

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ВЛИЯНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МЕРЗЛЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ, НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Кулакова А. Ю.¹, Доманская О. В.^{1,2}, Доманский В. О.^{1,3}

¹Тюменский государственный нефтегазовый университет, Тюмень, Россия, e-mail: kulakova.aleksa@bk.ru

²Тюменский научный центр СО РАН, Тюмень, Россия

³Институт криосферы Земли СО РАН, Тюмень, Россия

В работе представлены результаты применения по влиянию штаммов бактерий (*Bacillus simplex* и *Bacillus megaterium*), выделенные из мерзлых отложений в качестве протравителя на примере озимой пшеницы сорта Тюменская-1. Для оценки эффективности применения бактериальных штаммов в качестве протравителя, эталонами служили препараты биологического происхождения – Фитоспорин-М и химического – Раксил Ультра. Проведенные исследования показали что, действие *Bacillus simplex* и *Bacillus megaterium* при предпосевной обработке семян способствовали улучшению изучаемых показателей, а также не уступали известному фунгициду Раксил Ультра и превышали таковые показатели в сравнении с биологическим препаратом Фитоспорин-М. Выделенные микроорганизмы из ММП являются перспективными агентами для применения в сельскохозяйственной практике в качестве основы для полифункционального биопрепарата.

Ключевые слова: бактерии, многолетнемерзлые породы, протравители, биопрепарат, озимая пшеница, ростостимуляция.

EVALUATING THE EFFECTIVENESS OF INFLUENCE OF BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM PERMAFROST WESTERN SIBERIA TO THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF WINTER WHEAT

Kulakova A. YU.¹, Domanskaya O. V.^{1,2}, Domanskiy V. O.^{1,3}

¹Tyumen State Oil and Gas University, Tyumen, Russia, e-mail: kulakova.aleksa@bk.ru

²Tyumen Scientific Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russia

³Institute of Earth Cryosphere SB RAS, Tyumen, Russia

The results on the effect of the use of bacterial strains (*Bacillus simplex* u *Bacillus megaterium*) isolated from permafrost as a disinfectant on the example winter wheat varieties Tyumen-1. To evaluate the efficacy of bacterial strains as a disinfectant, the standards were agents of biological origin – Fitosporin – M and the chemical – Raksil Ultra. Studies have shown that the action of *Bacillus simplex* and *Bacillus megaterium* preliminary treatment of seeds improved the studied parameters, as well as not inferior to known fungicides and Raksil Ultra – exceeded those figures in comparison with the biological drug Fitosporin-M. Isolated microorganisms from the permafrost are promising agents for use in agricultural practices as a basis for a multifunctional biological product.

Keywords: bacteria, permafrost, disinfectants, biological product, winter wheat, stimulation of growth.

Одной из ведущих злаковых культур мирового потребления является пшеница, зерно которой на одну треть обеспечивает суточную потребность организма человека в энергетическом материале и почти на одну четверть в белковых веществах.

В условиях нашей страны среди зерновых колосовых культур самой высокой потенциальной продуктивностью отличается озимая пшеница. По сравнению с яровыми формами зерновых, она полнее использует солнечную энергию, осенне-весеннюю влагу и питательные вещества почвы.

В условиях Сибири озимая пшеница используется слабо, так как недостаточно освоена агротехнология возделывания районированных зимостойких сортов. Отрицательное воздействие оказывают целый ряд природно-климатических факторов: резкие колебания температур деятельного слоя, низкая влажность воздуха в период активной вегетации, ливни, град и т.д.

Наряду с агротехникой и климатическими факторами гибель посевов могут вызывать патогены микробного и грибного происхождения. Ежегодные потери урожая пшеницы от различных фитопатогенов достигают около 25 % урожая [8].

В настоящее время против вредителей и болезней сельскохозяйственных культур в большинстве случаев применяются химические средства защиты растений. Следует отметить, что наряду с высокой эффективностью в подавлении численности вредных организмов, пестициды вызывают резистентность патогенов и появление видов не восприимчивых к химическим воздействиям.

Несмотря на это, химический метод, бесспорно, продолжает оставаться важнейшим средством оперативного сдерживания патогенов, однако ухудшение фитосанитарной обстановки и общей экологической ситуации в регионах России требуют новых подходов в развитии и использовании средств и способов биологической защиты.

Биологическая защита растений на современном этапе включает применение биопрепаратов на основе живых культур микроорганизмов. Известно, что микроорганизмы являются источником доступных для растений элементов минерального питания и способны выделять различные антибиотические вещества, защищающие растения от болезней и вредителей [4].

Эффективность биологических средств защиты во многом определяется выбором микроорганизмов, способных обеспечить защиту в течение вегетационного периода растения. Потенциальными биологическими агентами, перспективными для защиты растений от фитопатогенов, могут быть бактериальные штаммы, выделенные из многолетнемерзлых пород (ММП), отличающиеся устойчивостью к почвенно-климатическим условиям Севера. Большинство биопрепаратов на основе мезофильных штаммов бактерий малоэффективны в условиях низких температур, приходящихся на начало вегетации растений, когда они наиболее сильно подвержены воздействию фитопатогенных микроорганизмов. Использование бактерий выделенных из ММП может стать альтернативой как широко используемым фунгицидам, так и биологическим препаратам предшествующего поколения.

Цель работы – определение эффективности предпосевной обработки семян озимой пшеницы бактериальными штаммами, выделенные из многолетнемерзлых пород Западной Сибири.

Материалы и методы

В качестве материала исследований были использованы семена озимой пшеницы сорта Тюменская-1 (2013 г.), предоставленные научно-исследовательским институтом сельского хозяйства Северного Зауралья (ФГБНУ «НИИСХ Северного Зауралья»).

В качестве протравителя использовались бактериальные штаммы *Bacillus simplex* и *Bacillus megaterium*, выделенные авторами из мерзлых отложений Западной Сибири (Пуровский район). Эталонами для оценки эффективности применения бактериальных штаммов, в качестве протравителя, явились препараты биологического происхождения – «Фитоспорин-М» и химического – «Раксил Ультра». Оба препарата официально рекомендованы к применению на территории РФ против грибных и микробных фитопатогенов [2]. Бактериальные штаммы *Bacillus simplex* и *Bacillus megaterium* выращивали на питательной среде следующего состава, (г/л): K_2HPO_4 – 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; пептон – 2,0; дрожжевой экстракт – 5,0; сахароза – 2,0. Культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера на шейкере LOIP LS-120 со скорости вращения 140 об/мин, при температуре +25 °С и +5 °С в течение 50 ч и 72 ч соответственно. Оценку титра жизнеспособных клеток определяли методом Коха [10].

Варианты лабораторного опыта: 1. Контроль; 2. «Фитоспорин-М»; 3. «Раксил Ультра»; 4. *Bacillus simplex* (+25°C); 5. *Bacillus simplex* (+5°C); 6. *Bacillus megaterium* (+25°C); 7. *Bacillus megaterium* (+5°C); 8. *Bacillus simplex* + *Bacillus megaterium* (+25°C); 9. *Bacillus simplex* + *Bacillus megaterium* (+5°C).

При проведении опыта, семена озимой пшеницы сорта Тюменская – 1 обрабатывали бактериальной суспензией с титром 10^8 – 10^9 кл/мл и выдерживали в течение 2 ч при 22 ± 2 °С. Обработку семян препаратами «Фитоспорин-М» и «Раксил Ультра» проводили согласно рекомендациям производителя. Контрольные семена замачивали в стерилизованной водопроводной воде.

Семена озимой пшеницы проращивали в сосудах со стерилизованным песком, равномерно увлажненным раствором Кнопа, при температуре 22 ± 2 °С и люминесцентном освещении (6 тыс. лк.) в режиме: 14 часов – свет, 10 часов – темнота. Сроки полива растений определялись визуально по состоянию субстрата. Каждый вариант опыта включал четыре повторности, по 50 семян. На 14 день вегетационного эксперимента растения извлекались из субстрата. С целью сохранения целостности корневой системы корни отделяли от субстрата, промывая водой. Из морфометрических показателей растений определяли следующие

показатели: длину надземных и подземных частей, их массу и площадь первого листа. Содержание хлорофиллов А+В и внутриклеточных фенольных соединений в проростках пшеницы определяли спектрофотометрическим методом, содержание аскорбиновой кислоты определяли йодатным методом [9].

Математическую обработку опытных данных проводили с использованием программного средства для анализа и визуализации данных – R, версия 3.2.0 (Free Software Foundation, Inc Boston, MA).

Результаты и обсуждение

Микроорганизмы, выделенные из ММП, в последнее десятилетие широко используются в различных отраслях промышленности. Одними из перспективных продуцентов биологически активных веществ являются бактерии, относящиеся к роду *Bacillus*. Это обусловлено высокой выживаемостью их во внешней среде, толерантностью к антропогенным воздействиям, технологичностью в производстве и применении. Продуцируемые этими бактериями биологически активные вещества подавляют рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Для развития любого микроорганизма существуют определенные температурные и pH оптимумы, при которых обеспечивается максимальный рост, выход целевого продукта и т.д. Температурные границы для большинства видов рода *Bacillus* довольно широкие – от 4 ° до 43 °С. Многие виды этого рода являются мезофилами и развиваются при 27–30 °С [6]. По результатам изучения влияния температуры на особенности роста *Bacillus simplex* и *Bacillus megaterium* был установлен оптимальный температурный диапазон роста: от +5 до +25 °С [3].

При фитопатологическом анализе пшеницы сорт Тюменская-1 доминировали представители рода *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria* и *Fusarium*, вызывающие плесневение семян. Результаты исследования лабораторной всхожести (Гост 12038-84) протравленных семян показали, что при обработке препаратом «Раксил Ультра» всхожесть по сравнению с контролем снижалась на 20 %, а в остальных вариантах опыта оставалась на уровне контроля.

Результаты биометрических показателей проростков озимой пшеницы представлены в табл. 1. Максимальное статистически достоверное увеличение наблюдалось в длине подземной части растений после обработки семян бактериальными штаммами *Bacillus simplex* ($p=0,04$) и *Bacillus megaterium* ($p=0,01$) при температуре культивирования +5 °С, а также после обработки семян штаммом *Bacillus megaterium* ($p=0,00$) с температурой культивирования +25 °С. Масса надземной части проростков пшеницы повышалась только после инокуляции семян бактериальным штаммом *Bacillus simplex* +25 °С ($p=0,00$).

Химический препарат «Раксил Ультра» снижал показатели длины и массы проростков пшеницы по отношению к контролю. Это объясняется тем, что входящее в состав препарата «Раксил Ультра» вещество тебуконазол способствует замедлению синтеза гиббереллинов и действует как регулятор роста, тем самым не допуская на начальной стадии онтогенеза чрезмерного развития надземной части и способствует интенсивному развитию корневой системы. При обработке бактериальными штаммами и препаратом «Фитоспорин-М» статистически достоверных различий с контролем не выявлено.

Таблица 1

Влияние обработки препаратов «Раксил Ультра», «Фитоспорин-М» и перспективных бактериальных штаммов на биометрические показатели проростков озимой пшеницы

Обработка	Длина надземной части, мм	Длина подземной части, мм	Масса надземной части, г	Масса подземной части, г	S листовой поверхности, см ²
Раксил-ультра	18,50	9,92	0,16	0,14	2,77
	<u>23,74</u>	<u>10,63</u>	<u>0,17</u>	<u>0,17</u>	<u>3,40</u>
Фитоспорин-М	23,22	9,35	0,17	0,16	3,13
	<u>20,92</u>	<u>9,12</u>	<u>0,13</u>	<u>0,12</u>	<u>3,53</u>
<i>Bacillus simplex</i> +5°C	24,63	9,33	0,17	0,10	3,86
	<u>24,15</u>	<u>9,27</u>	<u>0,16</u>	<u>0,09</u>	<u>3,73</u>
<i>Bacillus simplex</i> +25°C	24,64	10,33	0,18	0,11	3,25
	<u>24,13</u>	<u>9,89</u>	<u>0,17</u>	<u>0,13</u>	<u>3,22</u>
<i>Bacillus megaterium</i> +5°C	24,54	10,75	0,16	0,10	4,05
	<u>24,13</u>	<u>9,98</u>	<u>0,17</u>	<u>0,11</u>	<u>3,94</u>
<i>Bacillus megaterium</i> +25°C	25,12	10,40	0,15	0,10	4,00
	<u>24,99</u>	<u>9,72</u>	<u>0,18</u>	<u>0,10</u>	<u>4,16</u>
<i>Bacillus simplex</i> + <i>megaterium</i> +5°C	22,92	9,47	0,17	0,10	3,73
	<u>24,13</u>	<u>9,98</u>	<u>0,17</u>	<u>0,11</u>	<u>3,94</u>
<i>Bacillus simplex</i> + <i>megaterium</i> +25°C	24,75	8,99	0,18	0,09	4,06
	<u>24,81</u>	<u>9,17</u>	<u>0,18</u>	<u>0,10</u>	<u>3,97</u>

Примечание: над чертой – значение опытного варианта; под чертой – значение контрольного варианта.

По результатам проведенных исследований было установлено, что штаммы микроорганизмов, выделенных из ММП, могут избирательно влиять на рост и развитие растений, оказывая как стимулирующее, так и ингибирующее действие.

Известно, что площадь листовой поверхности растения позволяет оценить фотосинтетический потенциал и интенсивность его работы. Лист обладает наибольшими приспособительными качествами к условиям среды, что выражается в изменении площади ассимиляционной поверхности растения [1]. Анализ проростков пшеницы показал, что общая площадь листовой поверхности в варианте с «Фитоспорин-М» и бактериальными штаммами из ММП не превышает уровня контрольного варианта и статистически

достоверно снижается при обработке препаратом «Раксил Ультра» ($p=0,01$), результаты представлены в табл.1.

Общее содержание хлорофиллов А + В в двухнедельных проростках пшеницы количественно увеличивалось после обработки семян препаратом «Раксил Ультра» (рис. 1). Такой «озеленяющий эффект» растений после обработки препаратами химической природы вызван ингибированием этилена – гормона стресса. Растения продуцируют этилен в ответ на повреждение или в результате атаки патогенов. Сокращение выработки этилена может лимитировать природный ответ на стресс и визуально выражается в озеленяющем действии на растение.

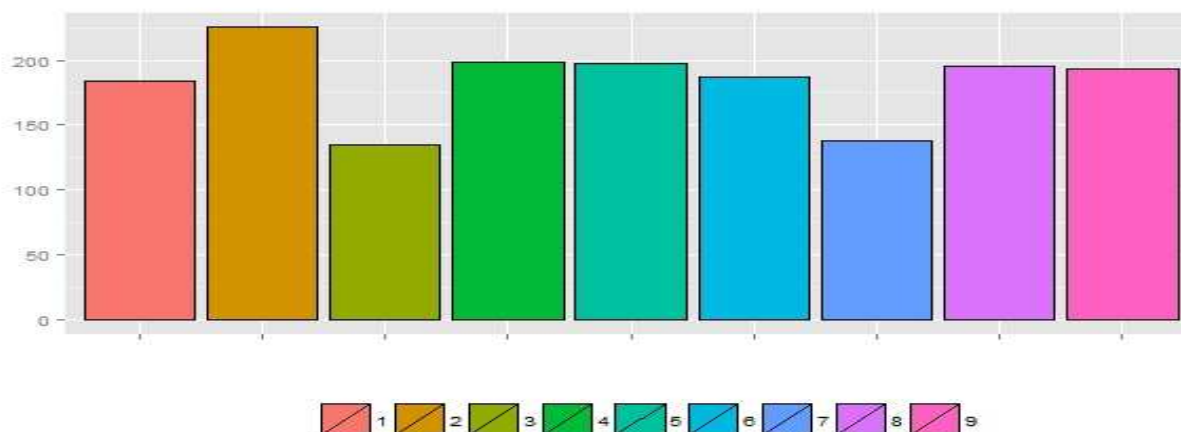


Рис.1. Общее содержание хлорофиллов А+В в проростках озимой пшеницы сорта Тюменская-1:1. Контроль; 2. «Раксил Ультра»; 3. «Фитоспорин-М»; 4. *Bacillus simplex* +5°C; 5. *Bacillus simplex* +25°C; 6. *Bacillus megaterium* +5°C; 7. *Bacillus megaterium* +25°C; 8. *Bacillus simplex* + *Bacillus megaterium* +5°C; 9. *Bacillus simplex* + *Bacillus megaterium* +25°C

Незначительное повышение общего содержания хлорофиллов А + В наблюдалось после обработки бактериальными штаммами *Bacillus simplex* и *Bacillus simplex*+*Bacillus megaterium* при температуре культивирования +5 и +25°C, а при обработке препаратом «Фитоспорин-М», наоборот, количественно снижалось по сравнению с контрольным вариантом.

В адаптации растений к изменениям условий окружающей среды важную роль отводят веществам фенольной природы, которые являются уникальными вторичными метаболитами. Они обладают широким биологическим действием, регулируют ряд внутриклеточных процессов, оказывают влияние на синтез белков и нуклеиновых кислот [5]. Количество фенольных соединений возрастает при повреждениях: механических, химических, биологических, например, грибами, бактериями или вирусами с возможным образованием новых фенольных соединений, таких как фитоалексины и др. [11].

По результатам исследований выявлено, что количество внутриклеточных фенольных соединений в проростках пшеницы повышается при воздействии всех исследуемых

бактериальных штаммов, кроме *Bacillus simplex* с температурой культивирования +25 °С (рис.2). В подземной же части растений содержание фенолов увеличивается только при обработке штаммами *Bacillus simplex* и *Bacillus simplex*+*Bacillus megaterium* с температурой культивирования +5 °С. Возможно, это объясняется тем, что при низких положительных температурах штамм *Bacillus simplex* выделяет метаболиты, под влиянием которых происходит увеличение активности ферментов биосинтеза фенольных соединений. Кроме того, повышение содержания фенольных соединений в растительном организме свидетельствует о повышении их иммунитета. При воздействии препаратов «Раксил Ультра» и «Фитоспорин-М» в проростках пшеницы количество внутриклеточных фенольных соединений снижается.

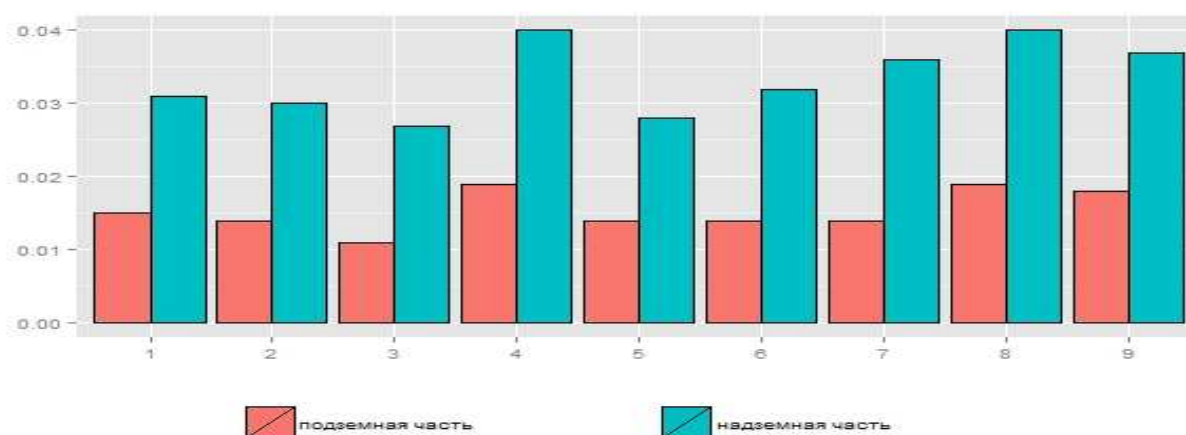


Рис. 2. Содержание внутриклеточных фенольных соединений в надземной и подземной части проростков озимой пшеницы сорта Тюменская-1: 1. Контроль; 2. «Раксил Ультра»; 3. «Фитоспорин-М»; 4. *Bacillus simplex* +5 °С; 5. *Bacillus simplex* +25 °С; 6. *Bacillus megaterium* +5 °С; 7. *Bacillus megaterium* +25 °С; 8. *Bacillus simplex* + *Bacillus megaterium* +5 °С; 9. *Bacillus simplex* + *Bacillus megaterium* +25 °С

Известна прямая связь между накоплением аскорбиновой кислоты и устойчивостью к действию неблагоприятных факторов среды. Исследователи отмечают, что в северных районах содержание витамина С в листьях, стеблях, корнях и плодах значительно больше, чем в растениях, возделываемых на юге. Например, в проростках гороха и пшеницы, культивируемых при температуре +6°С, количество аскорбиновой кислоты значительно выше, чем в таких же проростках, выращенных при +25°С. Накопление витамина связано с устойчивостью растений к холоду [7].

Анализ общего содержания аскорбиновой кислоты в проростках пшеницы показал, что содержание витамина С увеличивалось при обработке семян бактериальными штаммами, в отличие от препаратов «Раксил Ультра» и «Фитоспорин-М», которые снижали содержание аскорбиновой кислоты в побегах растений, по сравнению с контролем (рис. 3).

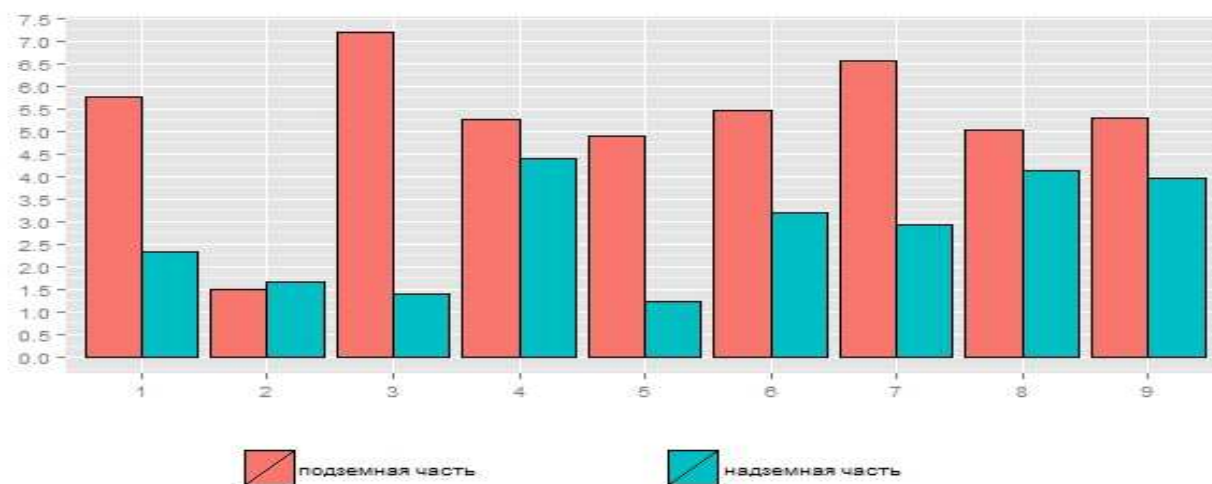


Рис. 3. Содержание аскорбиновой кислоты в надземной и подземной части проростков озимой пшеницы сорта Тюменская-1. 1. Контроль; 2. «Раксил Ультра»; 3. «Фитоспорин-М»; 4. *Bacillus simplex* +5 °C; 5. *Bacillus simplex* +25 °C; 6. *Bacillus megaterium* +5 °C; 7. *Bacillus megaterium* +25 °C; 8. *Bacillus simplex* + *Bacillus megaterium* +5 °C; 9. *Bacillus simplex* + *Bacillus megaterium* +25 °C

Заключение

Таким образом, выделенные из мерзлых отложений бактериальные штаммы не уступают, а в некоторых случаях превышают ростостимулирующую и биохимическую активность эталонных протравителей «Раксил Ультра» и «Фитоспорин-М». Отмечено, что предпосевная обработка бактериальными штаммами рода *Bacillus* в качестве протравителей была эффективна как при +5 °C, так и при +25 °C. Следовательно, выделенные микроорганизмы из ММП являются перспективными агентами для применения в сельскохозяйственной практике в качестве основы для полифункционального биопрепарата.

Список литературы

1. Горышина Т. К. Экология растений / Т. К. Горышина. – М.: Высшая школа, 1979. – 369 с.
2. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. – М.: Федеральное агентство по сельскому хозяйству (Россельхоз) Минсельхоза РФ, 2015. – 735 с.
3. Доманская О.В., Доманский В.О., Кулакова А.Ю. Изучение кинетических параметров роста бактерий рода *Bacillus*, выделенных из многолетнемерзлых пород (Западная Сибирь, ЯНАО) // Арктика, Субарктика: мозаичность, контрастность, вариативность криосферы: тезисы докл. Междунар. конф. – Тюмень, 2015. – С. 93-96.
4. Дятлова К.Д. Микробные препараты в растениеводстве // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – № 5. – С.17-22.

5. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. – М.: Наука, 1993. – 245 с.
6. Морозкина Е.В., Слуцкая Э.С., Федорова Т.В. и др. Экстремофильные микроорганизмы: биохимическая адаптация и биотехнологическое применение // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т.46, № 1. – С. 5-20.
7. Овчаров К.Е. Тайны зеленого растения. – М.: Наука, 1973. – С. 44-49.
8. Обзор фитосанитарного состояния посевов сельскохозяйственных культур в российской Федерации в 2014 году и прогноз развития вредных объектов в 2015 году / ФГБУ «Россельхозцентр», 2015. – 717 с.
9. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений / Х.Н. Починок. – Киев: Наук. думка, 1976. – 336 с.
10. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.; под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
11. Wink V. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective // *Phytochemistry*. – 2003. – V. 64. – P. 3–19.

Рецензенты:

Мельников В.П., д.г.-м.н., председатель ТюмНЦ СО РАН, г. Тюмень;

Боме Н.А., д.с.-х.н., профессор, заведующая кафедрой ботаники, биотехнологии и ландшафтной архитектуры, ФГБОУ ВО «Тюменский государственный университет» Минобрнауки России, г. Тюмень.