

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОФИТОВ ТОПОЛЯ\*

O.N. Tyukavina, A.V. Odintsova,  
A.S. Aksenov, M.V. Emelyanova

## THE ALLOCATION AND CHARACTERIZATION OF POPLAR BACTERIAL ENDOPYTES

**Тюкавина О.Н.** – канд. с.-х. наук, доц. каф. биологии, экологии и биотехнологии Северного (Арктического) федерального университета им. М.В. Ломоносова, г. Архангельск. E-mail: o.tukavina@narfu.ru

**Одинцова А.В.** – магистрант каф. биологии, экологии и биотехнологии Северного (Арктического) федерального университета им. М.В. Ломоносова, г. Архангельск. E-mail: odinalen@gmail.com

**Аксенов А.С.** – канд. техн. наук, доц., зав. каф. биологии, экологии и биотехнологии Северного (Арктического) федерального университета им. М.В. Ломоносова, г. Архангельск. E-mail: a.s.aksenov@narfu.ru

**Емельянова М.В.** – канд. техн. наук, доц. каф. биологии, экологии и биотехнологии Высшей школы естественных наук и технологий Северного (Арктического) федерального университета им. М.В. Ломоносова, г. Архангельск. E-mail: m.emelyanova@narfu.ru

**Tyukavina O.N.** – Cand. Agr. Sci., Assoc. Prof., Chair of Biology, Ecology and Biotechnology, Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, Arkhangelsk. E-mail: o.tukavina@narfu.ru

**Odintsova A.V.** – Magistrate Student, Chair of Biology, Ecology and Biotechnology, Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, Arkhangelsk. E-mail: odinalen@gmail.com

**Aksenov A.S.** – Cand. Techn. Sci., Assoc. Prof., Chair of Biology, Ecology and Biotechnology, Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, Arkhangelsk. E-mail: a.s.aksenov@narfu.ru

**Emelyanova M.V.** – Cand. Techn. Sci., Assoc. Prof., Chair of Biology, Ecology and Biotechnology, Higher School of Natural Sciences and Technologies, Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, Arkhangelsk. E-mail: m.emelyanova@narfu.ru

Цель исследования – выделение эндофитных бактерий из древесины тополя лавролистного (*Populus laurifolia* Ldb.) и тополя душистого (*Populus suaveolens* Fisch.). Задачи исследования: выделить эндофитные бактерии из древесины тополя лавролистного; выделить эндофитные бактерии из древесины тополя душистого; провести идентификацию микроорганизмов. Отбор образцов древесины проводили в начале октября стерильным возрастным буровом. Опилки древесины из центральной части ствола исследовали методом обрастания. В качестве питательной среды использовали мясо-пептонный агар. Опилки тополя лавролистного обрастали более интенсивно по сравнению с тополем душистым. Для определения ферментативной (биохимической) активности изучаемых бактерий использовали дифференциально-диагностические среды Гисса. Для изолятов бактерий была проведена идентификация путем секвенирования фрагментов гена 16S рНК. Из чистых культур исследуемых штаммов бактерий выделяли бактериальную ДНК. Фрагмент гена 16S рНК амплифицировали с использованием праймеров F27/1492R. Идентификацию бактерий осуществляли путем секвенирования соответствующих фрагментов гена 16S рНК и сравнения полученных последовательностей нуклеотидов с гомологичными из базы данных NCBI с использова-

нием программ BLAST. Из древесины тополя лавролистного выделено 4 штамма бактерий видов: *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Staphylococcus pasteurii*, *Brenneria salicis*. Из древесины тополя душистого выделено 3 штамма бактерий видов: *Bacillus safensis*, *Brenneria populi*. Штаммы видов *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Staphylococcus pasteurii* являются потенциально хозяйственно ценными видами бактерий. Изучена биохимическая активность выделенных штаммов относительно мальтозы, глюкозы, сахарозы, сорбита, маннита и лактозы.

**Ключевые слова:** бактериальные эндофиты, тополь лавролистный, тополь душистый, древесина.

The aim of the work was to isolate endophytic bacteria from the wood of the laurel poplar (*Populus laurifolia* Ldb.) and fragrant poplar (*Populus suaveolens* Fisch.). The objectives of the study were to identify endophytic bacteria from the wood of the laurel poplar; isolate endophytic bacteria from the wood of the fragrant poplar; to identify microorganisms. Wood samples were taken in early October with sterile increment borer. The wood sawdust from the central part of the trunk was investigated by the method of growth. Meat and peptone agar was used as a nutrient medium. The sawdust of the laurel poplar is overgrown with bacteria more intensive-

\*Работа выполнена при финансовой поддержке, полученной в рамках базовой части государственного задания Минобрнауки РФ № 15.8815.2017/8.9 «Молекулярно-биологические методы в биотехнологии термостабильных ферментов».

ly, in comparison with the poplar fragrant. To determine enzymatic (biochemical) activity of studied bacteria, differential-diagnostic media of Guiss were used. For isolates of bacteria the identification was carried out by sequencing fragments of the 16S rRNA gene. Bacterial DNA was isolated from the pure cultures of the bacterial strains. 16S rRNA gene fragment was amplified using primers F27 / 1492R. Identification of the bacteria was carried out by sequencing corresponding fragments of the 16S rRNA gene and comparing the resulting nucleotide sequences with homologous ones from the NCBI database using BLAST programs. Four species strains of *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Staphylococcus pasteurii* and *Brenneria salicis* have been isolated from laurel poplar wood. Three species strains of *Bacillus safensis*, *Brenneria populi* were isolated from fragrant poplar wood. The strains of the species *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Staphylococcus pasteurii* are potentially economically valuable species of bacteria. Biochemical activity of isolated strains with the respect to maltose, glucose, sucrose, sorbitol, mannitol, and lactose was studied.

**Keywords:** bacterial endophytes, laurel poplar, fragrant poplar, wood.

**Введение.** Тополь – самая высокопродуктивная порода. Насаждения тополя накапливает в 2–3 раза больше запас древесины за более короткий срок (в 2–3 раза), чем насаждения других древесных пород [1]. Интенсивность жизнедеятельности тополей выше, чем у других древесных пород [2]. Выявление факторов, обуславливающих высокую резистентность, регенеративную способность и жизненность тополей, позволило бы рационально использовать древесные ресурсы и повысить продуктивность северных фитоценозов.

Высокие жизненные характеристики растений могут быть обусловлены ассоциативными отношениями с эндофитными микроорганизмами [3]. Свойства микроорганизмов, заселяющих ткани различных растений, могут сильно отличаться [4]. Ряд ученых выделяли эндофитные бактерии из тополей [5, 6]. Но даже условия выращивания их влияют на состав эндофитного сообщества [6]. Поэтому большой интерес представляет изучение эндофитов, присутствующих в растениях, с целью их возможного последующего использования в целях повышения продуктивности растений и защиты их от патогенов.

**Цель исследования:** выделение эндофитных бактерий из древесины тополя лавролистного и тополя душистого.

**Задачи исследования:** выделить эндофитные бактерии из древесины тополя лавролистного; вы-

делить эндофитные бактерии из древесины тополя душистого; провести идентификацию микроорганизмов.

**Методика исследования.** Исследование проводили в г. Архангельске. Для отбора образцов древесины с целью выделения эндофитных микроорганизмов выбирали противоположные по регенеративным способностям древесные виды: тополь лавролистный (*Populus laurifolia* Ldb.) и тополь душистый (*Populus suaveolens* Fisch.). Отбор образцов проводили в начале октября у кронированных без внешних признаков патологий и отсутствием стволовой гнили деревьев тополя лавролистного и тополя душистого в рядовых посадках вдоль Ленинградского проспекта в двукратной повторности. Небольшой участок ствола дерева зачищали от коры, обрабатывали спиртом. Высверленные стерильным возрастным буром из ствола дерева керны в буре помещали в стерильный пакет и доставляли в лабораторию. Кусочки древесины из центральной части ствола полоскали сначала в спирте, а затем дважды в дистиллированной воде. Вода после второго полоскания проверялась на наличие бактерий. Опилки получали из центральной части кусочков керна. Опилки исследовали методом обростания. В качестве питательной среды использовали мясо-пептонный агар. Посевы выдерживали в термостате в течение 3-10 суток при температуре 26–28 °С.

Для определения ферментативной (биохимической) активности изучаемых бактерий использовали дифференциально-диагностические среды Гисса. В качестве таких сред выбрали полужидкие среды Гисса, основу которых составляют мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясо-пептонный агар (МПА), а также в состав входят углеводов и индикатор. Исходная установка pH среды – слабощелочная (7,2–7,4). Чистую культуру исследуемых микроорганизмов засеивали петлей в среды малого ряда сред Гисса, который включает мальтозу, глюкозу, сахарозу, сорбит, маннит и лактозу. Посевы инкубировали при 27 °С в течение 48 ч.

Для изолятов бактерий была проведена идентификация путем секвенирования фрагментов гена 16S рРНК и сравнения полученных последовательностей нуклеотидов с гомологичными из базы данных NCBI с использованием программ BLAST.

**Результаты исследования.** Во всех случаях при высеве опилок на питательную среду отмечалось обростание их бактериальной массой. Опилки тополя лавролистного обрастают более интенсивно по сравнению с тополем душистым (рис.).



Рис. 1. Выделение бактерий поверхностным методом культивирования: А – древесина тополя лавролистного; Б – древесина тополя душистого

Из древесины тополя лавролистного выделено 4 штамма бактерий, тополя душистого – 2 штамма бактерий. Из них идентифицированы изоляты, относящиеся к семействам *Bacillaceae*, *Staphylococcaceae* и *Enterobacteriaceae*, в первом случае – к ро-

дам *Bacillus* и *Lysinibacillus*, во втором – *Staphylococcus*, в третьем – *Brenneria*. Характеристика биохимической активности отдельных штаммов представлена в таблице.

**Биохимическая активность бактерий-ассоциантов древесины стволов тополей**

Микроорганизм	Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Сорбит	Мальтоза	Маннит
Тополь лавролистный						
<i>Bacillus pumilus</i>	+	-	-	-	++	-
<i>Brenneria salicis</i>	±	±	±	-	+	±
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	±	-	-	-	+	-
Тополь душистый						
<i>Bacillus safensis</i>	±	-	±	-	-	-
<i>Brenneria populi</i>	++	+	++	-	++	+

Примечание: «+» – присутствует; «-» – отсутствует; «±» – переменная активность.

Одним из наиболее привлекательных объектов для промышленного производства препаратов, активно используемых в сельскохозяйственной практике, являются штаммы бактерий рода *Bacillus* [7]. Данная группа бактерий представляет интерес для создания препаратов для очистки стоков и почв [8, 9].

Вторичные метаболиты штамма *Bacillus pumilus* эффективно подавляют рост патогенов, вызывающих рак тополя, а также способствуют стимулированию роста и активности фотосинтеза [10]. Штаммы вида *Bacillus pumilus* синтезируют антибиотик [11], проявляют антагонистическую активность в отношении фитопатогенных бактерий [12]. Штаммы вида *Bacillus pumilus* характеризуются противогрибковой активностью [13], что позволяет использовать их для создания противогрибковых средств [4, 13], например, в биопрепаратах: YieldShield – против почвен-

ных грибных патогенов [4]; Ballad – для борьбы с корневой гнилью, ржавчиной, пятнистостью и плесенью [11]. *Bacillus safensis* влияет на рост растений в связи с синтезом растительных гормонов [14], обладает антимикробной активностью [15]. *Staphylococcus* – эндофитные бактерии тополя [16], стимулирующие рост растений [17]. Штаммы вида *Lysinibacillus fusiformis* проявляют антибактериальную активность [12] и потенциально могут использоваться в биоремедиации [18]. Штаммы видов *Brenneria populi* и *Brenneria salicis* являются патогенами для древесных растений [19]. Однако *Brenneria salicis* встречается как эндофит и под влиянием внешних факторов переходит от эндофитного к патогенному образу жизни [20].

**Выводы.** Из древесины тополя лавролистного выделено 4 штамма бактерий видов: *Bacillus*

*pumilus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Staphylococcus pasteurii*, *Brenneria salicis*. Из древесины тополя душистого выделено 2 штамма бактерий видов: *Bacillus safensis*, *Brenneria populi*. Штаммы видов *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Staphylococcus pasteurii* являются потенциально хозяйственно полезными, так как способны синтезировать растительные гормоны и применяться в биопрепаратах для защиты растений.

### Литература

1. Бакулин В.Т. Особенности анатомического строения древесины тополя белого, произрастающего в Западной Сибири // Научные ведомости. Сер. «Естественные науки». – 2012. – Т. 18, № 3 (122). – С. 5–14.
2. Иванников С.П. Тополь. – М.: Лесн. пром-сть, 1980. – 82 с.
3. Цавкелова Е.А., Чердынцева Т.А., Непрусов А.И. Образование ауксинов бактериями, ассоциированными с корнями орхидей // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 1. – С. 55–62.
4. Максимов И.В., Абизгильдина Р.Р., Пусенкова Л.И. Стимулирующие рост растений микроорганизмы как альтернатива химическим средствам защиты от патогенов (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, № 4. – С. 373–385.
5. Taghavi S., Barac T., Greenberg B., Borremans B., Vangronsveld J., van der Lelie D. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – № 71. – P. 8500–8505.
6. Lelie D. van der, Taghavi S., Monchy S., Schwender J., Miller L., Ferrieri R., Rogers A., Wu X., Zhu W., Weyens N., Vangronsveld J., Newman L. Poplar and its Bacterial Endophytes: Coexistence and Harmony // Plant Science. – 2009. – № 28. – P. 346–358.
7. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus Cohn*. в агроэкосистемах. – М.: Наука, 2007. – 147 с.
8. Margesin R., Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology // Extremophiles. – 2001. – Vol. 5. – P. 73–83.
9. Zhuang W.Q., Tay J.-H., Maszenan A.M., Tay S.T.L. *Bacillus naphthalinovorans* sp. nov. from oil-contaminated tropical marine sediments and its role in naphthalene biodegradation // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 58. – P. 547–553.
10. Ren J.-H., Li H., Wang Y.-F., Wu X.-Q. Biocontrol potential of an endophytic *Bacillus pumilus* JK-SX001 against poplar canker // Biological Control – 2013. – № 67 (3). – P. 421–430.
11. Cawoy H., Bettiol W., Fickers P., Ongena M. *Bacillus* – Based Biological Control of Plant Diseases // Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management. – Rijeka: INTECH, 2011. – P. 273–302.
12. Марданова А.М., Лутфуллин М.Т., Шалавина М.А. и др. Поиск и выделение новых штаммов бактерий-антагонистов фитопатогенных микромицетов рода *Fusarium* // Биоразнообразие и экология грибов и грибоподобных организмов северной Евразии: мат-лы всерос. конф. с междунар. участием. – Екатеринбург: Изд-во Урал. гос. ун-та, 2015. – С. 149–150.
13. Mayer F., Kronstad J.W. Breaking the bad: *Bacillus* blocks fungal virulence factors // Microbial Cell. – 2017. – № 4 (11). – P. 384–386.
14. Kothari V.V., Kothari R.K., Kothari C.R., Bhatt V.D., Nathani N.M., Koringa P.G., Joshi C.G., Vyas B.R.M. Genome sequence of salt-tolerant *Bacillus safensis* strain vk, isolated from saline desert area of Gujarat, India // Genome Announcements. – 2013. – № 1 (5). – P. e00671–e00683.
15. Kakade P.D., Chaphalkar S.R. Isolation and purification of antibacterial peptide from *Bacillus safensis* endophytic bacteria from *Anthocephalus kadamba* // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2017. – Vol. 6, № 1. – P. 504–511.
16. Moore F.P., Barac T., Borremans B., Oeyen L., Vangronsveld J., van der Lelie D., Campbell C.D., Moore E.R.B. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterization of isolates with potential to enhance phytoremediation // Syst Appl Microbiol. – 2012. – № 29. – P. 539–594.
17. Suhandono S., Kusumawardhani M.K., Aditiawati P. Isolation and molecular identification of endophytic bacteria from rambutan fruits (*Nephelium lappaceum* L.) cultivar binjai // HAYATI Journal of Biosciences. – 2016. – № 23. – P. 39–44.
18. Mehta J., Dilbaghi N., Dudeja S.S., Yadav A., Sharma P. Decolourization of simulated dye in aqueous medium using bacterial strains // European Journal of Advances in Engineering and Technology. – 2015. – № 2 (3). – P. 9–18.
19. Черпаков В.В. Болезнь водяных знаков («Watermark») на ивах (*Salix* spp.) в России // Актуальные проблемы лесного комплекса. – 2015. – № 43. – С. 111–118.
20. Stefansson J. Screening for the occurrence of *Brenneriasalicis* in willows in Skåne, Sweden. – Alnarp: Swedish University of Agricultural Sciences, 2013. – 14 p.

Literatura

1. *Bakulin V.T.* Osobnosti anatomicheskogo stroenija drevesiny topolja belogo, proizrastajushhego v Zapadnoj Sibiri // Nauchnye vedomosti. Ser. «Estestvennye nauki». – 2012. – T. 18, № 3 (122). – S. 5–14.
2. *Ivannikov S.P.* Topol'. – M.: Lesn. prom-st', 1980. – 82 s.
3. *Cavkelova E.A., Cherdynceva T.A., Netrusov A.I.* Obrazovanie auksinov bakterijami, asociirovannymi s kornjami orhidej // Mikrobiologija. – 2005. – T. 74, № 1. – S. 55–62.
4. *Maksimov I.V., Abizgil'dina R.R., Pusenkova L.I.* Stimulirujushhie rost rastenij mikroorganizmy kak al'ternativa himicheskim sredstvam zashhity ot patogenov (obzor) // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija. – 2011. – T. 47, № 4. – S. 373–385.
5. *Taghavi S., Barac T., Greenberg B., Borremans B., Vangronsveld J., van der Lelie D.* Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – № 71. – R. 8500–8505.
6. *Lelie D. van der, Taghavi S., Monchy S., Schwender J., Miller L., Ferrieri R., Rogers A., Wu X., Zhu W., Weyens N., Vangronsveld J., Newman L.* Poplar and its Bacterial Endophytes: Coexistence and Harmony // Plant Science. – 2009. – № 28. – R. 346–358.
7. *Melent'ev A.I.* Ajerobnye sporoobrazujushhie bakterii *Bacillus* Cohn. v agrojekosistemah. – M.: Nauka, 2007. – 147 s.
8. *Margesin R., Schinner F.* Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology // Extremophiles. – 2001. – Vol. 5. – P. 73–83.
9. *Zhuang W.Q., Tay J.-H., Maszenan A.M., Tay S.T.L.* *Bacillus naphthalinovorans* sp. nov. from oil-contaminated tropical marine sediments and its role in naphthalene biodegradation // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 58. – P. 547–553.
10. *Ren J.-H., Li H., Wang Y.-F., Wu X.-Q.* Biocontrol potential of an endophytic *Bacillus pumilus* JK-SX001 against poplar canker // Biological Control – 2013. – № 67 (3). – P. 421–430.
11. *Cawoy H., Bettiol W., Fickers P., Ongena M.* Bacillus – Based Biological Control of Plant Diseases // Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management. – Rijeka: INTECH, 2011. – P. 273–302.
12. *Mardanov A.M., Lutfullin M.T., Shalavina M.A.* i dr. Poisk i vydelenie novyh shtammov bakterij-antagonistov fitopatogennyh mikromicetov roda *Fusarium* // Bioraznoobrazie i jekologija gribov i gribopodobnyh organizmov severnoj Evrazii: matly vseros. konf. s mezhdunar. uchastiem. – Ekaterinburg: Izd-vo Ural. gos. un-ta, 2015. – S. 149–150.
13. *Mayer F., Kronstad J.W.* Breaking the bad: *Bacillus* blocks fungal virulence factors // Microbial Cell. – 2017. – № 4 (11). – P. 384–386.
14. *Kothari V.V., Kothari R.K., Kothari C.R., Bhatt V.D., Nathani N.M., Koringa P.G., Joshi C.G., Vyas B.R.M.* Genome sequence of salt-tolerant *Bacillus safensis* strain vk, isolated from saline desert area of Gujarat, India // Genome Announcements. – 2013. – № 1 (5). – P. e00671–e00683.
15. *Kakade P.D., Chaphalkar S.R.* Isolation and purification of antibacterial peptide from *Bacillus safensis endophytica* bacteria from *Anthocephalus kadamba* // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2017. – Vol. 6, № 1. – P. 504–511.
16. *Moore F.P., Barac T., Borremans B., Oeyen L., Vangronsveld J., van der Lelie D., Campbell C.D., Moore E.R.B.* Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterization of isolates with potential to enhance phytoremediation // Syst Appl Microbiol. – 2012. – № 29. – P. 539–594.
17. *Suhandono S., Kusumawardhani M.K., Aditiawati P.* Isolation and molecular identification of endophytic bacteria from rambutan fruits (*Nephelium lappaceum* L.) cultivar binjai // HAYATI Journal of Biosciences. – 2016. – № 23. – P. 39–44.
18. *Mehta J., Dilbaghi N., Dudeja S.S., Yadav A., Sharma P.* Decolourization of simulated dye in aqueous medium using bacterial strains // European Journal of Advances in Engineering and Technology. – 2015. – № 2 (3). – P. 9–18.
19. *Cherpakov V.V.* Bolezn' vodjanyh znakov («Watermark») na ivah (*Salix* spp.) v Rossii // Aktual'nye problemy lesnogo kompleksa. – 2015. – № 43. – S. 111–118.
20. *Stefansson J.* Screening for the occurrence of Brenneriasalicis in willows in Skåne, Sweden. – Alnarp: Swedish University of Agricultural Sciences, 2013. – 14 p.