

## ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ЭКЗОФЕРМЕНТЫ РОСТСТимуЛИРУЮЩИХ РИЗОБАКТЕРИЙ *PAENIBACILLUS POLYMUХA*

И.В. Егоренкова, К.В. Трегубова, В.В. Игнатов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия, [egorenkova\\_i@ibppm.ru](mailto:egorenkova_i@ibppm.ru)

**Аннотация.** Представлены современные данные исследований, связанных с продукцией ризобактериями *Paenibacillus polymyxa* спектра физиологически активных метаболитов, в том числе гидролитических ферментов. В результате сравнительной оценки штаммов *P. polymyxa* выявлена способность ряда штаммов к синтезу: целлюлаз, хитиназ, пектиназ, амилаз, протеаз и липаз. Тестируемые штаммы *P. polymyxa* и их метаболиты могут представлять интерес для использования в качестве биопрепаратов для сельского хозяйства.

**Ключевые слова:** *Paenibacillus polymyxa*, ростстимулирующий эффект, пшеница, литические ферменты, биопрепараты

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-293-296

Одним из аспектов биологического земледелия, основанного на экологической стабилизации агроэкосистем, является применение микробных препаратов. Разработаны экологически безопасные биоудобрения, которые вводятся в систему необходимых агротехнических мероприятий и успешно применяются в технологиях выращивания сельскохозяйственных культур в различных агроклиматических зонах [Чайковская, Клименко, 2016]. К числу бактерий, входящих в состав таких препаратов, относят бактерии рода *Paenibacillus*, включающего на данный момент более 200 видов факультативных анаэробов, с типовым видом *P. polymyxa*.

Формирование эффективных ассоциативных отношений ростстимулирующих ризобактерий *P. polymyxa* связывают с их способностью к азотфиксации, улучшению минерального питания и водного баланса растений, адаптированностью к стрессовым условиям окружающей среды, а также с продукцией широкого спектра физиологически активных метаболитов, среди которых: фитогормоны, литические ферменты, антибиотики и экзополисахариды (ЭПС) [Raza et al., 2008; Liang, Wang, 2015; Kwon et al., 2016]. В последние годы для ряда агрономически важных штаммов *P. polymyxa* представлены полные последовательности геномов. Данные геномы кодируют синтез гормонов роста растений, антибиотиков, гидролитических ферментов и других метаболитов [Liu et al., 2017].

Сообщалось об амилазной, протеазной, ксиланазной, целлюлазной, хитиназной, пектацетилазной активностях, обнаруженных у ряда штаммов *P. polymyxa* [Raza et al., 2008; Adhikari et al., 2017]. Создание эффективных препаратов биологического контроля грибных фитопатогенов является одной из актуальных задач современной микробиологии. По мнению многих исследователей, одним из ключевых элементов таких препаратов может быть миколитическая активность внеклеточных ферментов бактерий.

Мы оценивали способность ряда штаммов *P. polymyxa*: ССМ 1459<sup>T</sup>, ССМ 1460, ССМ 1465, 88А и 92 к синтезу внеклеточных литических ферментов. На первом этапе использовали чашечный тест – простой и эффективный метод экспресс-оценки ферментативной активности у бактерий, часто применяемый для решения подобных задач [Чеботарь и др., 2009; Rasul et al., 2015, Adhikari et al., 2017]. Использовали дифференциально-диагностические плотные среды со специфическими субстратами: для выявления амилазной активности – с растворимым крахмалом, целлюлазной – с кристаллической целлюлозой, хитиназной – с коллоидным хитином, протеазной – с

молочным агаром, пектиназой – со свекловичным, цитрусовым или яблочным пектином, липолитической – с твином-40, твином-60 и твином-80. Синтез и активность литических ферментов оценивали по величине отчетливых зон просветления среды вокруг колоний (после обработки пластин соответствующими проявителями). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Microsoft Office Excell 2003. Доверительные интервалы даны для надежности 95%.

Активные штаммы бактерий на агаризованной среде вследствие расщепления субстрата литическими ферментами образуют зоны просветления вокруг колоний. В результате проведенных экспериментов обнаружено, что все исследуемые штаммы *P. polytuxa* в той или иной мере обладали способностью к продукции ряда литических экзоферментов: протеаз, амилаз, целлюлаз, хитиназ, липаз и пектиназ (таблица).

**Таблица.**

**Способность штаммов ризобактерий *Paenibacillus polytuxa* к синтезу ряда литических экзоферментов**

Штаммы	Ферментативная активность, радиус зоны просветления среды (мм)				
	Амилазная*	Протеазная*	Целлюлазная*	Пектолитическая**	
				Цитрусовый пектин	Яблочный пектин
<i>P. polytuxa</i> ССМ 1459 <sup>T</sup>	15.3 ± 0.3	10.0 ± 0.6	8.5 ± 0.2	12.5 ± 0.3	14.8 ± 0.3
<i>P. polytuxa</i> ССМ 1460	15.3 ± 0.3	9.0 ± 0.5	17.4 ± 0.2	12.3 ± 0.2	14.5 ± 0.2
<i>P. polytuxa</i> ССМ 1465	18.7 ± 0.5	7.0 ± 0.3	18.0 ± 0.3	12.0 ± 0.5	13.5 ± 0.4
<i>P. polytuxa</i> 88А	20.2 ± 0.8	10.0 ± 1.1	13.8 ± 0.2	12.6 ± 0.2	14.3 ± 0.2
<i>P. polytuxa</i> 92	22.0 ± 0.4	10.8 ± 0.6	21.6 ± 0.3	12.5 ± 0.2	14.5 ± 0.2

**Примечание:** Доверительные интервалы даны для надежности 95%. \* Приведены данные для 7 суток культивирования бактерий, \*\* – для 4 суток.

По литературным данным, миколитические штаммы *Paenibacillus* sp. продуцируют гидролитические ферменты: протеазы, 1,3-глюканазы и хитиназы, – роль которых в лизисе клеточных стенок грибов и оомицетов существенно возрастает в условиях дефицита других органических источников углерода и азота [Nielsen, Sorensen, 1997].

Установлено, что все анализируемые нами штаммы *P. polytuxa* обладали примерно одинаковой высокой способностью разлагать пектины, полученные из различных источников сырья (таблица). Важность поиска таких штаммов определяется перспективностью использования пектолитических ферментов в разных сферах хозяйства, основанных на переработке растительного сырья, повышении биологической ценности кормов или разложения растительных остатков в почве. Следует отметить, что по нашим данным некоторые из протестированных штаммов *P. polytuxa* активно колонизировали корни проростков пшеницы, образовывали биопленки, продуцировали ЭПС и стимулировали рост, развитие и защитные реакции пшеницы [Егоренкова и др., 2016; Yegorenkova et al., 2013].

Таким образом, совокупность результатов данного исследования и сведений, полученных нами ранее, позволяет предположить, что ризобактерии *P. polytuxa* и их метаболиты обладают ценными свойствами и могут представлять интерес для использования в качестве биопрепаратов для сельского хозяйства, что может

существенно снизить применение химических веществ и способствовать сохранению и оздоровлению природной среды.

#### Литература

Егоренкова И.В., Трегубова К.В., Коннова С.А., Бугреева Л.В., Игнатов В.В. Влияние экзополисахаридов бактерий *Paenibacillus polymyxa* 1465 на рост и защитные реакции пшеницы // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология. – 2016. – Т. 16, вып. 4. – С. 414–420.

Чайковская Л.А., Клименко Н.Н. Размножение бактерий *Paenibacillus polymyxa* в ризосфере винограда // Аграрный вестник Урала. – 2016. – № 3 (145). – С. 72–76.

Чеботарь В.К., Макарова Н.М., Шапошников А.И., Кравченко Л.В. Антифунгальные и фитостимулирующие свойства ризосферного штамма *Bacillus subtilis* 4–13 – продуцента биопрепаратов // Прикл. биохим. микробиол. – 2009. – Т. 45, № 4. – С. 465–469.

Adhikari M., Yadav D.R., Kim S.W., Um Y.H., Kim H.S., Lee S.C., Song J.Y., Kim H.G., Lee Y.S. Biological control of bacterial fruit blotch of watermelon pathogen (*Acidovorax citrulli*) with rhizosphere associated bacteria // Plant Pathol. J. – 2017. – V. 33, № 2. – P. 170–183.

Kwon Y.S., Lee D.Y., Rakwa R., Baek S.-B., Lee J.H., Kwak Y.-S., Seo J.-S., Chung W.S., Bae D.-W., Kim S.G. Proteomic analyses of the interaction between the plant-growth promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681 and *Arabidopsis thaliana* // Proteomics. – 2016. – V. 16. – P. 122–135.

Nielsen P., Sorensen J. Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere // FEMS Microbiol. Ecol. – 1997. – V. 22. – P. 183–192.

Liang T.-W., Wang S.-L. Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: production, isolation, structure, and bioactivities // Mar Drugs. – 2015. – V. 13. – P. 1847–1863.

Liu H., Wang C., Li Y., Liu K., Hou Q., Xu W., Fan L., Zhao J., Gou J., Du B., Ding Y. Complete genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* YC0573, a plant growth-promoting rhizobacterium with antimicrobial activity // Genome Announc. – 2017. – 5:e01636–16. doi.org/10.1128/genomeA.01636–16.

Rasul F., Afroz A., Rashid U., Mehmood S., Sughra K., Zeeshan N. Screening and characterization of cellulase producing bacteria from soil and waste (molasses) of sugar industry // Int. J. Biosci. – 2015. – V. 6, N 3. – P. 230–238.

Raza W., Yang W., Shen Q.-R. *Paenibacillus polymyxa*: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment // J. Plant Pathol. – 2008. – V. 90. – P. 419–430.

Yegorenkova I.V., Tregubova K.V., Ignatov V.V. *Paenibacillus polymyxa* rhizobacteria and their synthesized exoglycans in interaction with wheat roots: colonization and root hair deformation // Curr. Microbiol. – 2013. – V. 66. – P. 481–486.

## HYDROLYTIC EXOENZYMES OF THE PLANT-GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIUM *PAENIBACILLUS POLYMYXA*

I.V. Yegorenkova, K.V. Tregubova, V.V. Ignatov

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia, [egorenkova\\_i@ibppm.ru](mailto:egorenkova_i@ibppm.ru)

**Abstract.** Current data are reported from research on the production by *Paenibacillus polymyxa* rhizobacteria of a range of physiologically active metabolites, including hydrolytic enzymes. A comparative evaluation of *P. polymyxa* strains showed that several strains were able to produce cellulases, chitinases, pectinases, amylases, proteases, and lipases. The tested *P. polymyxa* strains and their metabolites may be of interest for use as biopreparations for agriculture.

**Keywords:** *Paenibacillus polymyxa*, plant-growth promotion, wheat, lytic enzymes, biopreparations