

УДК 579.873:631.811.98

БИОРЕГУЛЯТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ АССОЦИАТИВНЫХ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТЕХНОГЕННО-ЗАСОЛЁННЫХ ПОЧВ

Ковалевская Н.П., Шаравин Д.Ю.

ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», Россия, Пермь, nina_kov@mail.ru

Обсуждается роль ауксинов микробного происхождения как фактора, обеспечивающего ростстимулирующее действие бактерий на растения в условиях солевого стресса. Содержание ауксинов, пигментов, морфологические параметры и массу проростков мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Горноуральская оценивали через 3–8 суток после введения в их ризосферу биопрепаратов бактерий, различающихся по способности продуцировать фитогормоны. Присутствие в ризосфере ауксин-продуцирующих микроорганизмов сопровождалось стимуляцией роста растений: увеличивалась длина и масса побегов и корней, ускорялось накопление сырой и сухой массы растений. При повышении концентрации соли (от 0,5 до 1 % NaCl) предобработка проростков бактериальными препаратами снимала негативное действие соли на фотосинтетический аппарат пшеницы, содержание хлорофиллов и каротиноидов было значительно выше, чем в необработанных проростках. Для повышения урожайности при выращивании пшеницы на засоленных почвах рекомендуется проводить предпосевную обработку зерна биопрепаратами из солеустойчивых азотфиксирующих бактерий *Pantoea vagans*.

Ключевые слова: пшеница, солевой стресс, галотолерантные бактерии, фитогормоны, фотосинтетические пигменты.

BIOREGULATORY ACTIVITY OF ASSOCIATIVE NITROGEN-FIXING BACTERIA ISOLATED FROM TECHNOGENICALLY SALINIZED SOILS

Kovalevskaya N.P., Sharavin D.Y.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia, nina_kov@mail.ru

The role of microbial auxins is discussed as a factor providing the growth-promoting bacterial effect on plants in terms of salt stress. The content of auxins, pigments, as well as the morphological parameters and germ mass of soft spring wheat (*Triticum aestivum* L.) of “Gornouralskaya” cultivar were evaluated 3-8 days after the rhizosphere supplementation with bacterial biopreparations differing in the capability of phytohormone production. The presence of auxin-producing microorganisms in the rhizosphere was accompanied by growth promotion of plants, namely length and weight of shoots and roots increased and the accumulation of wet and dry weight accelerated. In case of salt concentration increase (0,5 to 1% NaCl) the germ pre-treatment with bacterial preparations abolished the negative salt effect on wheat photosynthetic apparatus; chlorophyll and carotenoid levels were considerably higher than those in untreated germs. To provide greater wheat yield on salinized soils the pre-sowing grain treatment by biopreparation of salt-tolerant nitrogen-fixing bacteria *Pantoea vagans* is recommended.

Keywords: wheat, salt stress, halotolerant bacteria, phytohormones, photosynthetic pigments.

В аридных областях одной из основных проблем современного интенсивного земледелия является улучшение обеспечения растений азотом и фосфором. Обеспеченность растений азотом и микроэлементами во многом определяет их холодоустойчивость и адаптацию к стрессам, обусловленным дефицитом или избытком влаги. Дефицит азота вызывает уменьшение количества хлорофилла и ферментов, участвующих в ассимиляции CO₂. Потребности растений в азоте более чем на 2/3 обеспечиваются за счет универсальных симбионтов высших растений – ростстимулирующих ризобактерий (РСПБ) (plant growth_promoting rhizobacteria). В течение года в разных типах почв ассоциативные микроорганизмы могут фиксировать от 34 до 60 кг азота на 1 га. Как правило, такие микроорганизмы накапливаются в тканях растений практически в виде чистых культур, а

растение обеспечивает эндофитов стабильной средой обитания и питанием [7]. Ассоциативные микроорганизмы улучшают жизнеспособность растения-хозяина, повышают его фотосинтез и продуктивность, ускоряют прорастание семян и рост, повышают устойчивость к стрессам. Так, при обработке эндофитными бактериями у растений при солевом стрессе повышается активность ферментативных антиоксидантов (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза) и содержание низкомолекулярных протекторов (пролин) [5]. В стрессовых условиях растения нуждаются в поступлении дополнительных регуляторов роста, таких как фитогормоны и витамины, источником которых также могут быть микроорганизмы ризосферы и филлосферы.

Направление исследований биостимуляторов на основе микроорганизмов в настоящее время интенсивно развивается, свидетельством чему является рост объема их продаж на мировом рынке. Рост рынка биостимуляторов оценивается в 10 % и более ежегодно и составляет, по оценкам специалистов, от 200 до 400 млн евро в Европе и 800 млн евро в мире [4]. Однако практическая реализация биостимуляторов на основе солеустойчивых микроорганизмов пока остается на уровне лабораторных исследований по причине малоизученности влияния этих бактерий, синтезирующих фитогормоны на уровень устойчивости и продуктивности зерновых, овощных и технических культур в условиях солевого стресса.

Цель исследования – изучение влияния инокуляции ауксинсинтезирующими солеустойчивыми микроорганизмами на синтез фотосинтетических пигментов в онтогенезе и морфометрические характеристики проростков пшеницы в условиях солевого стресса.

Объекты и методы исследования

Исследования проводили в лабораторных условиях на проростках мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Горноуральская в песчаной культуре. Перед посевом семена пшеницы стерилизовали 5 мин смесью 70 %-ного этанола и 3 %-ного раствора перекиси водорода в соотношении 1:1. Для получения накопительных культур азотфиксирующих бактерий были использованы образцы филло- и ризосферы, отобранные в районе техногенного засоления (Верхнекамское месторождение калийных солей, г. Соликамск, Пермский край). Культивирование азотфиксирующих бактерий проводили на минеральной жидкой и агаризованной средах "Г" (г/л): р-р А– $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2), $CaCl_2$ (0,02), $NaCl$ (2,0), дрожжевой экстракт (0,2), глюкоза (1,0); р-р Б – $Na_2HPO_4 \cdot 5H_2O$ (1,5), KH_2PO_4 (0,7). Внесение в среду микроэлементов (пропись Aaronson, 1970) и витаминов (пропись Pfenning, 1966) проводили согласно рекомендациям Гальченко [1]. Биомассу бактерий оценивали по оптической плотности бактериальной суспензии при 590 нм. Подбор

условий и продолжительности культивирования бактерий, обеспечивающих максимальный выход ауксинов в среду, проводили при периодическом культивировании.

Содержание микробной индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) определяли методом Сальковского (0,05М FeCl₃ в 35 % HClO₄ при 540 нм) при добавлении в культуральную среду L-триптофана (200 мкг/мл) по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов ИУК [6]. Бактериальные препараты концентрировали центрифугированием, отмывали физиологическим раствором от метаболитов и доводили до оптической плотности 0,2 на спектрофотометре Cary 100 (Agilent Technologies, США) при 590 нм. Стерилизованные семена помещали в проавтоклавируемые вегетационные сосуды объёмом 0,5 л с 0,2 кг промытого песка. Далее в ёмкости вносили по 1 мл бактериальной суспензии и 20 мл дистиллированной воды или солевого раствора. Контролем служили неинокулированные растения. Проростки пшеницы (по 20–30 шт./сосуд) выращивали при температуре 24–28 °С и освещенности лампой дневного света. После 6 и 8 дней инкубации образцов проводили оценку морфометрических параметров проростков. Суммарное содержание хлорофиллов и каротиноидов в 3, 6 и 8 дневных проростках измеряли спектрофотометрическим методом в 80 %-ных ацетоновых экстрактах по стандартной методике на спектрофотометре Cary 100 (Agilent Technologies, США).

Общее содержание хлорофиллов рассчитывали по формуле $X_a + X_b = 17,3(A_{646}) + 7,18(A_{663})$, A_{646} и A_{663} коэффициенты абсорбции при 646 и 663 нм.

Общее содержание каротиноидов было вычислено по формуле:

$$(1000 \times A_{470} - 3,27 \times X_a - 104 \times X_b) / 229$$

$$X_a = 12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646} \text{ и}$$

$$X_b = 20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663}$$

X_a и X_b – содержание хлорофиллов а и б в мг/мл [8].

Статистическая обработка данных проведена стандартными методами с использованием программ EXCEL и STATGRAFICS [2].

Результаты и их обсуждение

С территории техногенных полигонов Верхнекамского месторождения калийных солей были отобраны галофитные растения, с поверхности которых выделены изоляты солеустойчивых бактерий. Известно, что штаммы различных бактерий способны стимулировать рост растений, используя L-триптофан корневых выделений для микробного продуцирования ауксинов. Индолил-3-уксусная кислота является основным координирующим сигналом в развитии растений. Среди бактериальных изолятов способностью к синтезу ИУК при выращивании на солевой среде (50,0 г/л NaCl) с добавлением пирувата (1,0 г/л) и триптофана (200 мкг/мл) обладали 2 штамма

галотолерантных азотфиксирующих бактерий A1 и A15, изолированные с поверхности солеустойчивых растений Осота полевого (*Sonchus arvensis* L.) и Клевера лугового (*Trifolium pratense* L.). Кроме фиксации атмосферного азота, в качестве источника азота бактерии использовали нитратные и аммонийные соли. При росте бактериальных культур в диапазоне соли 0 – 5.0 % NaCl и температуре 4-37 °С были выявлены оптимальные условия для роста бактерий и синтеза ИУК – 0.5 % NaCl и 27 °С. Методами классической филогении была определена таксономическая принадлежность этих бактерий к роду *Pantoea*. Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК штаммов A1 и A15 были включены в международную базу данных Genbank под номерами KP115327 и KM235113, соответственно.

Для определения сроков максимального выхода ИУК проводили предварительные эксперименты по изучению динамики синтеза ауксина в процессе периодического культивирования солеустойчивых бактерий (таблица 1). По накоплению ИУК в культуральной жидкости ассоциативные бактерии рода *Pantoea* не уступали, а в ряде случаев и превосходили известных представителей группы РСРБ бактерий (псевдомонады, флавобактерии, агробактерии), оказывающих стимулирующее влияние на рост растений. Сопоставление динамики бактериальной биомассы и концентрации ИУК в культуральной жидкости показало, что максимум накопления ауксинов у исследованных культур приходился на стационарную фазу роста (таблица 1), что совпадало с данными других исследователей, изучавших зависимость образования ауксинов от фазы роста бактериальных культур [3]. Продолжительность периода накопления ИУК в культуральной жидкости 3-х вариантов составляла 6 суток, только в варианте штамма *Pantoea vagans* A15, культивируемого при 1 % NaCl, торможение синтеза ИУК происходило через 4 суток. Снижение концентрации синтезированного ИУК в среде происходило на следующие сутки после выхода бактериальных культур в стационарную фазу роста. Возможно, бактериальные клетки использовали часть ауксина из культуральной жидкости для синтеза новых вторичных метаболитов, необходимых клеткам для выживания. Повышение минерализации среды при добавлении до 1 % NaCl приводило к снижению количества ауксина с 64 до 49 мкг/мл и с 43 до 35 мкг/мл, синтезируемого бактериями *Pantoea vagans* A1 и *Pantoea vagans* A15, соответственно. Генетическая гетерогенность среди бактерий вида *Pantoea vagans* проявлялась также при оценке степени использования клетками L-триптофана в качестве прекурсора в метаболизме ИУК, повышение солевой концентрации среды снижало потребление триптофана с 31,4 % до 24,0 % и с 21,1 до 17,2 %, штаммами A1 и A15, соответственно.

Таблица 1

Образование ИУК азотфиксирующими бактериями *Pantoea vagans* на синтетической среде с пируватом и триптофаном при периодическом культивировании

Сутки	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Pantoea vagans</i> A1 (0 % NaCl)								
ИУК, мкг/мл	19,7	37,0	48,0	54,7	55,3	64,0	63,0	60,0
ОП ₅₉₀	0,079	0,095	0,113	0,114	0,115	0,113	0,113	0,113
ИУК, мкг/ед. ОП	247,9	389,5	426,7	479,5	481,2	568,9	560	533,3
Использование L-триптофана, %	9,6	18,1	23,5	26,8	27,1	31,4	30,9	29,4
<i>Pantoea vagans</i> A1 (1 % NaCl)								
ИУК, мкг/мл	19,7	35,0	39,0	43,7	43,7	49,0	48,7	40,0
ОП ₅₉₀	0,085	0,110	0,123	0,130	0,119	0,119	0,119	0,119
ИУК, мкг/ед. ОП	231,5	318,2	316,2	335,9	366,9	411,8	408,96	336
Использование L-триптофана, %	9,6	17,2	19,0	21,4	21,4	24,0	23,8	19,6
<i>Pantoea vagans</i> A15 (0 % NaCl)								
ИУК, мкг/мл	16,3	33,3	39,0	42,7	43,0	42,7	42,0	39,3
ОП ₅₉₀	0,068	0,094	0,105	0,125	0,123	0,105	0,105	0,105
ИУК, мкг/ед. ОП	241,98	354,7	371,4	341,3	351	406,3	400	374,6
Использование L-триптофана, %	8,0	16,3	19,11	20,9	21,1	20,9	20,58	19,3
<i>Pantoea vagans</i> A15 (1 % NaCl)								
ИУК, мкг/мл	16,0	30,3	31,7	35,0	33,7	31,0	28,7	28,7
ОП ₅₉₀	0,085	0,098	0,099	0,105	0,105	0,105	0,095	0,095
ИУК, мкг/ед. ОП	188,2	311,1	319,9	333,3	320,6	295,2	301,8	301,8
Использование L-триптофана, %	7,9	14,9	15,5	17,2	16,5	15,2	14,1	14,1

Изучение влияния бактериальных препаратов на развитие проростков пшеницы показало, что наиболее видимые морфологические изменения проростков наблюдались при обработке препаратом бактерий *P. vagans* A15 (таблица 2). При 0,5 % NaCl в почве на 6-е сутки зафиксировали увеличение длины корня в 4 раза. Прибавка массы побега достигала 112 %, а прибавка корня 64 %. На 8-е сутки происходило утолщение корней проростков с увеличением массы корня в 2,5 раза и прибавкой в длине корня на 165 %. Влияние препаратов бактерий *P. vagans* A1 и *P. vagans* A15 на проростки при увеличении концентрации соли до 1 % NaCl приводило на 6-е сутки к небольшой прибавке в массе побега на 25 и 35 % и прибавке в массе корня на 53 и 73 %, соответственно. Бактерии *P.*

vagans A15 на 8-е сутки продолжали стимулировать небольшой прирост побегов и корней при 1 % NaCl в почвенном растворе.

Таблица 2

Влияние обработки проростков пшеницы бактериальными препаратами на морфологические параметры проростков пшеницы (% , от контроля)

Вариант	Прибавка в длине побега, %	Прибавка в массе побега, %	Прибавка в длине корня, %	Прибавка в массе корня, %
0,5% NaCl				
<i>P. vagans</i> A1 6 сутки	–	36*	–	39*
<i>P. vagans</i> A1 8 сутки	–	–	–	–
<i>P. vagans</i> A15 6 сутки	5*	112*	300*	64*
<i>P. vagans</i> A15 8 сутки	–	30*	165*	150*
1,0% NaCl				
<i>P. vagans</i> A1 6 сутки	–	25*	–	53*
<i>P. vagans</i> A1 8 сутки	–	–	–	–
<i>P. vagans</i> A15 6 сутки	–	35*	–	73*
<i>P. vagans</i> A15 8 сутки	8*	25*	32*	9*

* – данные статистически достоверны.

В результате предобработки проростков пшеницы препаратами галотолерантных азотфиксирующих бактерий наблюдалось статистически достоверное увеличение содержания фотосинтетических пигментов в растении при воздействии на проростки солевого стресса (таблица 3). Изучение динамики содержания хлорофиллов *a* и *b*, каротиноидов в проростках пшеницы в условиях натрий-хлоридного засоления почвы показало, что наиболее высокое содержание хлорофиллов при 0,5 % NaCl было зафиксировано при симбиозе растения с бактериями *P. vagans* A15 на 3-е сутки (272 %), а для *P. vagans* A1 на 6-е сутки (241 %). Примечательно, что на 6-е сутки при 0,5 % NaCl бактерии *P. vagans* A1 и *P. vagans* A15 активировали дополнительно антиоксидантную защиту растений за счет увеличения концентрации каротиноидов на 140 % и 33 %, соответственно. Повышение в почве солевой концентрации до 1 % NaCl приводило к многократному снижению эффекта микробной активации биосинтеза фотосинтетических пигментов в проростках пшеницы.

Таблица 3

Динамика содержания фотосинтетических пигментов в проростках пшеницы, обработанных бактериальными суспензиями азотфиксаторов при солевом стрессе (% , от контроля)

Вариант	Увеличение концентрации хлорофиллов, %	Увеличение концентрации каротиноидов, %	Увеличение концентрации хлорофиллов, %	Увеличение концентрации каротиноидов, %
	0,5 % NaCl		1,0 % NaCl	
<i>P. vagans</i> A1 3 сутки	–	–	–	–
<i>P. vagans</i> A1 6 сутки	241*	140*	14*	–
<i>P. vagans</i> A1 8 сутки	–	–	45*	–
<i>P. vagans</i> A15 3 сутки	272*	7*	82*	30*
<i>P. vagans</i> A15 6 сутки	53*	33*	8*	–
<i>P. vagans</i> A15 8 сутки	–	–	17*	4*

* – данные статистически достоверны.

Заключение

Полученные результаты указывают на тот факт, что ассоциативные солеустойчивые азотфиксирующие микроорганизмы играют важную роль не только в азотном и углеродном балансе почвы, но также необходимы для снижения солевого стресса в онтогенезе растений, выращиваемых на засоленных почвах. При изучении продуктивности микробного синтеза индолил-3-уксусной кислоты была выявлена генетическая гетерогенность среди галотолерантных бактерий вида *Pantoea vagans*, штаммовые различия в синтезе ауксина также сохранялись при повышении концентрации соли в среде. Направленность происходящих изменений в онтогенезе пшеницы зависела от конкретной бактерии-продуцента ИУК и времени инкубации. Наиболее выраженное комплексное воздействие ассоциативных бактерий на развитие корней и побегов пшеницы было отмечено на 6-е сутки одновременно с максимумом синтеза бактериями ИУК. Обработка проростков пшеницы бактериальными препаратами позволила снизить влияние солевого стресса на фотосинтетический аппарат растений. В условиях натрий-хлоридного засоления почвы временная динамика содержания хлорофиллов и каротиноидов (мг/г сырой массы) в проростках пшеницы, обработанных бактериальными суспензиями азотфиксаторов, зависела от генетической гетерогенности галотолерантных бактерий вида *Pantoea vagans*. Таким образом, все перечисленные характеристики солеустойчивых азотфиксирующих бактерий *Pantoea vagans* делают их перспективными для создания микробиологических биопрепаратов, необходимых для повышения урожайности пшеницы на засоленных почвах.

Список литературы

1. Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. – М.: ГЕОС, 2001. – 500 с.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
3. Мерзаева О.В., Широких И.Г. Образование ауксинов эндофитными актинобактериями озимой ржи // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т.46. – № 1. – С. 51-57.
4. Яхин О.И., Лубянов А.А., Яхин И.А. Современные представления о биостимуляторах // Агрехимия. – 2011. – № 7. – С. 85-90.
5. Damodaran T., Rai R.B., Jha S.K., Kannan R., Pandey B.K., Sah Vijayalaxmi, Mishra V.K., Sharma D.K. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of salt tolerance in gladiolus grown in sodic soils // J. Plant Interactions. – 2014. – V. 9(1). – P. 577-584.
6. Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indole-acetic acid // Plant Physiol. – 1951. – V. 26. – P. 192-195.
7. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F., Kloepper J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops // Can. J. Microbiology. – 1997. – V. 43 (10). – P. 895-914.
8. Sohrabi Y., Heidari G., Weisany W., Golezani K.G., Mohammadi K. Changes of antioxidative enzymes, lipid peroxidation and chlorophyll content in chickpea types colonized by different *Glomus* species under drought stress // Symbiosis. – 2012. – V. 56. – P. 5-18.

Рецензенты:

Октябрьский О.Н., д.б.н., зав. лабораторией ЛФГМ Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, профессор кафедры химии и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский политехнический университет» Минобрнауки России, г. Пермь;

Смирнова Г.В., д.б.н., в.н.с. ЛФГМ Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь.