



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



ВЛИЯНИЕ ЛЕТУЧИХ СОЕДИНЕНИЙ БАКТЕРИЙ РОДА *JANTHINOBACTERIUM* НА РАЗВИТИЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Галимзянова Н.Ф.*, Гильванова Е.А.,
Мильман П.Ю., Бойко Т.Ф., Кузьмина Л.Ю.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

*E-mail: galnailya@yandex.ru

Пигментпродуцирующие штаммы IB-ST-GO, IB-ST-RHF, IB-ST-GOLI, выделенные из водосбора спелеосистемы Шульган-Таш, с помощью метода секвенс-анализа гена 16S рРНК были отнесены к кладе *Janthinobacterium lividum* с уровнем сходства 99.7-99.8%. Проведена оценка влияния бактерий на развитие фитопатогенных грибов *Fusarium oxysporum* и *Rhizoctonia solani* контактным и бесконтактным способом. Среди изученных бактерий, штамм IB-ST-GO показал антигрибную активность, проявляющуюся в угнетении развития воздушного мицелия грибов (на 38% для *F. oxysporum*, 55% для *R. solani*) за счет образования летучих метаболитов.

Ключевые слова: *Janthinobacterium lividum* ♦ летучие метаболиты ♦ фитопатогенные грибы ♦ ингибирование роста

INFLUENCE OF VOLATILE COMPOUNDS OF BACTERIA OF THE GENUS *JANTHINOBACTERIUM* ON THE DEVELOPMENT OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Galimzianova N.F.*, Gilvanova E.A.,
Milman P.Yu., Boyko T.F., Kuzmina L.Yu.

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

*E-mail: galnailya@yandex.ru

Pigment-producing strains IB-ST-GO, IB-ST-RHF, IB-ST-GOLI isolated from the Shulgan-Tash speleosystem catchment were assigned to the *Janthinobacterium lividum* clade with a similarity level of 99.7-99.8% using the 16S rRNA gene sequence analysis method. The bacterial influence on the development of phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* by contact and non-contact methods was evaluated. Among the studied bacteria, the strain IB-ST-GO showed antifungal activity, manifested in inhibition of the development of the aerial mycelium of fungi (by 38% for *F. oxysporum*, 55% for *R. solani*) due to the formation of volatile metabolites.

Keywords: *Janthinobacterium lividum* ♦ volatile metabolites ♦ phytopathogenic fungi ♦ growth inhibition

Поступила в редакцию: 28.04.2023

[Цитировать | Cite as](#)

[DOI: 10.31163/2618-964X-2023-6-2-91-96](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-2-91-96)

[EDN: YDECPC](#)



ВВЕДЕНИЕ

Бактерии рода *Janthinobacterium* широко распространены в природе, они обнаружены в водоемах, почве, ризоплане и ризосфере растений. Обычно их выделяли из лесных почв, антарктических ледников, озерной и речной воды [Shivaji et al., 1991; Munakata et al., 2022; Oh et al., 2019; Xia et al., 2021; Gupta et al., 2022]. Существовая в природе в условиях постоянной конкуренции, микроорганизмы выработали множество способов реализации механизмов взаимодействий. Одним из возможных защитных механизмов янтинобактерий является синтез природного фиолетового пигмента – виолацеина. Известно, что род *Janthinobacterium* продуцирует различные пигменты такие как виолацеин [Pantanella et al., 2006], пурпурно-фиолетовый [Mojib et al., 2010] и голубовато-фиолетовый пигменты [Shirata et al., 2000]. Помимо пигментов янтинобактерии синтезируют противогрибковые метаболиты, такие как продигиозин [Schloss et al., 2010] и пептидно-лактонные антибиотики джантиноцин А, В и С [Johnson et al., 1990]. Также обнаружено, что бактерии этого рода способны ограничивать рост фитопатогенных грибов *Aspergillus unguis* и *Alternaria*

brassicicicola [Lyakhovchenko et al., 2021, 2023] в том числе и за счет образования широкого спектра летучих соединений [Tyc et al., 2015].

Целью настоящей работы является изучение влияния бактерий рода *Janthinobacterium* на развитие фитопатогенных грибов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из водных объектов спелеосистемы пещеры Шульган-Таш были выделены пигментпродуцирующие штаммы бактерий IB-ST-GO (UIB-91), IB-ST-RHF (UIB-94), IB-ST-GOLI (UIB-95), которые методом сиквенс-анализа гена 16S рНК были отнесены к кладу *Janthinobacterium lividum* с уровнем сходства генетического маркера 99.7-99.8%. Прочитанные последовательности гена 16S рНК штаммов доступны в Генбанке (NCBI) под номерами OQ143958, OQ874825 и OQ874821. Штаммы поддерживаются в коллекции УИБ УФИЦ РАН. Методом спектрального анализа подтверждено, что новые штаммы способны образовывать пигмент, относящийся к семейству виолацеинов, который обладает антибактериальной активностью [Milman et al., 2023].

Культивирование штаммов IB-GO, IB-GOLI и IB-RHF осуществляли в жидких питательных средах R2A («Himedia», Индия) и триптон-соевой 1/10 TSB, г/л: триптон – 1.5, соевый пептон – 0.5, NaCl – 0.5 («Himedia», Индия). В качестве посевного материала использовали 48 - часовую культуру микроорганизмов. Выращивание бактерий проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 60 мл среды 1/10 TSB, на шейкере-инкубаторе Innova 40R («New Brunswick Scientific», USA) при 140 об/мин при температуре 24 °C и pH 7.3-7.5. Культивирование бактерий на каждом варианте питательной среды было выполнено в трехкратной повторности.

В качестве тест-объектов использовали штаммы фитопатогенных грибов *Fusarium oxysporum* (UIB-F-15, VKM-F-137) и *Rhizoctonia solani* (UIB-F-38, VKM-F-895) из коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН.

Изучение влияния культуральной жидкости (КЖ) исследуемых штаммов на развитие тест-культур грибов проводили методом лунок. Тест-объекты выращивали на среде картофельно-глюкозный агар (КГА) в течение 7 суток [Сэги и др., 1983]. В стерильной воде готовили суспензию спор (в случае *R. solani* – хламидоспор) плотностью 10⁴ КОЕ/мл. Анализ проводили в чашках Петри с 20 мл КГА. Поверхность среды засеивали суспензией спор тест-культуры, внося по 100 мкл в каждую чашку. В чашках, засеянных грибом, стерильным сверлом вырезали по 4 лунки, куда помещали по 100 мкл КЖ исследуемого штамма бактерий или бесклеточного супернатанта. Бесклеточный супернатант получали путем центрифугирования КЖ при 10000 об/мин в течение 5 мин на центрифуге Centrifuge CM-50 («ELMI», Латвия). Контролем служили чашки без внесения КЖ штамма. Чашки помещали в термостат при 28 °C на 7 суток.

Бактериальный рост оценивали по оптической плотности КЖ при 600 нм (ОП₆₀₀), измеренной на спектрофотометре СФ-56 («ЛОМО-Спектр», Россия).

Анализ влияния летучих метаболитов на развитие тест-объектов проводили в соответствии с методикой, описанной в статье Garbeva с соавторами [Garbeva et al., 2014] с модификациями. На крышку чашки Петри наносили 12.5 мл стерильного водного агара (20 г агара на 1 л водопроводной воды), после застывания посередине инокулировали тест-культурой, помещая в лунку диаметром 7 мм диск того же диаметра с мицелием, вырезанный из колонии гриба, выращенного в течение 7 суток на среде КГА. На дно чашки наливали

20 мл агаризованной среды 1/10 TSA, засеивали газоном штамма *J. lividum* IB-ST-GO, выбранный по результатам предыдущего опыта, внося 100 мкл суспензии клеток плотностью 10^7 КОЕ/мл. Таким образом, микроорганизмы выращивали без физического контакта между колониями. Чашку запечатывали двойным слоем фум-ленты и инкубировали при 25 °С в течение 5 суток. Контролем служили чашки, подготовленные аналогичным образом, но без посева бактерии. При оценке роста грибов предварительно удаляли центральные диски с мицелием, затем агар с крышки помещали в стаканчик с водой, нагревали до растворения среды, процеживали через капроновый фильтр. Затем фильтр промывали 3-4 раза дистиллированной водой, нагретой до 80 °С. После промывания, фильтры помещали на фильтровальную бумагу для удаления воды. Затем фильтры переносили в эксикатор с силикагелем для высушивания до постоянного веса. Для каждого варианта опыта использовали по пять фильтров.

Статистическую обработку данных осуществляли, используя программу Origin 7.0 (Origin Lab Corp., США). Достоверность различий опытных вариантов от контрольных оценивали с помощью критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными при критерии вероятности $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для предварительного выявления антигрибной активности выделенных бактерий было отобрано три варианта штаммов с отличающейся морфологией колоний и разным уровнем секреции сине-фиолетового пигмента. Штаммы IB-ST-RHF и IB-ST-GOLI имели плоский морфотип колоний, а также характер секреции и цвета пигмента – вариабельный сегментарный светло-фиолетовый у первого, и равномерный серо-сиреневый у второго (рис. 1в и 1б). Штамм IB-ST-GO образовывал мощную складчатую пленку темно-фиолетового цвета при росте на богатых средах (рис. 1а), а пигмент синтезировал на обеих средах, R2A и LB. Штаммы IB-ST-GOLI и IB-ST-RHF не продуцировали пигмент на бедной среде R2A, но активно его образовали на среде LB.

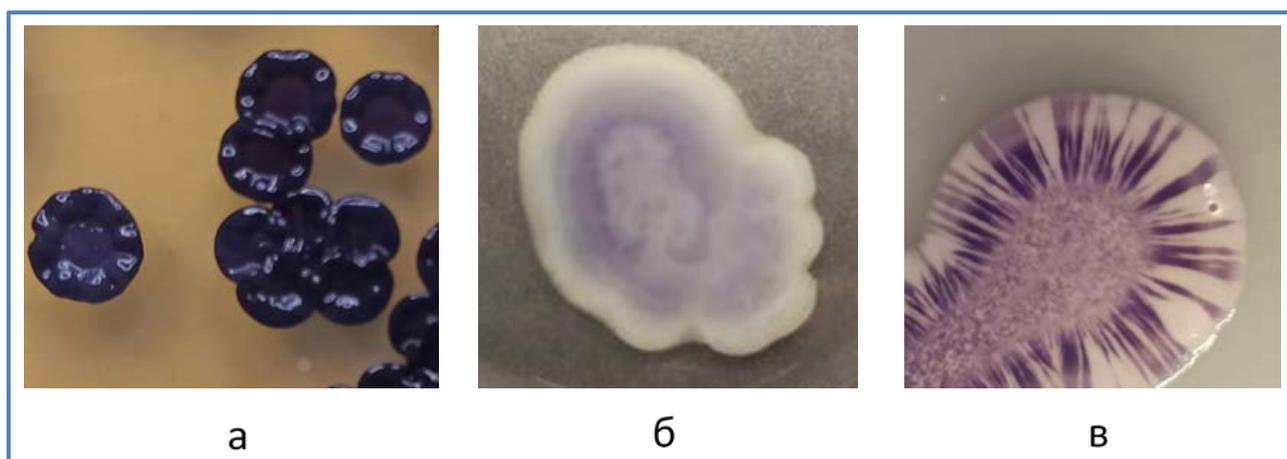


Рис. 1. Морфологические особенности штаммов *J. lividum* IB-ST-GO (а), IB-ST-GOLI (б) и IB-ST-RHF (в) на среде LB.

При оценке влияния культуральной жидкости штаммов и бесклеточной КЖ на развитие тест-объектов не было получено однозначного результата. Однако можно отметить, что при совместном развитии гриба и бактерии IB-ST-GO (супернатанта) наблюдается

визуально заметное угнетение формирования воздушного мицелия, особенно заметное в случае *F. oxysporum* (рис. 2б).

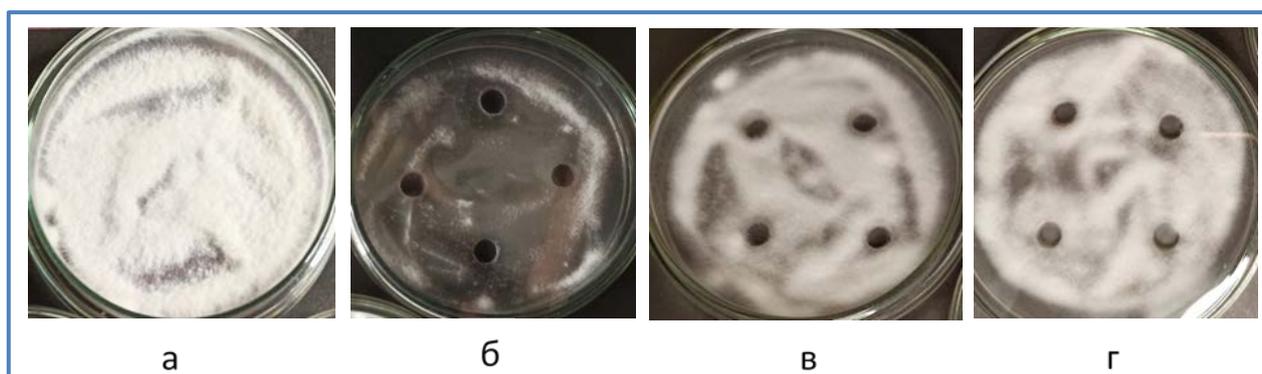


Рис. 2. Влияние бесклеточной культуральной жидкости на развитие *F. oxysporum*. а - контроль; б - IB-ST-GO; в - IB-ST-GOLI; г - IB-ST-RHF.

Полученные данные показывают, что бактериальное воздействие на грибы осуществляется не только через метаболиты бактерии, попадающие в среду культивирования, но и посредством их летучих компонентов, поскольку угнетение мицелия наблюдали не только около лунок, но и по всей поверхности чашек. Согласно литературным данным, бактерии рода *Janthinobacterium* способны подавлять развитие грибов *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium culmorum* за счет летучих метаболитов [Garbeva et al., 2014].

В эксперименте по оценке влияния летучих метаболитов изучаемого штамма IB-ST-GO было установлено, что происходило существенное замедление роста грибов, достигающее 38% в случае *F. oxysporum* и 55% для *R. solani* (рис. 3). Следует отметить, что в эксперименте моделируются условия, формирующиеся в почве – олиготрофность, отсутствие физического контакта между микроорганизмами.

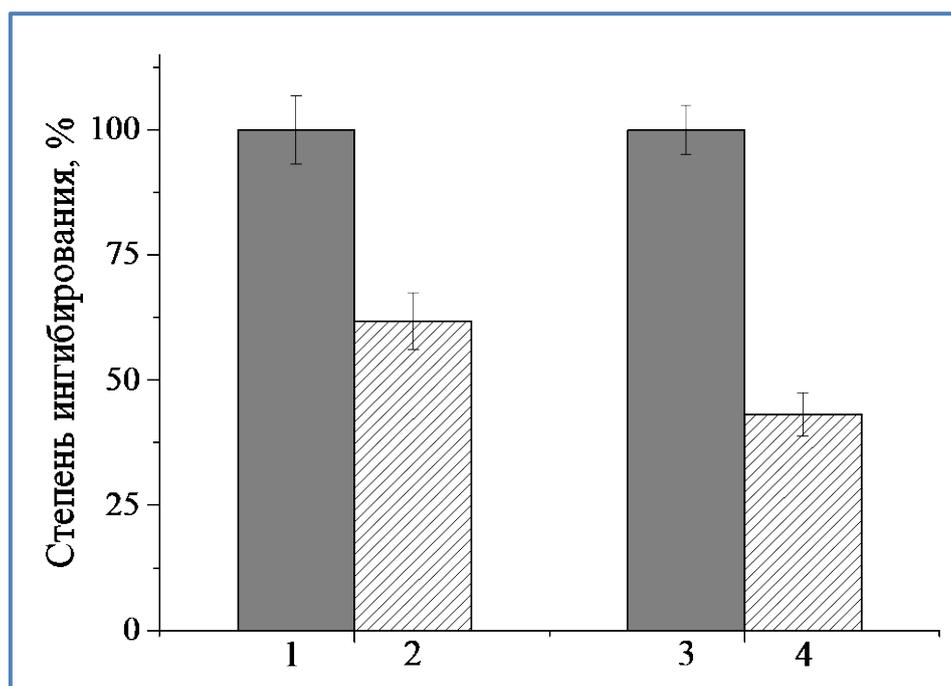


Рис. 3. Ингибирование роста *F. oxysporum* и *R. solani* летучими метаболитами *J. lividum* IB-ST-GO (1 - *F. oxysporum* - контроль, 2 - рост *F. oxysporum* в присутствии бактерии, 3 - *R. solani* - контроль, 4 - рост *R. solani* в присутствии бактерии).

Как сообщалось ранее, некоторые летучие метаболиты бактерий могут действовать как ингибирующие рост микромицетов токсичные агенты [Kim et al., 2013; Peñuelas et al., 2014]. Методом масс-спектропии Schulz-Bohm с соавторами провели анализ летучих соединений, выделяемых бактериями рода *Janthinobacterium* и обнаружили присутствие альдегидов, сложных эфиров, фенольных соединений, ароматических и сероорганических соединений [Schulz-Bohm et al., 2015]. Более 50% выявленных соединений содержат хотя бы один атом серы в своем составе. Известно, что антигрибная активность серосодержащих соединений обусловлена продуктами восстановления или окисления серы, которые приводят к нарушению метаболизма микромицетов, вызывая их гибель [Lamberth et al., 2014]. Вероятно, противогрибная активность штамма IB-ST-GO связана с выделением серосодержащих летучих соединений, что требует дополнительных исследований.

Таким образом, показано, что штамм *J. lividum* IB-ST-GO способен существенно подавлять развитие фитопатогенных грибов *F. oxysporum* и *R. solani* за счет продукции летучих метаболитов, что позволяет рассматривать его как перспективный агент для создания биофунгицидов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России по теме № 220131100163-4 «Межвидовые взаимодействия в микробных сообществах и растительно-микробных ассоциациях естественных и техногенных экосистем (генетические, биохимические и биотехнологические аспекты).

При проведении исследований использовали оборудование ЦКП "Агидель" УФИЦ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. – М.: Колос, 1983. 296 с.
2. Garbeva P., Hordijk C., Gerards S., et al. Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas* // FEMS Microbiol Ecol. 2014. V. 87. P. 639–649. DOI: [10.1111/1574-6941.12252](https://doi.org/10.1111/1574-6941.12252)
3. Gupta V., Chandran S., Deep A., et al. Environmental factors affecting the diversity of psychrophilic microbial community in the high altitude snow-fed lake Hemkund, India // Curr Res Microb Sci. 2022. V. 3. P. 100126. DOI: [10.1016/j.crmicr.2022.100126](https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100126)
4. Johnson J.H., Tymiak A.A., Bolgar M.S. Janthinocins A, B and C, novel peptide lactone antibiotics produced by *Janthinobacterium lividum*. II. Structure elucidation // J Antibiot (Tokyo). 1990. V. 43. P. 920–930.
5. Kim K.S., Lee S., Ryu C.M. Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance // Nat. Commun. 2013. V. 4. 1809. DOI: [10.1038/ncomms2789](https://doi.org/10.1038/ncomms2789)
6. Lamberth C., Walter H., Kessabi F.M., et al. The significance of organosulfur compounds in crop protection: current examples from fungicide research // Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. 2014. V. 190(8). P. 1225–1235. DOI: [10.1080/10426507.2014.984033](https://doi.org/10.1080/10426507.2014.984033)
7. Lyakhovchenko N., Efimova V., Seleznev A., et al. Antifungal activity of gram-negative pigment-forming bacteria against *Aspergillus unguis* // BIO Web of Conferences 57. 2023. DOI: [10.1051/bioconf/20235706003](https://doi.org/10.1051/bioconf/20235706003)

8. Lyakhovchenko N.S., Nikishin I.A., Gubina E.D., et al. Assessment of the antifungal activity of the violacein-forming strain *Janthinobacterium* sp. B-3515 against the mould fungus *Alternaria brassicicola* F-1864 // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 908. 2021. DOI: [10.1088/1755-1315/908/1/012006](https://doi.org/10.1088/1755-1315/908/1/012006)
9. Milman P.Yu., Gilvanova E.A., Kuzmina L.Yu., et al. Antibacterial effect of pigments of the genus *Janthinobacterium* // Izvestia Ufimskogo Nauchnogo Tsentra RAN. 2023. № 1. P. 97–103. DOI: [10.31040/2222-8349-2023-0-1-97-103](https://doi.org/10.31040/2222-8349-2023-0-1-97-103)
10. Mojib N., Philpott R., Huang J.P., et al. Antimycobacterial activity in vitro of pigments isolated from Antarctic bacteria // Antonie van Leeuwenhoek. 2010. V. 98. P. 531–540. DOI: [10.1007/s10482-010-9470-0](https://doi.org/10.1007/s10482-010-9470-0)
11. Munakata Y., Heuson E., Daboudet T., et al. Screening of antimicrobial activities and lipopeptide production of endophytic bacteria isolated from vetiver roots // Microorganisms. 2022. V. 10(2). P. 209. DOI: [10.3390/microorganisms10020209](https://doi.org/10.3390/microorganisms10020209)
12. Oh W.T., Giri S.S., Yun S., et al. *Janthinobacterium lividum* as an emerging pathogenic bacterium affecting rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fisheries in Korea // Pathogens. 2019. V. 8. P. 146. DOI: [10.3390/pathogens8030146](https://doi.org/10.3390/pathogens8030146)
13. Pantanella F., Berlutti F., Passariello C., et al. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum* // J. Appl. Microbiol. 2006. V. 102. P. 992–999. DOI: [10.1111/j.1365-2672.2006.03155.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03155.x)
14. Peñuelas J., Asensio D., Tholl D., et al. Biogenic volatile emissions from the soil // Plant Cell Environ. 2014. V. 37. P. 1866–1891. DOI: [10.1111/pce.12340](https://doi.org/10.1111/pce.12340)
15. Schloss P.D., Allen H.K., Klimowicz A.K., et al. Psychrotrophic strain of *Janthinobacterium lividum* from a cold alaskan soil produces prodigiosin // DNA and cell biology. 2010. V. 29 (9). P. 533–541. DOI: [10.1089/dna.2010.1020](https://doi.org/10.1089/dna.2010.1020)
16. Schulz-Bohm K., Zweers H., de Boer W., et al. A fragrant neighborhood: volatile mediated bacterial interactions in soil // Front. Microbiol. 2015. V. 6. DOI: [10.3389/fmicb.2015.01212](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01212)
17. Shirata A., Tsukamoto T., Yasui H., Hata T., Hayasaka S., et al. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing // Jap Agric Res Q. 2000. V. 34 (2). P. 131–140.
18. Shivaji S., Ray M.K., Kumar G.S., et al. Identification of *Janthinobacterium lividum* from the soils of the islands of Scotia Ridge and from Antarctic peninsula // Polar Biol. 1991. V. 11. P. 267–271. DOI: [10.1007/BF00238461](https://doi.org/10.1007/BF00238461)
19. Tyc O., Zweers H., de Boer W., et al. Volatiles in inter-specific bacterial interactions // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 1412. DOI: [10.3389/fmicb.2015.01412](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01412)
20. Xia Q., Rufty T., Shi W. Predominant microbial colonizers in the root endosphere and rhizosphere of turfgrass systems: *Pseudomonas veronii*, *Janthinobacterium lividum*, and *Pseudogymnoascus* spp. // Front. Microbiol. 2021. V. 12. P. 643904. DOI: [10.3389/fmicb.2021.643904](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643904)

Цитировать как

Галимзянова Н.Ф., Гильванова Е.А., Мильман П.Ю., Бойко Т.Ф., Кузьмина Л.Ю. Влияние летучих соединений бактерий рода *Janthinobacterium* на развитие фитопатогенных грибов // Экобиотех, 2023, Т. 6 № 2. С. 91-96. DOI: [10.31163/2618-964X-2023-6-2-91-96](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-2-91-96). EDN: YDECP

Cited as

Galimzianova N.F., Gilvanova E.A., Milman P.Yu., Boyko T.R., Kuzmina L.Yu. Influence of volatile compounds of bacteria of the genus *Janthinobacterium* on the development of phytopathogenic fungi. *Ėkobioteh*. 2023. V. 6 (2). P. 91-96. DOI: [10.31163/2618-964X-2023-6-2-91-96](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-2-91-96). EDN: YDECP (In Rus.)