

ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* НА РОСТ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ГАЗОННЫХ ТРАВ В УСЛОВИЯХ НЕДОСТАТОЧНОЙ ОСВЕЩЕННОСТИ

Маркина В.О.¹, Курамшина З.М.¹

¹Стерлитамакский филиал ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Стерлитамак, e-mail: vichka_markina_93@mail.ru

Газоны, расположенные в городе, постоянно испытывают действие стрессовых факторов, одним из которых является недостаток солнечного света. При недостаточном освещении происходит торможение роста, уменьшение сырой и сухой массы растительных организмов. Бактерии *Bacillus subtilis* способны облегчить последствия недостатка света у растений, так как могут стимулировать рост и повышать продуктивность растений. Изучено влияние преинкуляции семян газонной травы эндофитными штаммами *Bacillus subtilis* на рост и активность антиоксидантных ферментов растений, выросших в условиях недостаточной освещенности. Показано, что под действием клеток *B. subtilis* происходило снижение отрицательного эффекта недостатка света у растений, что проявлялось в улучшении их роста при воздействии стресса, увеличении активности ферментов каталазы и пероксидазы, снижении интенсивности продуктов перекисного окисления мембран (малонового диальдегида).

Ключевые слова: газонная трава, *Bacillus subtilis*, недостаточная освещенность, антиоксидантные ферменты, накопление малонового диальдегида.

EFFECT OF ENDOPHYTIC STRAINS *BACILLUS SUBTILIS* ON GROWTH AND ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES OF LAWN GRASSES IN THE CONDITIONS OF INSUFFICIENT LIGHTING

Markina V.O.¹, Kuramshina Z.M.¹

¹VO FGBOU Sterlitamak branch Bashkir state university, Sterlitamak, e-mail: vichka_markina_93@mail.ru

The lawns located in the city constantly experience action of stressful factors, one of which is the lack of a sunlight. In case of insufficient lighting there is a growth inhibition, reduction of crude and dry mass of plant organisms. Bacteria *Bacillus subtilis* are capable to facilitate consequences of a lack of light at plants as can promoting growth and increase productivity of plants. We studied effect of inoculation of seeds of a lawn grass by endophytic strains *Bacillus subtilis* on growth and activity of antioxidant enzymes in the plants which grew in the conditions of insufficient lighting. It is shown that under the effect of cells of *B. subtilis* there was a decrease in negative effect of a lack of light at plants that was shown in improvement of their growth in case of impact of a stress, increase in activity of enzymes (catalase and peroxidase), decrease in intensity of products of peroxide oxidation of membranes (malondialdehyde).

Keywords: lawn grass, *Bacillus subtilis*, insufficient lighting, antioxidant enzymes, accumulation of malondialdehyde.

Недостаток солнечного света, как неблагоприятный фактор внешней среды, приводит к стрессовому состоянию растений и к невозможности их нормального роста. В условиях недостаточной освещенности происходит нарушение энергетического обмена, системы регуляции, белкового обмена и других жизненно важных функций растительного организма [4]. Все неблагоприятные условия окружающей среды приводят к увеличению образования активных форм кислорода (АФК), которые могут вызвать перекисное окисление липидов (ПОЛ), инактивацию ферментов, повреждение нуклеиновых кислот и т.д. [11].

Наиболее часто при изучении устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды учитывается активность антиоксидантных ферментов – пероксидазы и каталазы,

которые непосредственно обезвреживают активные формы кислорода (АФК) и обеспечивают комплексную защиту биополимеров от них [6].

В настоящее время вопрос о механизмах положительного влияния эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* при воздействии различных стрессовых факторов на растения остается в центре внимания специалистов, изучающих растительно-микробные ассоциации. Было обнаружено, что положительное действие бактерий рода *Bacillus* на растительные организмы основано на выделении биологически активных веществ – стимуляторов роста [9]. Известен антистрессовый эффект *B. subtilis* (например, штаммы 26Д и 11ВМ) при воздействии на растения различных абиотических факторов (засоление, водный дефицит) [6]. Однако мало сведений о влиянии эндофитных штаммов на устойчивость растений к недостатку света. Целью настоящей работы явилось изучение влияния эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* шт. 26Д и 11ВМ на рост и активность антиоксидантных ферментов газонных трав в условиях недостаточной освещенности.

Материалы и методы исследования

Растительный материал. Объектом исследования служила газонная травосмесь сорта «Сибиряк» (*Festuca arundinacea* – 40%, *Festuca pratensis* – 40%, *Lolium perenne* – 20%). Эксперименты проводили в лабораторных условиях, в почвенной культуре. Семена перед посадкой промывали в мыльной воде, стерилизовали 1 мин. 96%-ым этанолом, трижды ополаскивали в дистиллированной воде, подсушивали. В опытах использовали бактерии *B. subtilis* – штамм 26Д (деп. в коллекции ВНИИСХМ, № 128)) и штамм 11ВМ (ВНИИСХМ № 519). Обработку семян бактериями проводили в стерильных условиях, в ламинар-боксе. В исследованиях использовали 20-часовую культуру бактерий, растущую на мясо-пептонном агаре при +37 °С, клетки бацилл отмывали раствором 0,001 М КСl. Суспензию клеток доводили до необходимой концентрации по оптической плотности; 1 г семян обрабатывался 20 мкл суспензии микроорганизмов в концентрации 10⁶ кл/мл, обработанные семена выдерживали в течение часа, затем использовали в опытах. Контрольные семена обрабатывали дистиллированной водой.

Инокулированные и контрольные семена проращивали в вегетационных сосудах, заполненных почвой – черноземом выщелоченным. В каждый вегетационный сосуд высаживали по 3 г семян газонной травы. Растения поливали дистиллированной водой и выращивали при температуре 25 °С. Опытные растения выращивали при недостатке света. На 30-е сутки проводили измерение биомассы растений и отбор проб для определения активности ферментов и уровня малонового диальдегида (МДА).

Экстракция. Проростки растений, выращенные при нормальной освещенности и при недостатке света, 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-НСl буфере рН 7.8 (при определении каталазы и малонового диальдегида (МДА)) в соотношении навеска:экстрагент – 1:10 (г:мл), центрифугировали 10 минут при 6–8 тыс. об./мин. Надосадочную жидкость центрифугировали еще 10 минут при 16–18 тыс. об./мин. Для определения активности ферментов и уровня МДА использовали надосадочную жидкость.

Определение активности ферментов и концентрации малонового диальдегида. Активность пероксидазы оценивали согласно методике Хайруллина с соавторами, исходя из количества окисленного ортофенилендиамина [10]. Концентрацию белка определяли согласно методу Bradford [12]. Активность каталазы определяли согласно методике Королюка 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 [13]. Метод основан на образовании окрашенного комплекса между МДА и тиобарбитуровой кислотой при нагревании.

Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. В таблицах приведены средние значения трех повторностей и их стандартные ошибки.

Результаты и их обсуждение

Влияние недостатка света на сырую массу побегов газонной травы.

Одним из основных абиотических факторов, влияющих на жизнедеятельность растений, является свет. Только на свету происходит фотосинтез и, следовательно, могут существовать фотосинтезирующие растения. При недостатке солнечного света происходит торможение роста, уменьшение сырой и сухой массы растительных организмов [14].

Преинокуляция семян клетками *B. subtilis* положительно влияла на рост растений газонной травы, выращенной в условиях недостаточной освещенности. Растения, обработанные *B. subtilis*, имели более высокие показатели биомассы побегов, чем необработанные (табл. 1).

Таблица 1

Влияние недостатка света на показатели биомассы растений газонной травы, г

Вариант	Нормальная освещенность	Недостаточная освещенность
Необработанные бактериями	0,95±0,02	0,46±0,01
Обработанные <i>B.subtilis</i> 26Д	1,02±0,01	0,59±0,01
Обработанные <i>B.subtilis</i> 11ВМ	0,98±0,01	0,51±0,01

Так, масса побегов у обработанных бактериями *B. subtilis* 26Д и 11ВМ растений и выросших в условиях недостаточной освещенности была больше на 28% и 11% соответственно, чем у необработанных.

Известно, что исследованные штаммы бактерий *B. subtilis* являются эндофитными микроорганизмами, способными стимулировать рост растений, синтезируя многочисленные регуляторы роста, защищая растения от фитопатогенов, мобилизуя питательные вещества и улучшая структуру почвы [7].

Многие из этих описанных свойств бактерий и механизмов их положительного влияния на растения могут играть важную роль в защите от неблагоприятных условий среды и абиотических стрессов. Это обусловлено потенциальной направленностью действия эндофитов против негативных эффектов и последствий воздействия стрессоров [1].

Влияние недостаточной освещенности на активность антиоксидантных ферментов.

Для анализа развития окислительного стресса, вызванного недостатком света и изучения адаптационных свойств растений газонной травы, была проанализирована активность ферментов-антиоксидантов (каталазы и пероксидазы) и продуктов перекисного окисления липидов.

В ходе эксперимента было отмечено, что у неинокулированных растений, выросших в условиях недостаточного освещения, активность каталазы была ниже на 42,8%, чем у растений, выросших при нормальном освещении (табл. 2).

Таблица 2

Активность каталазы и пероксидазы в побегах газонной травы в условиях недостаточной освещенности

Вариант	Нормальная освещенность	Недостаточная освещенность
<i>Активность каталазы, мг кат/л</i>		
Необработанные бактериями	1,4±0,1	0,8±0,1
Обработанные <i>B.subtilis</i> 26Д	2,1±0,1	2,3±0,1
Обработанные <i>B.subtilis</i> 11ВМ	1,6±0,1	1,9±0,1
<i>Активность пероксидазы, ед. мг⁻¹·с⁻¹</i>		
Необработанные бактериями	9,2±0,1	6,3±0,1
Обработанные <i>B.subtilis</i> 26Д	15,8±0,2	18,0±0,2
Обработанные <i>B.subtilis</i> 11ВМ	15,2±0,2	17,1±0,1

Известно, что каталаза проявляет умеренную пероксидазную активность, то есть катализирует реакции окисления различных доноров электронов перекисью водорода [3], однако ее активность существенно возрастает в зависимости от факторов окружающей среды.

Так, у растений, обработанных клетками *B. subtilis* и выросших при недостатке света, активность фермента повышалась по сравнению с растениями, выросшими при нормальном освещении. Активность каталазы у растений, инокулированных бактериями *B. subtilis* шт. 26Д и 11ВМ и выросших при недостаточном освещении, была выше в 2,8 и 2,3 раза, соответственно, по сравнению с неинокулированными и выросшими при тех же условиях. Следует отметить, что активность каталазы у инокулированных бактериями *B. subtilis* шт. 26Д и 11ВМ растений, выросших при нормальном освещении, была выше на 50 и 14,3%, соответственно, чем у необработанных и выросших при тех же условиях.

К важнейшим функциям пероксидазы относят защиту организма от вредного действия перекисей, которые образуются в условиях неблагоприятных факторов окружающей среды. Их образование и накопление обуславливает субстратную активацию пероксидазы, которая при каталитическом действии может использовать органические перекиси в качестве источника активного кислорода [7].

Пероксидаза довольно чувствительна к воздействию стресса, и возрастание ее активности может свидетельствовать о проявлении защитных реакций тканей в неблагоприятных условиях. Активность пероксидазы является удобным индикатором для выявления такого стресса, как недостаток солнечного света [14].

В ходе экспериментальных исследований было установлено, что активность пероксидазы в тканях необработанных растений и выросших в условиях недостаточной освещенности была ниже на 31,5%, чем у растений, выросших при нормальном освещении (табл. 2). У растений, обработанных клетками *B. subtilis* и выросших при недостатке света, активность пероксидазы, также как и активность каталазы повышалась по сравнению с растениями, выросшими при нормальном освещении. Активность пероксидазы у растений, инокулированных бактериями *B. subtilis* шт. 26Д и 11ВМ и выросших при недостаточном освещении, была выше на 13,9 и 12,5%, соответственно, по сравнению с неинокулированными и выросшими при тех же условиях. Следует отметить, что активность пероксидазы у инокулированных бактериями *B. subtilis* шт. 26Д и 11ВМ растений и выросших при нормальном освещении, была выше на 71,7 и 65,2% соответственно, чем у неинокулированных и выросших при тех же условиях.

Окислительный стресс, который определяют как реакцию организма на присутствие в среде избытка оксидантов, в растениях возникает в результате действия практически всех

неблагоприятных факторов внешней среды, включая недостаток света. Можно предположить, что окислительный стресс входит как компонент в большинство других стрессов. Такая универсальность в индукции окислительного стресса при действии на растения самых разнообразных стрессоров указывает на принципиально важное значение антиоксидантных систем, снижающих внутриклеточные концентрации активных форм кислорода (АФК) и повышающих устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды [2].

Окислительный стресс, вызванный недостатком света у растений, может увеличивать образование АФК, которые способны инициировать перекисное окисление липидов, в результате чего происходит повреждение клеточных структур, связанное с нарушением функций мембранных белков. Продуктом перекисного окисления мембран является малоновый диальдегид (МДА), по содержанию которого можно судить о степени развития окислительного стресса в растительных тканях [15].

В ходе полученных данных было установлено, что накопление МДА в тканях неинокулированных бактериями растений и выросших при недостатке света, было на 10% выше, чем у растений, выросших при достаточном освещении (табл. 3). У растений, обработанных бактериями, уровень МДА в побегах растений также повышался, но был ниже, чем у неинокулированных растений. Так, показатели содержания продукта перекисного окисления липидов в побегах инокулированных бактериями *B. subtilis* шт. 26Д и 11ВМ растений, выросших в условиях недостаточной освещенности, были ниже на 17,3% и 20,5% соответственно, чем у необработанных и выросших при тех же условиях.

Таблица 3

Влияние недостатка света на содержание малонового диальдегида
в растениях газонной травы, нмоль/г сырого веса $\times 10^{-5}$

Вариант	Нормальная освещенность	Недостаточная освещенность
Необработанные бактериями	33,9±1,4	37,4±1,4
Обработанные <i>B.subtilis</i> 26Д	24,5±1,1	30,9±1,2
Обработанные <i>B.subtilis</i> 11ВМ	27,4±1,1	29,7±1,1

Доказано, что в побегах газонной травы, выращенной в условиях недостаточной освещенности, накопление уровня МДА повышалось в тканях необработанных растений. В тканях растений, инокулированных эндофитами, показатели МДА были ниже, чем у неинокулированных растений. Вероятно, в растениях, обработанных бактериями, при

воздействии стресса процессы перекисного окисления шли менее интенсивно по сравнению с необработанными бактериями растений.

Таким образом, недостаточное освещение у растений ведет к значительным отклонениям в метаболизме, что проявляется в изменении активности антиокислительных ферментов и уровне накопления МДА. Выявленные изменения в метаболизме растений наблюдаются при развитии окислительного стресса и образовании активных форм кислорода, а повышение активности каталазы и пероксидазы направлено на разрушение H_2O_2 и АФК и защиту клетки от вызываемых ими повреждений [8]. Более высокий уровень МДА у необработанных эндوفитами растений, выросших в условиях недостаточной освещенности, по сравнению с контрольными, позволяет предположить нарушение растительной ферментной системы антиоксидантной защиты.

Как известно, бациллы продуцируют большое количество биологически активных веществ, таких как ферменты, антибиотики, различные аминокислоты. Известен антистрессовый эффект *B. subtilis* (например, штаммы 26Д и 11ВМ) при воздействии на растения различных абиотических факторов (засоление, водный дефицит, действие ТМ). Преинокуляция клетками *B. subtilis* способствовала снижению отрицательного эффекта недостатка света у растений, что проявлялось не только в показателях лучшего роста растений газонной травы при воздействии стресса, но и в сохранении активности каталазы и пероксидазы, уменьшении интенсивности ПОЛ.

Следовательно, повышение устойчивости растений, обработанных бактериями *B. subtilis*, при воздействии негативного фактора можно объяснить повышением активности антиокислительных ферментов и менее интенсивным развитием окислительного стресса. Показано, что под действием клеток *B. subtilis* уменьшался отрицательный эффект недостатка света у растений, что проявлялось в улучшении их роста в условиях неблагоприятного фактора, сохранении активности ферментов (каталазы и пероксидазы), снижении интенсивности перекисного окисления липидов [5].

Список литературы

1. Алексеева А.С., Потатуркина-Нестерова Н.И. Механизмы положительного влияния ризобактерий на жизнедеятельность растений // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. ; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=12671>.
2. Воскресенская О.Л., Сарбаева Е.В., Старикова Е.А. Изменение активности антиоксидантных ферментов у газонных трав в условиях городской среды / О.Л.

- Воскресенская, Е.В. Сарбаева, Е.А. Старикова // Вестник Ульяновской Государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 2. – С. 56–59.
3. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарева // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
4. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур / Е.И. Кошкин. – М.: Дрофа, 2014. – 638 с.
5. Курамшина З.М., Смирнова Ю.В., Хайруллин Р.М. Протекторный эффект эндофитных штаммов бактерий при токсическом действии ионов кадмия на растения *Sinapis alba* / З.М. Курамшина, Ю.В. Смирнова, Р.М. Хайруллин // Вестник Башкирского университета. – 2013. – № 3. – С. 739–742.
6. Курамшина З.М., Смирнова Ю.В., Хайруллин Р.М. Влияние *Bacillus subtilis* на рост и активность антиоксидантных ферментов растений *Triticum aestivum* при СD–стрессе / З.М. Курамшина, Ю.В. Смирнова, Р.М. Хайруллин // Вестник Башкирского университета. – 2014. – № 3. – С. 835–839.
7. Половникова Е., Воскресенская О.Л. Активность антиоксидантной системы в онтогенезе газонных растений в условиях урбанизированной среды / Е. Половникова, О.Л. Воскресенская // Студенческая наука и XXI век. – 2015. – № 5. – С. 181–184.
8. Попова В.Т., Дорофеева В.Д. Устойчивость и адаптация газонных трав к недостатку света / В.Т. Попова, В.Д. Дорофеева // Лесные экосистемы в условиях меняющегося климата: Проблемы и перспективы. – 2015. – № 3. – С. 178–181.
9. Феоктистова Н.В., Марданова А.М., Хадиева Г.Ф., Шарипова М.Р. Ризосферные бактерии / Н.В. Феоктистова, А.М. Марданова, Г.Ф. Хадиева, М.Р. Шарипова // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2016. – № 2. – С. 207–224.
10. Хайруллин Р.М., Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Ахметова И.Э. Активация хитоолигосахаридами окисления ортофенилендиамина проростками пшеницы в присутствии щавелевой кислоты / Р.М. Хайруллин, Л.Г. Яруллина, Н.Б. Трошина, И.Э. Ахметова // Биохимия. – 2001. – № 3. – С. 354–358.
11. Beneduzi A., Ambrosini A., Passaglia L.M.P. Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents / A. Beneduzi, A. Ambrosini, L.M.P. Passaglia // Genet. Mol. Biol. – 2016. – № 4. – P. 1044–1051.
12. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – № 2. – P. 248–254.

13. Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. 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.
14. Cho U.H., Seo N.H. Oxidative Stress in *Arabidopsis thaliana* Exposed to Cadmium Is due to Hydrogen Peroxide Accumulation / U.H. Cho, N.H. Seo // *Plant Sci.* – 2015.– № 3. – P. 113–120.
15. Chowdhury S.P., Hartmann A., Gao X-W., Borriss R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review / S.P. Chowdhury, A. Hartmann, X-W Gao, R. Borriss // *Front. Microbiol.* – 2015. – № 7. – P. 1–11.