

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ *TRITICUM AESTIVUM* В УСЛОВИЯХ СОВМЕСТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ КАДМИЯ И СВИНЦА

Смирнова Ю.В.¹, Курамшина З.М.¹, Хорохорина Е.Е.¹, Хайруллин Р.М.²

¹ ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Стерлитамакский филиал, Стерлитамак, e-mail: kuramshina_zilya@mail.ru

² ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа, e-mail: krm62@mail.ru

Изучено влияние предварительной инокуляции семян клетками эндофитного штамма бактерий *Bacillus subtilis* 26Д на рост побегов и активность антиоксидантных ферментов *Triticum aestivum* при совместном и раздельном действии кадмия и свинца. Инокуляция семян клетками бактерий *B. subtilis* 26Д способствовала лучшему росту растений пшеницы в почве, как при совместном действии металлов, так и при раздельном. Активность каталазы и пероксидазы в тканях растений при раздельном действии металлов повышалась у инокулированных и неинокулированных растений (за исключением действия свинца при высоких концентрациях), при совместном действии наблюдали падение активности каталазы. Инокуляция семян растений бактериями способствовала снижению интенсивности перекисного окисления липидов в тканях растений как при совместном, так и при раздельном действии тяжелых металлов. Протекторный эффект *B. subtilis* 26Д обусловлен биологической активностью бактерий, продуцирующих большое количество биологически активных веществ.

Ключевые слова: пшеница, эндофитные штаммы *Bacillus subtilis*, кадмий, свинец, окислительный стресс, антиоксидантные ферменты.

INFLUENCE OF BACTERIA *BACILLUS SUBTILIS* ANTIOXIDANT ENZYMES *TRITICUM AESTIVUM* UNDER THE JOINT ACTION OF CADMIUM AND LEAD

Smirnova J.V.¹, Kuramshina Z.M.¹, Horohorina E.E.¹, Khairullin R.M.²

¹ Sterlitamak branch of the Bashkir State University, Sterlitamak, e-mail: kuramshina_zilya@mail.ru;

² Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Centre of RAS, Ufa, e-mail: krm62@mail.ru

Impact of inoculation of wheat seeds with endophytic strains of *B. subtilis* 26Д on the growth of shoots and the activity of antioxidant enzymes under joint and separate action of cadmium and lead was investigated. It was shown that the activity of catalase and peroxidase in plant tissues in the separate impact of metals increased in inoculated and uninoculated plants (with the exception of lead action at high concentrations), under the joint action of catalase activity observed fall. Moreover, inoculation of plant seeds with the bacteria contributed to reduce the intensity of lipid peroxidation in plant tissues as in joint and separate heavy metals action. Protective effect of *B. subtilis* 26Д due to the biological activity of bacteria that produce a large number of biologically active compounds.

Keywords: wheat, endophytic strains of *Bacillus subtilis*, cadmium, lead, oxidative stress, antioxidant enzymes.

Среди тяжелых металлов (ТМ), не относящихся к необходимым питательным элементам, кадмий (Cd) и свинец (Pb) являются наиболее распространенными и опасными. Загрязнение окружающей среды этими металлами обусловлено сжиганием жидкого и твердого топлива, выбросами металлоплавильных производств, сточных вод и частым применением фосфорных удобрений [9].

Связываясь на поверхности клеток или проникая в них, Cd и Pb взаимодействуют с функциональными группами белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и других биологически активных соединений, нарушая их структуру [14]. Общим следствием токсичности ТМ, в том числе кадмия и свинца, в растительном организме является

чрезмерное накопление активных форм кислорода (АФК), которые могут вызвать перекисное окисление липидов (ПОЛ), окисление белка, инактивацию ферментов, повреждение нуклеиновых кислот и др. [14]. Высшие растения выработали сложные системы антиоксидантной защиты клеток, важнейшим звеном которых являются антиоксидантные ферменты – каталаза и пероксидаза. Сохранение активности этих ферментов в условиях воздействия ТМ ряд исследователей связывают с устойчивостью растений к данному виду стресса [9, 14].

В настоящее время одним из перспективных направлений по повышению устойчивости растений к действию различных стрессовых факторов является использование экологически чистых технологий, основанных на применении эндофитных штаммов *Bacillus subtilis*, обладающих фунгицидной и ростстимулирующей активностями [6]. Бациллы продуцируют большое количество биологически активных веществ, таких как ферменты, в том числе антиоксидантные, антибиотики, различные аминокислоты [8]. Известен антистрессовый эффект *B. subtilis* (например, штаммы 26Д и 11ВМ) при воздействии на растения различных абиотических факторов (засоление, водный дефицит, действие ТМ) [2, 4-8, 13]. В литературе, однако, отсутствуют сведения о механизмах антистрессового эффекта этих бактерий, в том числе и при воздействии на растения ТМ. В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение влияния инокуляции семян пшеницы эндофитным штаммом *B. subtilis* 26Д на рост и активность антиоксидантных ферментов растений пшеницы в условиях совместного воздействия кадмия и свинца.

Материалы и методы

Растительный материал. Исследования проводили на растениях пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Омская-35). Перед проращиванием семена пшеницы калибровали, промывали в мыльной воде, ополаскивали, стерилизовали 96%-ным этанолом в течение 3 мин, затем трижды ополаскивали в дистиллированной воде.

Для обработки семян использовали бактерии *Bacillus subtilis* Cohn штамм 26Д, (деп. в коллекции ВНИИСХМ, № 128). Семена инокулировали бактериями из расчета на 1 г 20 мкл суспензии клеток с титром 1 млрд./мл.

Инокулированные и контрольные семена выращивали в вегетационных сосудах (15×15 см) на черноземе выщелоченном при температуре 18–20°C при равномерном освещении в лабораторных условиях. Металлы в почву вносили в виде растворов солей ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и/или $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) однократно после посева семян, концентрации готовили в пересчете на ионы металлов. Контрольные растения поливали дистиллированной водой. Измерение растений и отбор проб проводили на 30 сут. эксперимента.

Получение экстрактов из растительных тканей. Побеги растений, выращенных в почве с различной концентрацией ионов металлов, промывали в дистиллированной воде, удаляли избыток воды фильтровальной бумагой, взвешивали. Растительный материал гомогенизировали в 0,1М К-фосфатном буфере рН 6,0 (при определении пероксидазы) или в Трис буфере рН 7,8 (при определении каталазы и малонового альдегида) в соотношении навеска (г): экстрагент (мл) – 1:10, центрифугировали 10 минут при 8 тыс. об./мин. Надосадочную жидкость центрифугировали еще 10 минут при 16 тыс. об./мин. Надосадок использовали для определения активности ферментов и малонового диальдегида (МДА) [3, 11, 12].

Определение активности ферментов и малонового диальдегида. Активность пероксидазы оценивали согласно методике Хайруллина с соавторами, исходя из количества окисленного ортофенилендиамина [11]. Активность каталазы определяли согласно методике Королюк с соавторами. Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс [3]. Содержание МДА измеряли, используя метод Costa с соавторами, основанный на образовании окрашенного комплекса между МДА и тиобарбитуровой кислотой при нагревании [12]. Измерение оптической плотности окрашенных растворов проводили на спектрофотометре Unico 2800 (США).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных программ пакета Microsoft Office, данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Достоверность различий между средними определяли по критерию Стьюдента при уровне значимости $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

Влияние ионов ТМ на длину побегов пшеницы. В чистой почве показатели длины побегов, семена которых были инокулированы клетками бактерий, на 30-е сутки эксперимента были больше, чем у контрольных (необработанных) на 12% (табл. 1).

Ростстимулирующий эффект эндофитного штамма *B. subtilis* 26Д на растения на незагрязненных почвах связан, вероятно, со способностью этих микроорганизмов продуцировать различные биологически активные вещества, фитогормоны, улучшать минеральное питание растений [2, 8].

При наличии кадмия в почве (во всех исследованных концентрациях) наблюдали угнетение роста побегов необработанных растений пшеницы. Свинец, напротив, оказывал стимулирующее действие на рост побегов. Свинец в концентрациях 10 и 1500 мг/кг почвы стимулировал рост побегов необработанных бактериями растений на 1,2 и 11% по

сравнению с проростками, растущими в чистой почве. При совместном действии кадмия и свинца угнетения побегов также не наблюдали. Стимулирующий эффект совместного действия ТМ усиливался с увеличением концентрации кадмия и свинца в среде выращивания.

Инокуляция семян клетками бактерий способствовала лучшему росту растений пшеницы в почве, как при совместном действии металлов, так и при раздельном. При воздействии ионов кадмия в концентрациях 10 и 200 мг/кг почвы рост инокулированных растений был выше на 17 %, чем у неинокулированных при тех же концентрациях металла. Длина побегов инокулированных растений при действии свинца в концентрациях 10 и 1500 мг/кг почвы была больше на 13,5 и 12 %, чем у неинокулированных при тех же концентрациях металла. При совместном действии металлов в исследованных концентрациях рост инокулированных растений был выше на 5,8 и 3,3 %, чем у неинокулированных при низких и высоких концентрациях металлов, соответственно.

Таблица 1

Изменение длины побегов *Triticum aestivum* L. (см)
под влиянием эндофитных бактерий и ТМ

Концентрация ТМ, мг/кг почвы	Вариант	
	Без обработки	<i>B. subtilis</i> 26Д
0	25,6±1,4	28,7±0,9*
Cd 10	23,7±2,0	27,8±1,1*
Cd 200	23,0±1,5	26,9±0,6*
Pb 10	25,9±0,8	29,4±1,2*
Pb 1500	28,5±1,0	31,9±1,2*
Cd 10 + Pb 10	29,3±1,0	31,0±0,7*
Cd 200 + Pb 1500	30,5±0,9	31,5±1,0*

* обозначены достоверные отличия между показателями обработанных и необработанных бактериями растений при $p < 0.05$.

Влияние ионов кадмия и свинца на активность антиоксидантных ферментов и содержание МДА в побегах растений. У растений, обработанных бактериями и растущих в незагрязненной почве, активность ферментов антиоксидантной защиты была выше, чем у необработанных на 22% и 15,5%, для каталазы и пероксидазы соответственно (табл. 2).

Известно, что ионы ТМ индуцируют образование АФК и могут вызывать значительные отклонения в метаболизме клеток, что, несомненно, отражается на активности антиоксидантных ферментов [14]. В нашей работе выявлено повышение активности каталазы

и пероксидазы в побегах контрольных растений, растущих в почве, содержащей кадмий или свинец. Активность исследованных ферментов была выше у инокулированных бактериями растений, исключение составила активность каталазы в тканях растений, обработанных бактериями, выращенных при концентрации свинца 1500 мг/кг почвы. При воздействии ионов кадмия активности ферментов инокулированных растений при концентрациях металлов 10 и 200 мг/кг почвы была выше на 30-33% и 16,8 и 80,2% соответственно для каталазы и пероксидазы, чем у неинокулированных при тех же концентрациях металла. Активность пероксидазы инокулированных растений при действии свинца в концентрациях 10 и 1500 мг/кг почвы была больше на 7 и 5,1%, чем у неинокулированных при тех же концентрациях металла.

Совместное действие ТМ на растения приводило к падению активности каталазы (в 4,5 раза) и повышению активности пероксидазы. Бактеризация семян не изменяла эту тенденцию, но активность ферментов в тканях инокулированных растений в большинстве вариантов опыта была выше, чем у необработанных проростков. Активность каталазы инокулированных растений была выше на 3,5 и 2,5%, а активность пероксидазы была выше на 14,5 и 31,8%, чем у неинокулированных при низких и высоких концентрациях металлов, соответственно.

Таблица 2

Влияние эндофитов и ТМ на активность антиоксидантных ферментов в побегах пшеницы

Концентрация ТМ, мг/кг почвы	Вариант	Фермент	
		каталаза, мг кат/л	пероксидаза, ед./(мг·с)
0	Без обработки	0,9±0,02	18,1±0,1
	<i>B. subtilis</i> 26Д	1,1±0,03*	20,9±0,2*
Cd 10	Без обработки	1,0±0,02	21,4±0,2
	<i>B. subtilis</i> 26Д	1,3±0,01*	25,0±0,2*
Cd 200	Без обработки	0,9±0,01	18,7±0,2
	<i>B. subtilis</i> 26Д	1,2±0,01*	33,7±0,1*
Pb 10	Без обработки	1,1±0,02	21,2±0,4
	<i>B. subtilis</i> 26Д	1,1±0,01	22,3±0,2*
Pb 1500	Без обработки	1,0±0,01	22,7±0,2
	<i>B. subtilis</i> 26Д	0,5±0,02*	25,0±0,2*
Cd 10 + Pb 10	Без обработки	0,2±0,01	24,1±0,2
	<i>B. subtilis</i> 26Д	0,7±0,02*	27,6±0,1*
Cd 200 + Pb 1500	Без обработки	0,2±0,01	22,9±0,1

	<i>B. subtilis</i> 26Д	0,5±0,01*	30,2±0,2*
--	------------------------	-----------	-----------

* обозначены достоверные отличия между показателями обработанных и необработанных бактериями растений при $p < 0.05$.

Окислительный стресс, индуцированный кадмием и/или свинцом, в растениях пшеницы, вероятно, гасился повышением активности каталазы и пероксидазы [14], уровень которых при токсическом действии ТМ был выше в бактеризованных растениях по сравнению с контрольными. Не исключено, что вклад в общую активность этих ферментов может вносить и бактериальная каталаза, так как согласно паспорту исследуемого штамма он способен ее продуцировать.

Одной из основных мишеней действия АФК являются липиды – основные компоненты клеточных мембран. АФК способны инициировать их перекисное окисление, в результате чего происходит повреждение этих структур, связанное с нарушением функций мембранных белков [9, 15]. Уровень МДА у растений, семена которых обрабатывались бактериями, как при выращивании в незагрязненной почве, так и в присутствии кадмия и свинца, а также при совместном действии ТМ был ниже необработанных, т.е. бактеризация семян способствовала, вероятно, сохранению целостности мембранных структур растительных клеток. Меньшее содержание продуктов ПОЛ в побегах пшеницы при действии ТМ может свидетельствовать об эффективной работе описанных выше ферментов.

Таблица 3

Концентрация малонового диальдегида в тканях побегов пшеницы,

10⁻⁵ нмоль/г сырого веса

Концентрация ТМ, мг/кг почвы	Вариант	
	Без обработки	<i>B. subtilis</i> 26Д
0	14,0±0,2	10,3±0,2*
Cd 10	13,7±0,2	10,1±0,1*
Cd 200	13,9±0,3	11,6±0,1*
Pb 10	13,3±0,2	12,0±0,3*
Pb 1500	12,7±0,2	10,1±0,3*
Cd 10 + Pb 10	14,0±0,3	10,2±0,2*
Cd 200 + Pb 1500	13,2±0,4	11,4±0,4*

* обозначены достоверные отличия между показателями обработанных и необработанных бактериями растений при $p < 0.05$.

Таким образом, повышение эндофитным штаммом бактерий *B. subtilis* 26Д устойчивости растений пшеницы к токсическому действию ТМ можно объяснить увеличением под влиянием этих микроорганизмов активности антиокислительных

ферментов каталазы и пероксидазы в растительных тканях, сдерживающих развитие окислительного стресса, что проявлялось в уменьшении продуктов ПОЛ.

Список литературы

1. Архипова Т.Н. Сравнение действия штаммов бактерий, различающихся по способности синтезировать цитокинины, на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы / Т.Н. Архипова, С.Ю. Веселов, А.И. Мелентьев, Е.В. Мартыненко, Г.Р. Кудоярова // Физиология растений. – 2006. – Т. 53. – № 4. – С. 567–574.
2. Егоршина А.А. Фосфат-мобилизующая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их влияние на степень микоризации корней пшеницы / А.А. Егоршина, Р.М. Хайруллин, М.А. Лукьянцев, З.М. Курамшина, Ю.В. Смирнова // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. – Красноярск, 2011. – № 1. – С.172–182.
3. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И.Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
4. Курамшина З.М. Влияние *Bacillus subtilis* на рост и активность антиоксидантных ферментов растений *Triticum aestivum* при Cd-стрессе / З.М. Курамшина, Ю.В. Смирнова, Р.М. Хайруллин // Вестник Башкирского университета. – 2014. – Т. 19. – № 3. – С. 835–839.
5. Курамшина З.М. Влияние бактерий *Bacillus subtilis* на рост пшеницы при загрязнении почвы никелем / З.М. Курамшина, Ю.В. Смирнова, Р.М. Хайруллин // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2015. – № 4 (1). – С. 92–94.
6. Курамшина З.М. Влияние эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* на микоризацию корней злаков при имитации почвенной засухи / З.М. Курамшина, Р.М. Хайруллин, Л.Р. Саттарова // Агрехимия. – 2015. – № 5. – С. 69–73.
7. Курамшина З.М. Повышение толерантности *Triticum aestivum* к кадмий-стрессу с помощью эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* / З.М. Курамшина, Ю.В. Смирнова, Р.М. Хайруллин // Физиология растений. – 2016. – Т. 63. – № 5. – С. 679–687.
8. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Сohc в агроэкосистемах. – М.: Наука, 2007. – 147 с.
9. Титов А.Ф. Тяжелые металлы и растения / А.Ф. Титов, Н.М. Казнина, В.В. Таланова. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. – 194 с.
10. Хайруллин Р.М. Активация хитоолигосахаридами окисления ортофенилендиамина проростками пшеницы в присутствии щавелевой кислоты / Р.М. Хайруллин, Л.Г. Яруллина, Н.Б. Трошина, И.Э. Ахметова // Биохимия. – 2001. – Т. 66. – № 3. – С. 354–358.

11. Хайруллин Р.М. Повышение устойчивости пшеницы к абиотическим стрессам эндофитным штаммом *Bacillus subtilis* / Р.М. Хайруллин, В.Д. Недорезков, И.Г. Мубинов, Р.Ш. Захарова // Вестник ОГУ. – 2007. – №2. – С. 129–134.
12. Costa H. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons / H. Costa, S.M. Gallego, M.L. Tomaro // Plant Sci. 2002. V.162. P. 939 – 945.
13. Glick B.R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation / B.R. Glick // Biotechnology Advances. 2010. V. 28. P. 367–374.
14. Hossain M.A. Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in HeavyMetal Chelation / M.A. Hossain, P. Piyatida, J. A. T. da Silva, M. Fujita // Journal of Botany. V. 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/872875>.
15. Zhang F. Response of Antioxidative Enzymes in Cucumber Chloroplasts to Cadmium Toxicity / F. Zhang, W. Shi, Z. Jin, Z. Shen // J. Plant Nutr. 2003. V. 26. P. 1779–1788.