



# ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>


## РОСТСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ *ENTEROBACTER LUDWIGII* BLK ПРИ ОПТИМИЗАЦИИ СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Четвериков С.П.\*, Тимергалин М.Д.,  
Феоктистова А.В., Стариков С.Н.,  
Кенджијева А.А., Худайгулов Г.Г., Бакаева М.Д.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального  
исследовательского центра РАН, Уфа, Россия  
\*E-mail: [chelab007@yandex.ru](mailto:chelab007@yandex.ru)

Предложен подход к оптимизации культивирования *Enterobacter ludwigii* BLK и обработки растений пшеницы препаратом на его основе. Снижение концентрации и частичная замена пептона в культуральной среде на альтернативный источник содержания азота – экстракт дрожжей, удешевлял производство препарата без снижения его эффективности. Показано, что препарат, произведенный в условиях модифицированной среды, активировал рост корней и способствовал накоплению хлорофилла в листьях мягкой пшеницы. Стимулирующий эффект был более выражен при сочетании предпосевной и послевсходовой обработки.

**Ключевые слова:** *Enterobacter ludwigii* BLK ♦ оптимизация культивирования ♦ PGPB ♦ культуральная среда ♦ ИУК

Поступила в редакцию: 17.05.2024

[Цитировать | Cite as](#)

DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-2-86-91](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-2-86-91)

EDN: [KVVJYV](https://www.edn.ru/KVVJYV)

## ВВЕДЕНИЕ

Биологические препараты – регуляторы роста растений на основе ризосферных бактерий все чаще используются в сельском хозяйстве для повышения урожайности культурных растений. Стимулирующий эффект микробных обработок объясняется, в том числе, способностью бактерий продуцировать биологически активные вещества, например, гормоны растений (Kudoyarova et al., 2019). Многие ризобактерии способны продуцировать индоллил-3-уксусную кислоту (ИУК), которая является наиболее распространенным растительным ауксином (Ali, 2015). ИУК, синтезируемый ризобактериями, воздействует в основном на корневую систему, стимулируя ее рост, увеличивая массу, число боковых корней и, соответственно, площадь ее контакта с почвой, что способствует активации роста растений и повышению урожайности (Ramos et al., 2008).

## GROWTH-STIMULATING ACTIVITY OF *ENTEROBACTER LUDWIGII* BLK BACTERIA IN OPTIMIZING THE CULTURE MEDIUM

Chetverikov S.P.\*, Timergalin M.D.,  
Feoktistova A.V., Starikov S.N., Kendjhiёva A.A.,  
Hkudaygulov G.G., Bakaeva M.D.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of  
the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia  
\*E-mail: [chelab007@yandex.ru](mailto:chelab007@yandex.ru)

A method for optimizing the cultivation of *Enterobacter ludwigii* BLK and the treatment of wheat plants using a preparation based on this bacterium is proposed. By reducing the concentration of peptone and partially replacing it with an alternative nitrogen source – yeast extract – in the culture medium, the cost of producing the drug was reduced without reducing its effectiveness. It was found that the preparation, produced in a modified environment, activated root growth and promoted the accumulation of chlorophyll in bread wheat leaves. The stimulating effect was more pronounced with a combination of pre-sowing and post-emergence treatment.

**Keywords:** *Enterobacter ludwigii* BLK ♦ optimization of cultivation ♦ PGPB ♦ culture medium ♦ IAA

Принято в печать: 27.06.2024



Ростостимулирующая активность препарата зависит от интенсивности выработки биологически активного вещества бактериями. Повышения продукции ИУК можно добиться разными способами, например, путем добавления в питательную среду триптофана в качестве предшественника биосинтеза ИУК, веществ, воздействующих на клеточные стенки бактерий, ионов металлов, регулирования рН среды и так далее (Chandra et al., 2018, Yusfi et al., 2021). В условиях промышленного производства биопрепаратов высокая цена питательной среды неизбежно приводит к росту стоимости конечного продукта, поэтому важно подобрать оптимальную среду для культивирования бактерий, не теряя при этом ростостимулирующей активности. Было показано, что для получения культур *Pseudomonas* с высоким титром клеток и антигрибной активностью нужно учитывать наличие в питательной среде источника органического азота (Логинов и др., 2003). Широко используемые среды, такие как среда Кинга (King et al., 1954), содержат пептические гидролизаты, богатые органическим азотом, однако их высокая стоимость негативно влияет на их использование при производстве. Решением проблемы может быть использование питательной среды, в которой источником азота являются автолизаты отработанных пивных дрожжей, которые в настоящее время не используются в полной мере, но содержат все необходимые аминокислоты и витамины. Имеются данные о перспективности такого подхода в промышленных средах с сохранением высокого титра клеток и необходимых свойств (Асабина и др., 2009).

Целью работы являлась сравнительная оценка ростостимулирующих свойств штамма бактерий *Enterobacter ludwigii* BLK (*E. ludwigii* BLK) с выявленной способностью к синтезу ИУК (Четвериков и др., 2023) выращенного на модифицированной культуральной среде.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм бактерий *E. ludwigii* BLK, депонирован во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов под номером В-3652D. Бактерии культивировали в ферментерах (10 л) с вращающейся мешалкой (300 об/мин) при температуре 28 °С на протяжении 72 ч в различных питательных средах: Кинг Б (King et al., 1954), мясопептонный бульон (МПБ), модифицированная среда с использованием экстракта дрожжей. Состав сред представлен в таблице 1.

**Таблица 1. Состав питательных сред (г/л)**

МПБ		Модифицированная (МОД)		Кинг Б	
Пептон	15	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5
NaCl	5	MgSO <sub>4</sub>	1,5	MgSO <sub>4</sub>	1,5
		Пептон	3	Пептон	20
		Дрожж. экстракт	2	Глицерин	10
		Глицерин	5		

Посев штамма в питательную среду производили из суспензий бактериальных клеток в стерильной водопроводной воде так, чтобы их исходный титр в питательной среде составлял  $(1,0 \pm 0,5) \cdot 10^6$  КОЕ/мл, рН 6,8-7,2. Численность бактерий в культуре определяли

с помощью микробиологического посева последовательных десятикратных разведений на агаризованную среду Кинг Б. Анализ культуральной жидкости на синтезированную и выделенную бактериями ИУК проводили в системе ВЭЖХ LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором SPD-M20A («Shimadzu», Япония). Для хроматографического разделения использовали колонку PerfectSil Target ODS-3 HD 5µm (150x4,6 mm) («MZ-Analysentechnik», Германия).

Для оценки ростостимулирующей активности бактериальных культур проводили предпосевную обработку семян, для этого семена в чашках Петри на фильтровальной бумаге замачивали в суспензии бактерий (титр  $1,0 \pm 0,5 \cdot 10^4$  КОЕ/мл, в течение 10 мин и сажали в сосуды с почвенно-песочной смесью в соотношении 9:1. Семисуточные проростки пшеницы опрыскивали в различных сочетаниях согласно схеме (Рис. 1), из расчета 1 мл раствора с титром  $5 \cdot 10^7$  КОЕ на один сосуд 0,5 л с растениями (по 5 шт). В работе использовали сорт мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) Кинельская Юбилейная. Растения выращивали под фитолампами при плотности потока фотонов  $190 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , 14-часовом фотопериоде и температуре 22-26 °С (ночь/день).

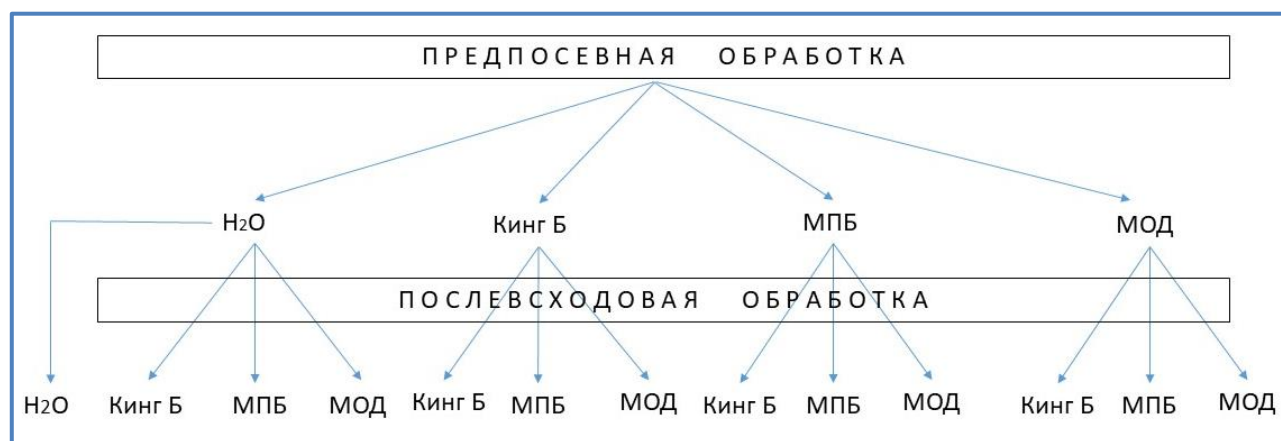


Рис. 1. Схема обработок

Через 2 недели после последней обработки оценивали ростовые показатели (длину побега, массу побега и корня) и суммарный уровень хлорофилла спектрофотометрическим методом как описано ранее (Chetverikov et al., 2023). Данные были обработаны с использованием программного обеспечения MS Excel. На рисунках и в таблицах данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

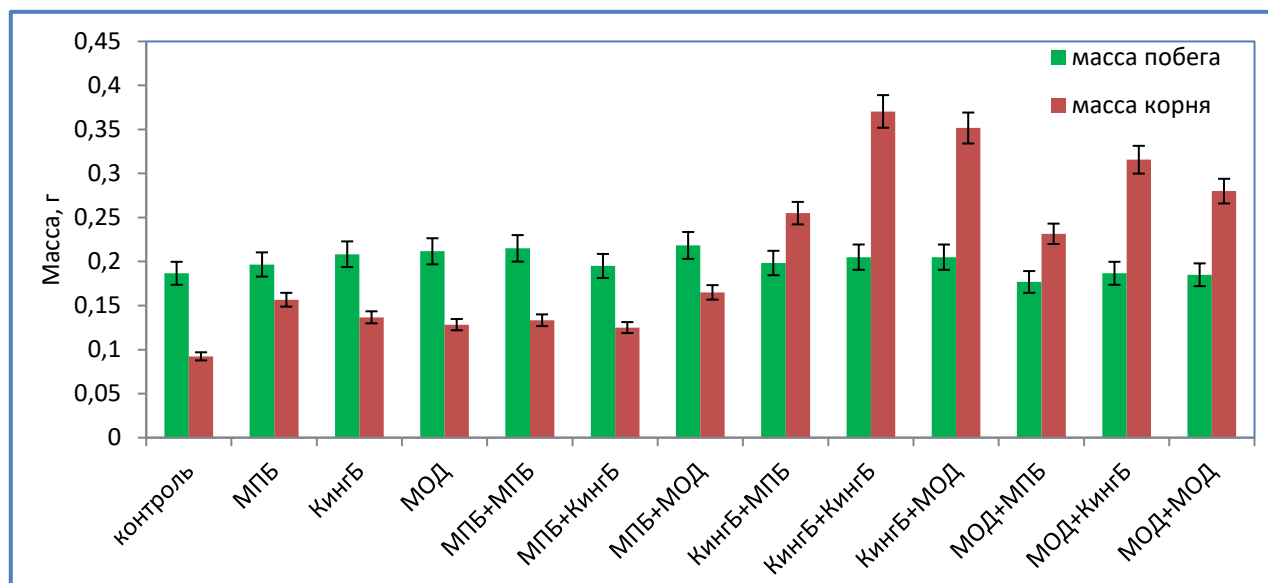
В процессе культивирования оценивали титр микроорганизмов и проводили анализ содержания ИУК в культуральной среде, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Содержание ИУК и титр клеток бактерий в культуральной среде через 72 ч культивирования, n=5

Показатель	МПБ	МОД	Кинг Б
ИУК, мкг/мл	27,463±1,543	5,757±434	11,244±1,265
Титр, КОЕ/мл	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$

Во всех использованных питательных средах бактерии активно размножались, обеспечивая сопоставимо высокий титр клеток в готовом продукте. Наибольшее содержание ИУК наблюдали при культивировании на среде МПБ, на модифицированной среде концентрация ИУК была минимальной.

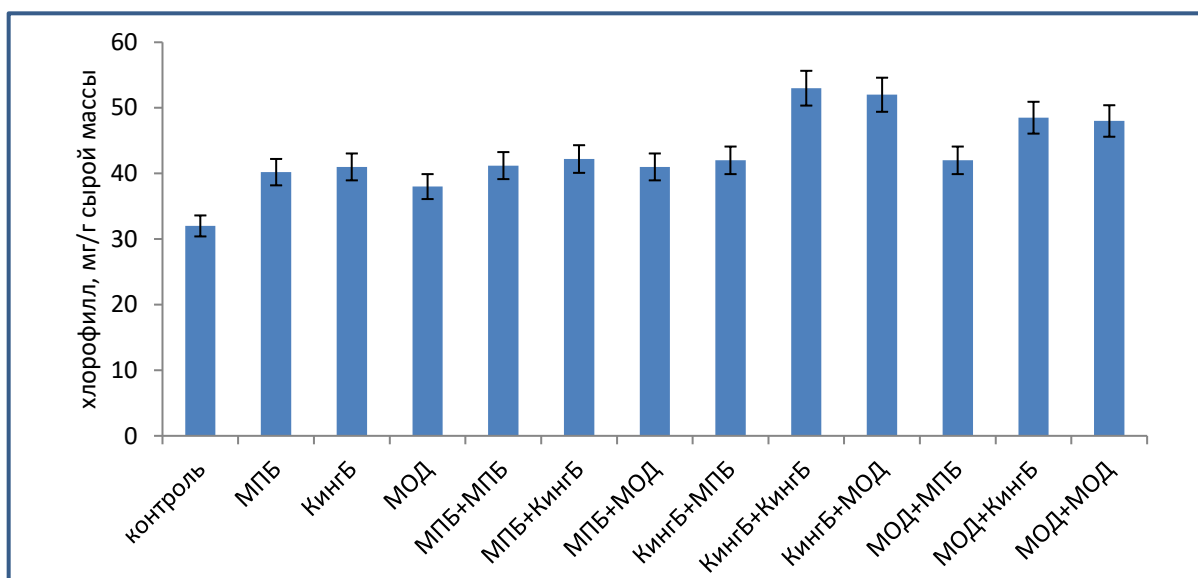
Результаты влияния обработок оценивали по ростовым характеристикам растений. Длина побегов во всех вариантах опыта достоверно не различалась (данные не приводятся), при этом масса корней существенно менялась в зависимости от типа среды бактериальной культуры, использованных для обработки (Рис. 2)



**Рис. 2. Масса побегов и корней у растений пшеницы, при предпосевной + послевсходовой обработке штаммом *E. ludwigii* BLK, выращенным на средах с разным составом, n=15.**

Результаты показали, что обработки во всех вариантах не приводили к накоплению массы побега, при этом наблюдалось достоверное накопление массы корня. Масса корней в вариантах с однократной предпосевной обработкой семян была в 1,5 раза выше, чем в контроле. При этом повторная обработка препаратами приводила к большей стимуляции роста корня, до 3,5-4 раз относительно контрольных значений. В вариантах опыта с предварительной обработкой культурами, выращенными на среде Кинг Б и модифицированной среде, массы корня была выше, чем в случае с МПБ. Вероятно, высокие концентрации ИУК, накопленные в МПБ, были менее эффективны. Известно, что применение экзогенного ауксина в высоких концентрациях подавляет рост побегов и корней (Olatunji et al., 2017), а бактерии, которые производят большое количество ауксина, могут не оказывать стимулирующего эффекта на рост, это соответствует способности высоких концентраций ИУК стимулировать продукцию этилена, который подавляет рост растений (Glick, 2014). Кроме того, в некоторых случаях сверхпродукция ИУК является основным фактором, определяющим патогенность бактерий (Glickmann et al., 1998). Поэтому варианты с меньшим содержанием ИУК в питательной среде могут обладать большей ростстимулирующей активностью.

Во всех вариантах обработок бактериальная культура способствовала росту уровня хлорофилла в листьях (Рис. 3).



**Рис. 3. Суммарное содержание хлорофиллов а и в у растений пшеницы, при предпосевной + послевсходовой обработке штаммом *E. ludwigii* BLK, выращенным на средах с разным составом, n=9.**

Как предпосевная, так и последующая обработка бактериями способствовала увеличению содержания хлорофилла на 20% и более относительно контроля. При этом Кинг Б и модифицированная среда как вместе, так и по отдельности были более эффективны, в этих сочетаниях уровень хлорофилла был выше контрольного значения на 25-30%.

Таким образом, более дешевая модифицированная питательная среда с экстрактом дрожжей в качестве источника азота была успешно применена для культивирования бактерии *E. ludwigii* BLK с высоким титром клеток. Использование модифицированной среды сохраняло ростостимулирующие свойства штамма, которые проявлялись в активизации роста корней и увеличении содержания фотосинтетических пигментов в листьях растений пшеницы.

#### ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках в рамках Гос. задания Минобрнауки России № 075-03-2021-607 по теме № 122031000309-7, а также создания и развития Селекционно-семеноводческого центра по кормовым культурами УФИЦ РАН (соглашение № 075-15-2021-549).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Оптимизация биосинтеза ингибиторов роста фитопатогенов бактериями рода *Pseudomonas* // Биотехнология. 2009. № 3. С. 67-71.
2. Логинов О.Н., Четвериков С.П. Биосинтез низкомолекулярных метаболитов Бактериями *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 // Биотехнология. 2003. № 5. С. 22-25.

3. Четвериков С.П., Четверикова Д.В., Бакаева М.Д. и др. Штамм бактерий *Enterobacter ludwigii* для повышения урожайности кормовых трав // Патент РФ №2796926, 29.05.2023.
4. Ali B. Bacterial auxin signaling: comparative study of growth induction in *Arabidopsis thaliana* and *Triticum aestivum* // Turk. J. Botany. 2015 V. 39 (1). P. 1-9.
5. Chandra S., Askari K., Kumari M. Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth // J. Genet. Eng. Biotechnol. 2018 V. 16. P. 581-586. DOI: 10.1016/j.jgeb.2018.09.001.
6. Chetverikov S., Feoktistova A., Timergalin M. et al. Mitigation of the negative effect of auxinic herbicide by bacterial suspension of *Pseudomonas protegens* DA1.2 in wheat plants under drought conditions. // Acta Agriculturae Slovenica. 2023. V. 119 (1). P. 1-7. DOI: 10.14720/aas.2023.119.1.2764.
7. Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world // Microbiol Res. 2014. V. 169 (1). P. 30-9. DOI: 10.1016/j.micres.2013.09.009. Epub 2013 Sep 19. PMID: 24095256.
8. Glickmann E., Gardan L., Jacquet S. et al. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae* // Mol. Plant Microbe Interact. 1998 V. 11 (2). P. 156-162. DOI: 10.1094/MPMI.1998.11.2.156. PMID: 9450337.
9. King E.O., Ward M.K., Raney D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein // J. Lab. Clin. Med. 1954. V. 44. P. 301-307.
10. Kudoyarova G., Arkhipova T., Korshunova T. et al. Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth promoting bacteria under edaphic stresses // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. Article. 1368. DOI: 10.3389/fpls.2019.01368
11. Olatunji D., Geelen D., Verstraeten I. Control of endogenous auxin levels in plant root development // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18 (12). Article. 2587. DOI: 10.3390/ijms18122587.
12. Ramos S.B., Maicas B.J., Pereyra de la Iglesia M.T. et al. Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors // Phytopathology. 2008. V. 98 (4). P. 451-457. DOI: 10.1094/phyto-98-4-0451.
13. Yusfi L.A., Tjong D.H., Chaniago I et al. Culture medium optimization for Indole-3-Acetic Acid production by *Serratia plymuthica* UBCF\_13 // IOP Earth Environ. Sci. 2021. 741 (1) Article 012059. DOI: 10.1088/1755-1315/741/1/012059.

**Цитировать как**

Четвериков С.П., Тимергалин М.Д., Феоктистова А.В., Стариков С.Н., Кенджиева А.А., Худайгулов Г.Г., Бакаева М.Д. Ростстимулирующая активность бактерий *Enterobacter ludwigii* BLK при оптимизации среды культивирования // Экобиотех, 2024, Т. 7 № 2. С. 86-91. DOI: 10.31163/2618-964X-2024-7-2-86-91 EDN: KVVJYV

**Cited as**

Chetverikov S.P., Timergalin M.D., Feoktistova A.V., Starikov S.N., Kendzhieva A.A., Hkudaygulov G.G., Bakaeva M.D. Growth-stimulating activity of *Enterobacter ludwigii* BLK bacteria in optimizing the culture medium. *Ekobiotek*. 2024, V. 7 (2). P. 86-91. DOI: 10.31163/2618-964X-2024-7-2-86-91 EDN: KVVJYV (In Rus.)