности может определять эволюционное расстояние и взаимоотношения различных бактерий, а также идентифицировать бактерии. Более того, гены *16S pPHK* повсеместно встречаются у прокариот и подходят для анализа всех бактерий. Использование консервативных областей для создания универсальных праймеров позволяет амплифицировать фрагменты *16S pPHK* различных бактерий; использование последовательностей полиморфных областей позволяет различать различные «виды» бактерий [7].

Тем не менее филогенетический анализ гена *16S pPHK* не позволяет дифференцировать виды внутри комплекса *B. subtilis* из-за высококонсервативной природы гена, несмотря на значения dDDH, которые значительно ниже 70 % для сравнения тех же видов [8, 9].

Целью данной работы являлась идентификация аборигенных микроорганизмов — штаммов бактерий *Bacillus* sp. в чистой культуре.

Материалы и методы исследования

Аборигенные штаммы антагонистов выделяли из почвы свекловичного агроценоза методом посева почвенной суспензии на элективные питательные среды. Для споровых бацилл применяли мясопептонный агар (МПС). В целях получения чистых культур выросшие на чашках Петри колонии многократно пересеивали [10]. ДНК выделяли с помощью набора diaGene в соответствии с протоколом производителя («Диа-М», Россия). Качество образцов оценивали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в 1×ТВЕ-буфере и определяли концентрацию ДНК

с использованием набора для анализа ДНК HS QubitR (Thermo Fisher Scientific, США).

ПЦР-амплификацию осуществляли на приборе SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific, USA). Поиск оптимальной температуры отжига праймеров осуществляли с помощью реакции ПЦР с температурным градиентом. Финальная программа включала 94 °С, 2' + ((94°, 45" + 60 °С, 1' + 72 °С, 50") · 39) + 72 °С, 7'. Ген *16S pPHK* амплифицировали с помощью праймеров 27F (5'– AGAGTTTGATCCTGGCTCAG–3') и 1492R (5'– ACGGYTACSTTGTACGACTT–3') [7].

Для регистрации продуктов ПЦР-амплификации проводили аналитический электрофорез в 1,3%-ном агарозном геле. Визуализацию осуществляли под действием УФ-излучения на трансиллюминаторе ЕСХ-F15.С (Vilber Lourmat, France).

Идентификацию нуклеотидной последовательности *16S pPHK* выполняли поиском гомологичных последовательностей в базе данных NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Определение гомологии гена *16S pPHK* определяли с помощью инструмента множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей Geneious Prime.

Для проверки эффективности использования аборигенных штаммов в агроценозе сахарной свёклы в 2007–2012 гг. в зернопаропропашном севообороте ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова изучали влияние препарата на основе штамма *Bacillus subtilis 20* на МСО (микробное сообщество) филопланы растений сахарной свёклы. Полевой опыт заложен на фоне минерального удобрения $N_{100}P_{100}K_{100}$. Технология возделывания сахарной свёклы общепринятая для ЦЧР. Объекты исследования – гибриды РМС 70, РМС 120. Посевы сахарной свёклы обрабатывали препаратами в два срока. Первая обработка – превентивно, для предупреждения заболевания растений сахарной свё-

лы; вторая – лечащего действия, по факту появления заболевших растений в посевах. Расход рабочей жидкости 200 л/га. Через два дня после каждой обработки посевов сахарной свёклы учитывали численность микроорганизмов филопланы сахарной свёклы методом высева суспензии растительного материала на элективные питательные среды.

Действие *Bacillus subtilis 20* на *Erysiphe betae* определяли, закрыв половину листа сахарной свёклы, поражённого мучнистой росой, а вторую часть обрабатывали суспензией бактерии [11]. Фотографии получены с помощью электронного сканирующего микроскопа (рис. 1). Электронно-микроскопические исследования показали, что аборигенный штамм *Bacillus subtilis 20* обладает способностью колонизировать филоплану сахарной свёклы и вызывать лизис клеток *Erysiphe betae*.

Статистическую обработку проводили методом дисперсионного анализа двухфакторного опыта с оценкой различий между вариантами и факторами на уровне значимости 95 % по критерию Фишера (НСР) [12].

Результаты и обсуждение

В результате амплификации гена *16S pPHK* трёх исследуемых штаммов с применением праймеров 27F и 1492R у всех трёх образцов бактерий получен ДНК-фрагмент длиной около 1380 п. н. (рис. 2).

Для выяснения видовой принадлежности штаммов амплифицирован участок *16S pPHK*. Множественное выравнивание выявило, что используемый фрагмент *16S pPHK* является гипервариабельной областью и имеет высокую видоспецифичность [6, 7]. Результаты сравнительного анализа показали, что изучаемые штаммы бактерий являются представителями рода *Bacillus*. Степень сходства амплифицированного участ-

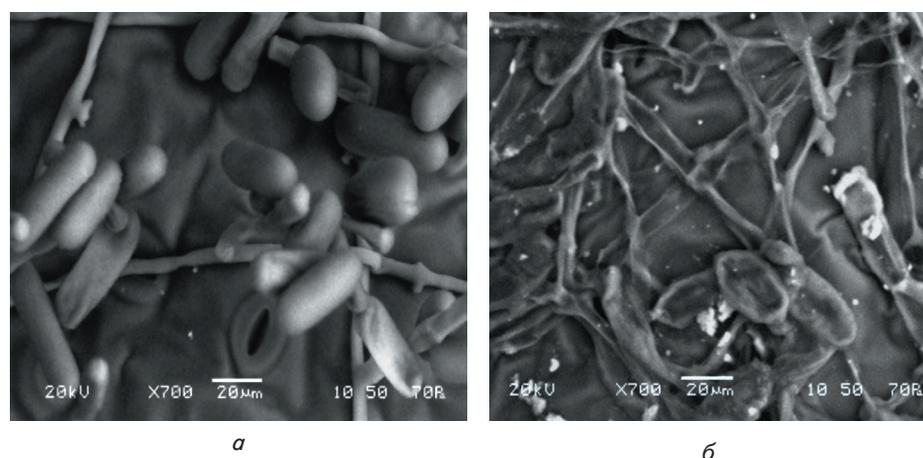


Рис. 1. Развитие *Erysiphe betae* на листовой пластинке сахарной свёклы (а) и действие *Bacillus subtilis 20* на *Erysiphe betae* (б)

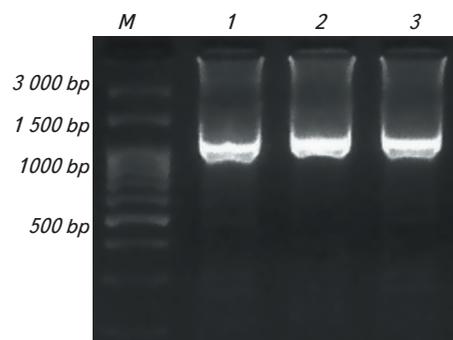


Рис. 2. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов, амплифицированных с помощью праймеров 27F/1492R. Обозначения образцов: 1–3 – штаммы бактерий (119, 180, 20). М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™ (ThermoScientific, США)

ка гена *16S pPHK* данных образцов со штаммами вида *Bacillus subtilis* составляет > 99,8 % (рис. 3).

Таким образом, в результате молекулярно-генетического типирования идентифицированы почвенные штаммы рода *Bacillus* 119, 180 и 20 как *Bacillus subtilis*. Высокая степень гомологии показана и с другим видом группы *Bacillus subtilis* – *B. amyloliquefaciens* (более 99,6 %). Это объясняется тем, что амплифицированный участок гена *16S pPHK*, отличающийся высоким уровнем полиморфизма, достаточен для идентификации видов группы *Bacillus subtilis*. Так, в результате молекулярно-генетического типирования идентифицированы почвенные штаммы рода *Bacillus* 119, 180 и 20 как *Bacillus subtilis* и *B. amyloliquefaciens*. Филогенетический анализ гена *16S pPHK* внутри комплекса видов *B. subtilis* для установления филогенетических отношений между этими видами неэффективен для данной группы [13]. Поэтому для видового разделения необходимы геномный сиквенс, анализ средней нуклеотидной идентичности и цифровая ДНК-ДНК гибридизация. Однако целью нашего исследования был только поиск diaзотрофных представителей рода *Bacillus*.

Известно, что на поверхности надземных частей растений обитают микроорганизмы, получившие

название эпифитов, или организмов филлосферы. Они являются составной частью естественной флоры растения и не паразитируют на нём, а растут за счёт выделений достаточно развитой его поверхности. Типичные эпифиты существуют на здоровых растениях как олиготрофы, т. е. благодаря незначительному количеству питательных веществ, постоянно выделяющихся на поверхность органов растений, – продуктов экзосмоса. Способности, выработанные в процессе эволюции, позволяют микробному сообществу жить и поддерживать свою численность на поверхности растений, не причиняя вреда последним. Напротив, многие эпифиты вырабатывают биологически активные вещества и образуют естественный защитный экран на поверхности растений, среди которых часто встречаются виды, обладающие антагонистическими свойствами. Наблюдения за влиянием *Bacillus subtilis* 20 и фунгицида на развитие спорных бацилл и микромицетов на поверхности листьев сахарной свёклы показали, что препарат «Альто-Супер» способствовал сокращению численности спорных бацилл в филлоплане сахарной свёклы с 0,029 в контроле до 0,018 млн КОЕ на 1 см² п. л. п. (площади листовой поверхности). Штамм *Bacillus subtilis* 20, напротив, увеличивал численность спорных бацилл



Рис. 3. Фрагмент выравнивания последовательности гена *16S pPHK* исследуемых штаммов (B119, B180, B20) с последовательностью *16S pPHK* контрольных образцов *Bacillus subtilis* (JQ900635.1, MF136610.1. NCBI)

в филлоплане сахарной свёклы до 0,035 млн КОЕ на 1 см² п. л. п., что свидетельствует о приживаемости внесённых в агроценоз бацилл (см. табл.).

И фунгицид, и *Bacillus subtilis* 20 способствовали снижению численности микромицетов на поверхности листьев сахарной свёклы. Хотя фунгицид в большей степени подавлял развитие микромицетов, *Bacillus subtilis* 20 была достаточно эффективна. Выявлено ингибирующее влияние фунгицида «Альто-Супер» на развитие естественных антагонистов микромицетов-фитопатогенов – *Bacillus subtilis* в филлоплане сахарной свёклы (рис. 4).

Взаимодействие *Bacillus subtilis* 20 с растениями сахарной свёклы не ограничивается подавлением развития микромицетов. Отмечено её стимулирующее влияние на формирование урожайности растений. Вероятно, это связано с продуцированием бациллярными формами цитокининов, что и было подтверждено тестовыми методами [14]. Внесение *Bacillus subtilis* 20 в агроценоз сахарной свёклы способствовало достоверному росту урожайности корнеплодов на 2,4 т/га, тогда как фунгицид её практически не изменил. Наметилась лишь тенденция роста продуктивности сахарной свёклы (1,1 т/га).

Выводы

Секвенированы нуклеотидные последовательности консервативного участка гена *16S рPHK* трёх штаммов микроорганизмов. Сравнительный анализ последовательностей гена *16S рPHK* с аналогичными последовательностями из международной базы данных GenBank показал, что исследуемые штаммы могут быть отнесены к роду *Bacillus*, доказана их процентная достоверность на 99 %. Анализ последовательностей позволил отнести штаммы к видам группы *Bacillus subtilis*.

Использование *Bacillus subtilis* 20 в производстве сахарной свёклы экологически безопасно. Кроме того, этот приём позволяет стабилизировать структуру микробного сообщества филлопланы сахарной свёк-

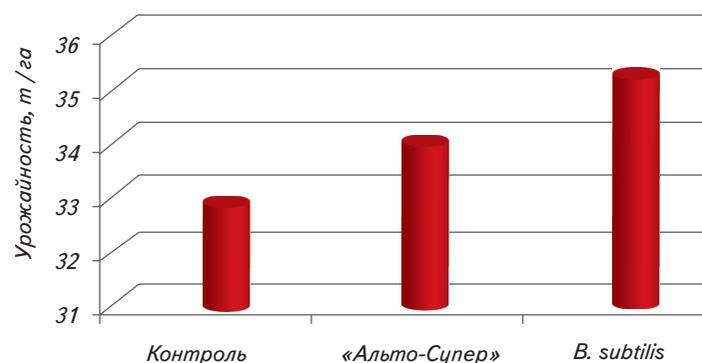


Рис. 4. Влияние препарата «Альто-Супер» и *Bacillus subtilis* 20 на урожайность сахарной свёклы (т/га) (НСР₀₅ – 2,1 т/га)

Сравнительное влияние фунгицида и *Bacillus subtilis* 20 на численность бациллярных форм спорových бактерий и микромицетов в филлоплане сахарной свёклы (млн КОЕ на 1 см² п. л. п.)

Вариант опыта и применяемый препарат	Расход препарата	Споровые бациллы	Микромицеты
Контроль	–	0,029	1,126
«Альто-Супер» (эталон)	0,75 л на 200 л воды на 1 га	0,018	0,992
<i>Bacillus subtilis</i> 20	1,4 · 10 ¹⁵ /га	0,035	1,042
НСР ₀₅ по препаратам		0,006	0,007

лы и повысить её функцию защиты. Использование аборигенных штаммов микроорганизмов антагонистов фитопатогенов в агроценозах не может осуществляться без точного определения видовой принадлежности и секвенирования для полной идентификации штамма.

Список литературы

1. Efficacy of fungicides in sugar beet crops / D. Avizienytė, Z. Brazienė, K. Romaneckas, A. Marcinkevičius // Zemdirbyste-Agriculture. – 2016. – V. 103. – Is. 2. – P. 167–174. DOI: 10.13080/z-a.2016.103.022.
2. Tiwari, Sh. Chapter 3 – *Bacillus*: Plant Growth Promoting Bacteria for Sustainable Agriculture and Environment / Sh. Tiwari, V. Prasad, Ch. Lata // New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. – 2019. – P. 43–55.
3. Neustroev, M.P. Bactericidal action of the *Bacillus subtilis* bacterial strains on the agents of leptospirosis / M.P. Neustroev, N.P. Tarabukina, A.M. Stepanova [et al.] // Russian Agricultural Sciences. – 2015. – V. 41. – P. 403–405. https://DOI.org/10.3103/S1068367415050134.
4. Aeini, M. Rhizosphere Bacterial Composition of the Sugar Beet Using SDS-PAGE Methodology / M. Aeini, G. Khodakaramian // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2018. – V. 60. DOI.org/10.1590/1678-4324-2017160374.
5. Thorne, J.L. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution / J.L. Thorne, H. Kishino, I.S. Painter // Molecular Biology Evolution. – 1998. – V. 15 (12). – P. 1647–1657. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025892.
6. Clarridge, J.E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases / J.E. Clarridge // Clinical Microbiological Reviews. – 2004. – V. 17 (4). P. 840–862. DOI: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.
7. Vardhan, S. Restriction analysis and partial sequencing of the *16S rRNA* gene as index for rapid identification of *Bacillus* species / S. Vardhan, R. Kaushik, A.K. Saxena // Antonie van Leeuwenhoek. – 2011. – V. 99. – P. 283–296. DOI:10.1007/s10482-010-9487-4.
8. Woese, C.R. Bacterial evolution / C.R. Woese // Microbiol Review. – 1987. – V. 51 (2). – P. 221–271.

Мы знаем о сахаре всё!

А вы?



9. *Khurana, H.* Genomic insights into the phylogeny of *Bacillus* strains and elucidation of their secondary metabolic potential / H. Khurana, M. Sharma, H. Verma [et al.] // *Genomics*. – 2020. – V. 112(5). – P. 3191–3200.

10. *Tenner, E.3.* Практикум по микробиологии : учеб. пособие для вузов / Е.3. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева / Под ред. В.К. Шильниковой. – М. : Дрофа, 2004. – С. 256.

11. *Безлер, Н.В.* Влияние фунгицида «Альто-супер» и штамма *Bacillus subtilis 20* на численность бактериальных форм спорообразующих аэробных бактерий и микромицетов в филлоплане и урожайность сахарной свёклы / Н.В. Безлер, А.А. Синицын, Б.Л. Агапов // *Агрохимия*. – 2012. – № 8. – С. 28–33.

12. *Доснехов, Б.А.* Методика полевого опыта. – М. : Агропромиздат, 1985. – С. 351.

13. *Wang, W.* Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from *16s rDNA* sequences / W. Wang // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2009. – V. 40 (3). – P. 505–521. DOI: 10.1590/S1517-838220090003000013.

14. *Барыкина, Р.П.* Справочник по ботанической микротехнике. Осно-

вы и методы. – М. : МГУ, 2004. – С. 312.

Аннотация. Исследованы аборигенные штаммы бактерий, выделенные из почвы свекловичного агроценоза методом высева почвенной суспензии на селективные питательные среды. На основе проведённого ПЦР-анализа, с использованием универсальных праймеров 27F/1492R, специфичных к гену *16S rPHK*, идентифицированы выделенные изоляты. Множественное выравнивание полученных ДНК-последовательностей в программе Geneious Prime позволило отнести их к группе бактерий *Bacillus subtilis*. Изучение влияния *Bacillus subtilis 20* и фунгицида «Альто-Супер» на развитие спорных бацилл и микромицетов на поверхности листьев сахарной свёклы показало, что препарат способствовал сокращению численности спорных бацилл: в филлоплане с 0,029 в контроле до 0,018 млн. КОЕ на 1 см² п. л. п. (площади листовой поверхности). Штамм *Bacillus subtilis 20* увеличивал численность спорных бацилл в филлоплане сахарной свёклы до 0,035 млн КОЕ на 1 см² п. л. п., что свидетельствует о приживаемости внесённых в агроценоз бацилл. Показано, что внесение *B. subtilis 20* в агроценоз сахарной свёклы способствует росту урожайности корнеплодов на 2,4 т/га.

Ключевые слова: сахарная свёкла, филогения, *Bacillus* sp., *16S rPHK*, праймеры, урожайность.

Summary. Indigenous bacterial isolates from beet agroecosystem by sowing a soil suspension on elective nutrient media have been investigated. Isolates, by PCR analysis using universal and specific primers 27F/1492R to *16S rRNA* gene were identified. Multiple alignment using Geneious Prime tools allowed to assign them to *Bacillus subtilis* group. Effectiveness of *Bacillus subtilis 20* and the function of «Alto-Super» (fungicide) on the development of bacilli and micromycetes on the surface of sugar beet leaves showed that the fungicide contributed to decrease the number of bacilli in phylloplana from 0.029 in control to 0.018 million CFU per 1 cm² of leaf surface area but *Bacillus subtilis 20* increased the number of bacilli in the phylloplana of sugar beet up to 0.035 million CFU per 1 cm² of leaf surface area, which indicates the survival rate of introduced bacilli into the agroecosystem. Finally, using of *B. subtilis 20* as an additive to the sugar beet agroecosystem contributes to increase the yield of root crops about 2.4 t/ha was shown.

Keywords: sugar beet, phylogeny, *Bacillus* sp., *16S rRNA*, primers, yield.