

GRAŻYNA DURSKA

Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ANTAGONISTYCZNE INTERAKCJE POMIĘDZY METYLOTROFAMI WYIZOLOWANYMI Z GLEBY RYZOSFEROWEJ I POZARYZOSFEROWEJ JĘCZMIENIA ORAZ INNYMI MIKROORGANIZMAMI GLEBOWYMI

Streszczenie. Badano interakcje pomiędzy metyloτροφami i niektórymi drobnoustrojami glebowymi. W tym celu w warunkach laboratoryjnych określano antagonizm metyloτροφów wyizolowanych z gleby ryzosferowej i pozaryzosferowej jęczmienia w stosunku do niektórych bakterii właściwych, promieniowców i grzybów, a także wrażliwość samych metyloτροφów na antagonistyczne oddziaływanie promieniowców i wybranych antybiotyków. Badania wykazały, że najczęściej metyloτροφów było antagonistami bakterii z gatunku *Bacillus subtilis*, mniej fluoryzujących *Pseudomonas* i promieniowców glebowych. Niektóre metyloτροφy hamowały rozwój grzybów *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp. i *Alternaria tenuis*. Z drugiej strony wykazano wrażliwość wszystkich metyloτροφów na antagonistyczne oddziaływanie promieniowców, a także większą wrażliwość metyloτροφów strefy ryzosferowej niż pozaryzosferowej jęczmienia na zastosowane w badaniach antybiotyki.

Słowa kluczowe: antagonizm, bakterie, gleba, grzyby, metyloτροφy, promieniowce

Wstęp

Rozwój drobnoustrojów w glebie zależy nie tylko od warunków fizyko-chemicznych związanych z typem gleby, rodzajem uprawianych roślin, strefą ryzosferową czy pozaryzosferową korzenia, ale także od właściwości fizjologicznych drobnoustrojów zasiedlających glebę. Drobnoustroje, przeprowadzając różne procesy biochemiczne, uwalniają do podłoża metabolity, które modyfikują warunki glebowe i wpływają na rozwój mikroorganizmów zarówno saprofitycznych, jak i patogennych. Jednym z najważniejszych oddziaływań między drobnoustrojami glebowymi jest antagonizm. Antagonizm może przejawiać się w sposób bezpośredni oraz pośredni poprzez niekorzystne

dla niektórych grup drobnoustrojów modyfikacje środowiska ograniczające ich rozwój. Metabolitami oddziałującymi niekorzystnie na drobnoustroje mogą być: alkohole, kwasy mineralne i organiczne, enzymy, toksyny bakteryjne i antybiotyki, które w zależności od stężenia w mniejszym lub w większym stopniu modyfikują skład drobnoustrojów w glebie. Wśród różnych grup fizjologicznych drobnoustrojów uwagę zwracają metylotrofy, charakteryzujące się zdolnością korzystania ze związków jednowęglowych, takich jak metan, metanol, metyloaminy, jak również ze związków wielowęglowych w przypadku metylotrofów fakultatywnych (JENKINS i IN. 1987). Drobnoustroje te w przyrodzie występują powszechnie (BRATINA i HANSON 1992). Odgrywają istotną rolę nie tylko w obiegu węgla, lecz także mają swój udział w obiegu azotu, siarki i fosforu (BAKER i IN. 1991, DURSKA 2007, 2010). Wchodzą również w układy symbiotyczne z roślinami (CORPE i BASILE 1982, TROTSSENKO i IN. 2001, OMER i IN. 2004).

Celem pracy było zbadanie w warunkach laboratoryjnych oddziaływań między metylotrofami wyodrębnionymi z gleby ryzosferowej i z gleby pozaryzosferowej jęczmienia, a także między metylotrofami i innymi mikroorganizmami, należącymi do bakterii właściwych, promieniowców i grzybów pleśniowych. Postanowiono również zbadać wpływ niektórych metabolitów antybiotycznych promieniowców na rozwój bakterii metylotroficznych.

Materialy i metody

Badania prowadzono z wykorzystaniem czystych kultur bakterii i grzybów pochodzących z kolekcji Katedry Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Do badań wykorzystano 15 szczepów bakterii metylotroficznych wyodrębnionych z gleby ryzosferowej i 15 szczepów z gleby pozaryzosferowej jęczmienia (tab. 1), na podłożu wybiórczym dla metylotrofów przygotowanym według URAKAMIEGO i KOMAGATY (1979). Wszystkie wyodrębnione z gleby szczepy należały do metylotrofów względnych.

Tabela 1. Metyloflory wyizolowane z gleby ryzosferowej i pozaryzosferowej jęczmienia
Table 1. Methylotrophs isolated from the rhizosphere and non-rhizosphere soil of barley

Metylotrofy gleby ryzosferowej		Metylotrofy gleby pozaryzosferowej	
grupa morfologiczna	numer szczepu	grupa morfologiczna	numer szczepu
Ziarniaki Gram-dodatnie	45, 74	Ziarniaki Gram-dodatnie	37, 41, 43, 51, 61
Ziarniaki Gram-ujemne	4, 15, 28, 33, 82	Pałeczki Gram-dodatnie	2, 52, 55, 75, 79
Ziarniakopalczki Gram-dodatnie	5	Pałeczki przetrwalnikujące	6, 63, 80, 81, 84
Pałeczki Gram-dodatnie	1, 3, 21		
Pałeczki Gram-ujemne	8, 14, 26, 46, 50		

Interakcje pomiędzy metylotrofami a innymi drobnoustrojami badano metodą rysową na powierzchni odpowiedniego podłoża zestalonego agarem, stosując trzy powtórzenia dla każdego badanego szczepu.

Przeprowadzone badania obejmowały interakcje pomiędzy:

- 1) bakteriami metylotroficznymi strefy ryzosferowej a bakteriami metylotroficznymi strefy pozaryzosferowej, na powierzchni podłoża wybiórczego dla metylotrofów według URAKAMIEGO i KOMAGATY (1979),
- 2) bakteriami metylotroficznymi a następującymi gatunkami bakterii: *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*, na podłożu według OHTY i HATTORIEGO (1980),
- 3) bakteriami metylotroficznymi a fluoryzującymi *Pseudomonas* (szczepy: 37M, 8M, PK, 65M), na podłożu B według Kinga (BURBIANKA i PLISZKA 1963),
- 4) bakteriami metylotroficznymi a następującymi grzybami: *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus versicolor*, *Trichoderma viride*, *Botrytis* sp., *Phoma* sp. i *Alternaria tenuis* na podłożu glukozowo-ziemniaczanym według RODINY (1968),

Dodatkowo metodą rysową na podłożu glukozowo-ziemniaczanym według RODINY (1968) określano wrażliwość metylotrofów na metabolity 16 szczepów promieniowców, a także badano wpływ takich antybiotyków, jak: gentamycyna, neomycyna, tobramycyna, chloramfenikol, erytromycyna i tetracyklina na wzrost bakterii metylotroficznych. Wpływ wybranych antybiotyków na wzrost metylotrofów badano metodą krążkową. Na powierzchni płytek zestalonych agarem dokonywano posiewu powierzchniowego bakterii metylotroficznych i nakładano krążki z określonymi antybiotykami. Badania prowadzono na podłożu pełnym według OHTY i HATTORIEGO (1980), stosując trzy powtórzenia. Wyniki pomiaru stref hamowania wzrostu drobnoustrojów przedstawiono w milimetrach.

Wyniki

Przeprowadzone badania nie wykazały wzajemnych właściwości antagonistycznych metylotrofów strefy ryzosferowej i pozaryzosferowej jęczmienia, natomiast stwierdzono zdolność niektórych metylotrofów do hamowania wzrostu badanych szczepów bakterii właściwych, promieniowców i grzybów glebowych (tab. 2, 3). Częściej właściwości hamujące obserwowano u metylotrofów z gleby pozaryzosferowej niż ryzosferowej.

Najwięcej, bo aż 66% metylotrofów gleby nieryzosferowej, wykazywało antagonizm wobec *Bacillus subtilis* (tab. 2), a szczególnym antagonizmem wyróżniał się szczep nr 55. Mniejsza liczba szczepów metylotroficznych (40%) była antagonistami *Pseudomonas* 8M i promieniowców glebowych. Na wzrost promieniowców najczęściej antagonistycznie oddziaływał metylotroficzny szczep nr 61 (ziarniak Gram-dodatni), był antagonistyczny wobec 10 spośród 16 zbadanych promieniowców. Pozostałe szczepy wykazywały mniejszą częstość hamowania, sporadycznie niektóre tylko drobnoustroje, a cztery szczepy nie przejawiały wobec zbadanych drobnoustrojów żadnego antagonizmu.

Metylotrofy gleby ryzosferowej (tab. 2), podobnie jak metylotrofy gleby pozaryzosferowej, najczęściej hamowały wzrost bakterii *Bacillus subtilis* (najsilniej szczep nr 74, ziarniak Gram-dodatni), następnie *Pseudomonas* 8M i promieniowców glebowych.

Tabela 2. Antagonizm metylotrofów gleby ryzosferowej i pozaryzosferowej jęczmienia w stosunku do niektórych bakterii

Table 2. Antagonism of methylotrophs from the rhizosphere and non-rhizosphere soil of barley in relation to some bacteria

Drobnoustroje	Metylotrofy gleby ryzosferowej		Metylotrofy gleby nieryzosferowej	
	liczba antagonistycznych szczepów*	strefa hamowania (mm)	liczba antagonistycznych szczepów*	strefa hamowania (mm)
Metylotrofy	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	7	5,0-15,5	10	3,0-12,0
<i>Micrococcus luteus</i>	1	4,0	3	1,5-2,5
<i>Escherichia coli</i>	1	14,5	2	2,0-11,5
<i>Pseudomonas</i> 37M	1	6,0	1	10,0
<i>Pseudomonas</i> 8M	3	4,0-6,0	6	3,0-10,0
<i>Pseudomonas</i> PK	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> 65M	0	0	2	2,0-3,0
<i>Actinomycetales</i>	4	2,0-13,0	6	3,0-9,6
Razem	17	2-15,5	30	1,5-12,0

*Liczba zbadanych szczepów – 15.

Tabela 3. Antagonizm metylotrofów gleby ryzosferowej i pozaryzosferowej jęczmienia w stosunku do niektórych grzybów

Table 3. Antagonism of methylotrophs from the rhizosphere and non-rhizosphere soil of barley in relation to some fungi

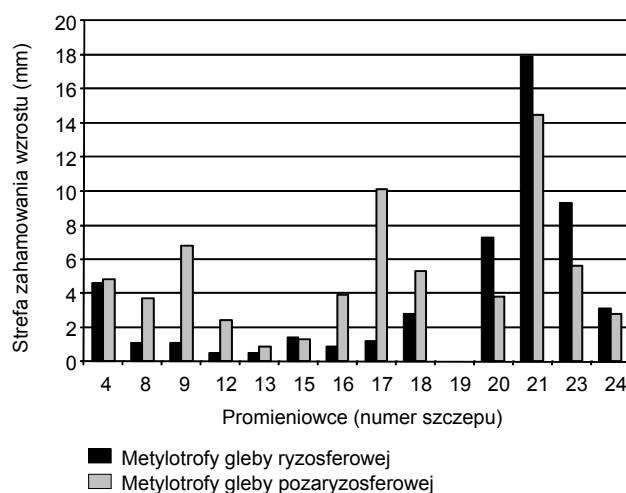
Drobnoustroje	Metylotrofy gleby ryzosferowej		Metylotrofy gleby pozaryzosferowej	
	liczba antagonistycznych szczepów*	strefa hamowania (mm)	liczba antagonistycznych szczepów*	strefa hamowania (mm)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	8,5-13,5	4	7,5-13,5
<i>Candida</i> sp.	2	7,5-15,5	5	5,5-12,0
<i>Alternaria tenuis</i>	2	7,5-14,5	5	19,6-26,5
<i>Fusarium oxysporum</i>	0		0	
<i>Aspergillus versicolor</i>	0		0	
<i>Botrytis</i> sp.	0		0	
<i>Phoma</i> sp.	0		0	
<i>Trichoderma viride</i>	0		0	
Razem	6	7,5-15,5	14	5,5-26,5

*Liczba zbadanych szczepów – 15.

Bakterie i promieniowce najczęściej były hamowane przez szczep nr 5 (ziarniakopalczka Gram-dodatnia). Nie stwierdzono właściwości antagonistycznych u metylotrofów oznaczonych numerami: 28, 8, 14, 50, 1 i 3.

Zaobserwowano zdolność niektórych szczepów bakterii metylotroficznych do hamowania wzrostu grzybów: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp. i *Alternaria tenuis* (tab. 3). Najczęściej wzrost grzybów, podobnie jak bakterii i promieniowców, hamowały metylotrofy wyizolowane z gleby nieryzosferowej jęczmienia. Właściwości antagonistyczne wykazywała więcej niż połowa szczepów bakterii metylotroficznych. Najsilniej był hamowany wzrost *Alternaria tenuis* (strefa hamowania – 29 mm) przez pałeczkę Gram-dodatnią (szczep nr 2). Wśród metylotrofów gleby ryzosferowej właściwości antagonistyczne wobec grzybów zaobserwowano tylko u dwóch spośród 15 szczepów, były to ziarniaki Gram-dodatnie (szczepy nr 45 i 74).

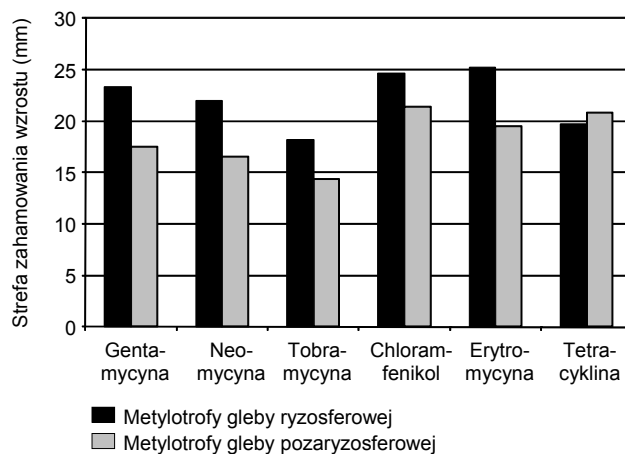
W pracy określano także wrażliwość metylotrofów glebowych na antagonistyczne oddziaływanie promieniowców (rys. 1). Badania wykazały, że wszystkie użyte do badań szczepy promieniowców glebowych były antagonistami metylotrofów z obu źródeł izolacji. Tylko nieznacznie silniej były hamowane metylotrofy gleby nieryzosferowej. Najbardziej antagonistyczny wobec metylotrofów był szczep oznaczony numerem 21.



Rys. 1. Wrażliwość metylotrofów na antagonistyczne oddziaływanie niektórych promieniowców

Fig. 1. The sensitivity of methylophs to antagonistic effect of some actinomycetes

Prawie wszystkie szczepy bakterii metylotroficznych wyizolowane z obu źródeł były wrażliwe na zastosowane w badaniach antybiotyki, ale większą wrażliwość przejawiały metylotrofy strefy ryzosferowej (rys. 2). Średnia strefa zahamowania wzrostu metylotrofów strefy ryzosferowej wynosiła 18,2 mm dla tobramycyny i 25,2 mm dla erytromycyny. W przypadku metylotrofów strefy nieryzosferowej dwa szczepy (nr 37 i 39) były całkowicie odporne na wszystkie zastosowane antybiotyki, pozostałe szczepy najsłabiej hamowała tobramycyna, a najsilniej chloramfenikol.



Rys. 2. Wrażliwość metylotrofów na antagonistyczne oddziaływanie niektórych antybiotyków

Fig. 2. The sensitivity of methylotrophs to antagonistic effect of some antibiotics

Dyskusja

Metylotrofy ze względu na powszechne występowanie w przyrodzie i duże znaczenie ekologiczne zwracają uwagę wielu autorów. Wcześniejsze badania wykazały znaczący udział metylotrofów wśród mikroorganizmów gleby ryzosferowej i pozaryzosferowej roślin (DURSKA 2003). Powszechne jest ich występowanie w fylosferze różnych roślin (CORPE i RHEEM 1989). Dane literaturowe wskazują na symbiotyczne związki metylotrofów z innymi mikroorganizmami (GISI i IN. 1998, SY i IN. 2001), a także z roślinami (IVANOVA i IN. 2001, LIDSTROM i CHISTOSERDOVA 2002). Mało jest danych dotyczących zdolności metylotrofów do konkutowania z innymi drobnoustrojami glebowymi. Jak wynika z przeprowadzonych badań, metylotrofy wyodrębnione z gleby spod uprawy jęczmienia wykazywały zróżnicowany antagonizm wobec innych drobnoustrojów glebowych. Zaobserwowano, że częściej antagonistami bakterii właściwych, promieniowców i grzybów były metylotrofy wyizolowane z gleby pozaryzosferowej. Metylotrofy, zarówno ryzosferowe, jak i nieryzosferowe, wyizolowane z obu stref glebowych najbardziej antagonistycznie oddziaływały na bakterie gatunku *Bacillus subtilis*, mniej było antagonistów w stosunku do przedstawicieli rodzaju *Pseudomonas* i promieniowców. Tylko niektóre hamowały wzrost drożdży i grzybowego patogenu roślin – *Alternaria tenuis*. Hamowanie wzrostu innych drobnoustrojów przez metylotrofy mogło być związane z produkcją związków toksycznych o charakterze egzopolisacharydów, bakteriocyn, antybiotyków czy innych kometabolitów (YOSHIDA i IN. 2003, CHOI i IN. 2006).

Badania niniejsze wykazały wrażliwość metylotrofów na antagonistyczne oddziaływanie promieniowców glebowych, przy czym bardziej wrażliwe były metylotrofy wyizolowane z ryzosfery roślin. Metylotrofy ryzosferowe były też bardziej wrażliwe na zastosowane w doświadczeniach antybiotyki. Można przypuszczać, że na występowanie

Durska G., 2010. Antagonistyczne interakcje pomiędzy metylotrofami wyizolowanymi z gleby ryzosferowej i pozaryzosferowej jęczmienia oraz innymi mikroorganizmami glebowymi. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #74.

metylotrofów w glebie, podobnie jak na inne drobnoustroje, duży wpływ mają interakcje z promieniowcami. Metylotrofy mogą również regulować liczebność organizmów zarówno saprofitycznych, jak i patogennych w glebie, co wykazały wstępne badania.

Wnioski

1. Metylotrofy antagonistyczne były liczniejsze w strefie pozakorzeniowej niż korzeniowej.
2. Niektóre metylotrofy hamowały wzrost grzybów: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp. i *Alternaria tenuis* oraz bakterii gatunku *Bacillus subtilis*.
3. Metylotrofy ryzosferowe i pozaryzosferowe były hamowane przez promieniowce glebowe.
4. Metylotrofy ryzosferowe były bardziej wrażliwe na zastosowane w badaniach antybiotyki niż pozaryzosferowe.

Literatura

- BAKER S.C., KELLY D.P., MURRELL J.C., 1991. Microbial degradation of methanesulphonic acid: a missing link in the biogeochemical sulphur cycle. *Nature (Lond.)* 350: 627-628.
- BRATINA B., HANSON R.S., 1992. Methylotrophy. W: *Encyclopedia of microbiology*. Red. J. Lederberg. Academic Press, New York: 121-127.
- BURBIANKA M., PLISZKA A., 1963. Mikrobiologiczne badania produktów żywnościowych. PZWL, Warszawa.
- CHOI Y.J., BOURQUE D., MOREL L., GROLEAU D., MIQUEZ C.B., 2006. Multicopy integration and expression of heterologous genes in *Methylobacterium extorquens* ATCC 55366. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 753-759.
- CORPE W.A., BASILE D.V., 1982. Methanol-utilizing bacteria associated with green plants. *Dev. Ind. Microbiol.* 23: 483-493.
- CORPE W.A., RHEEM S., 1989. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 243-250.
- DURSKA G., 2003. The effect of Funaben T seed dressing on the occurrence of bacteria in soil under peas. *Pol. J. Environ. Stud.* 12, 6: 693-699.
- DURSKA G., 2007. Some properties of methylotrophic bacteria isolated from the sewage sludges derived from a mechanical and biological sewage treatment plants. *Pol. J. Microbiol.* 56, 4: 251-255.
- DURSKA G., 2010. Udział metylotrofów wyizolowanych z gleby ryzosferowej i pozaryzosferowej spod uprawy jęczmienia w przemianach związków fosforu i siarki. *Wod. Środ. Obsz. Wiej.* 10, 2: 39-48.
- GISI D., WILLI L., TRABER H., LEISINGER T., VUILLEUMIER S., 1998. Effects of bacterial host and dichloromethane dehalogenase on the competitiveness of methylotrophic bacteria growing with dichloromethane. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1194-1202.
- IVANOVA E.G., DORONINA N.V., TROTSSENKO YU.A., 2001. Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Microbiology (New York)* 70: 392-397.
- LIDSTROM M.E., CHISTOSERDOVA L., 2002. Plants in the pink: cytokinin production by *Methylobacterium*. *J. Bacteriol.* 184: 1832-1842.
- OHTA H., HATTORI T., 1980. Bacteria sensitive to nutrient broth medium in terrestrial environments. *Soil Sci. Plant Nutr.* 26: 99-107.

Durska G., 2010. Antagonistyczne interakcje pomiędzy metylotrofami wyizolowanymi z gleby ryzosferowej i pozaryzosferowej jęczmienia oraz innymi mikroorganizmami glebowymi. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #74.

- OMER Z.S., TOMBOLINI R., GERHARDSON B., 2004. Plant colonization by pink-pigmented facultative methylophilic bacteria (PPFMs). *FEMS Microbiol. Ecol.* 46: 319-326.
- OWEN JENKINS O., JONES D., 1987. Taxonomic studies on some gram-negative methylophilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 133: 453-473.
- RODINA A., 1968. Mikrobiologiczne metody badania wód. PWRiL, Warszawa.
- SY A., GIRAUD E., JOURAND P., GARCIA N., WILLEMS A., DE LAJUDIE P., PRIN Y., NEYRA M., GILLIS M., BOIVIN-MASSON C., DREYFUS B., 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183: 214-220.
- TROTSENKO YU.A., IVANOVA E.G., DORONINA N.V., 2001. Aerobic methylophilic bacteria as phytosymbionts. *Microbiology (New York)* 70: 725-736.
- URAKAMI T., KOMAGATA K., 1979. Cellular fatty acid composition and coenzyme Q system in gram-negative methanol-utilizing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 25: 343-360.
- YOSHIDA T., AYABE Y., YASUNAGA M., USAMI Y., HABE H., NOJIRI H., OMORI T., 2003. Genes involved in the synthesis of exopolysaccharide methanol by obligate methylophilic *Methylobacillus* sp. strain 12S. *Microbiology (New York)* 149: 431-444.

ANTAGONISTIC INTERACTIONS BETWEEN METHYLOPHILS ISOLATED FROM THE RHIZOSPHERE AND NON-RHIZOSPHERE SOIL OF BARLEY AND OTHER SOIL MICROORGANISMS

Summary. Interactions between facultative methylophilic and other soil microorganisms were investigated. In laboratory conditions antagonism of the methylophilic isolated from rhizosphere and non-rhizosphere soil of barley to some bacteria, actinomycetes and fungi, as well as their sensitivity to antibiotics were determined. It has been found that most of methylophilic were antagonistic to *Bacillus subtilis*, less to fluorescing *Pseudomonas* strain 8M and soil actinomycetes. Some of methylophilic exhibited inhibition to fungi *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp. and *Alternaria tenuis*. On the other hand, sensitivity of all methylophilic to antagonism of actinomycetes was observed. Methylophilic isolated from the rhizosphere were more sensitive to used antibiotics than those from the non-rhizosphere soil.

Key words: antagonism, bacteria, soil, fungi, methylophilic, actinomycetes

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Grażyna Durska, Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Szydlowska 50, 60-656 Poznań, Poland, e-mail: durska@up.poznan.pl

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

18.10.2010

Do cytowania – For citation:

Durska G., 2010. Antagonistyczne interakcje pomiędzy metylotrofami wyizolowanymi z gleby ryzosferowej i pozaryzosferowej jęczmienia oraz innymi mikroorganizmami glebowymi. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #74.