

ПОВЫШЕНИЕ ТОЛЕРАНТНОСТИ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ, ИНОКУЛИРОВАННЫХ ЭНДОФИТНЫМИ ШТАММИ *BACILLUS SUBTILIS*, К ДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Курамшина З.М.¹, Смирнова Ю.В.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 бактерий *Bacillus subtilis* штаммов 26Д и 11ВМ на рост культурных растений (пшеницы, кукурузы, подсолнечника, ржи) в условиях воздействия ионов кадмия и свинца. Обработка семян *B. subtilis* положительно влияла на рост растений, однако стимулирующий эффект у исследованных видов растений различался. Наиболее отзывчивой на инокуляцию семян бактериями оказалась кукуруза, наименее чувствительной – рожь. Показано, что бактериализация семян повышает устойчивость растений к стрессу, вызванному действием ионов металлов. В условиях воздействия металлов абсолютный индекс толерантности растений, предобработанных бактериями, был выше, чем у неинокулированных проростков. Каждый штамм проявлял себя индивидуально в сочетании с различными видами растений и ионами металла. Наиболее низкие индексы толерантности при воздействии кадмия были отмечены для растений пшеницы, а наиболее чувствительной культурой к действию ионов свинца оказалась рожь.

Ключевые слова: культурные растения, эндофитные штаммы *Bacillus subtilis*, кадмий, свинец, индекс толерантности.

INCREASE TOLERANCE OF CROP PLANTS, INOCULATED WITH ENDOPHYTIC STRAINS *BACILLUS SUBTILIS*, TO HEAVY METALS

Kuramshina Z.M., Smirnova J.V., Khairullin R.M.

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

Effect of seed inoculation by *Bacillus subtilis* cells of strain 26Д and 11ВМ on the growth of crops plants (wheat, corn, sunflower, rye) in the presence of cadmium and lead was investigated. The seed treatment by cells of *B. subtilis* have positive effect on plants growth, but the stimulating effect on studied species of plants was varied. The most responsive to inoculation of seed by bacteria was corn, the least sensitive - rye. It was shown that endophytic bacteria increases the resistance of plants to heavy metals. Absolute tolerance index of plants to the action of heavy metals in plants inoculated by bacteria cells was higher than uninoculated. Each strain showed themselves individually, in combination with various plant species and metal ions. The lowest indexes of tolerance when exposed to cadmium were observed for wheat plants and the most sensitive crop to the action of lead ions was plants rye.

Keywords: crop plants, endophytic strains of *Bacillus subtilis*, cadmium, lead, tolerance index

Загрязнение окружающей среды в последние десятилетия достигло глобальных масштабов. Среди большого разнообразия поллютантов загрязнение тяжелыми металлами занимает одно из первых мест. В отличие от других загрязняющих веществ, например, пестицидов, тяжелые металлы не разлагаются живыми организмами. Проникая и накапливаясь в растениях, ионы тяжелых металлов прямо или косвенно влияют на все физиологические процессы растительного организма: угнетается или полностью останавливается рост, нарушаются процессы дыхания, фотосинтеза, минерального питания, снижается продуктивность [8].

В настоящее время внимание многих исследователей направлено на поиск методов снижения токсического действия тяжелых металлов на растения и повышения их толерантности. В ряде работ показано, что бактерии, относящиеся к группам PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria, ризобактерии, стимулирующие рост растений) и PGPB (plant growth-promoting bacteria, бактерии, стимулирующие рост растений) способны повышать устойчивость растений к стрессу, вызванному тяжелыми металлами [7, 10]. В настоящее время в сельскохозяйственной практике для защиты растений от болезней, вызываемых фитопатогенными грибами, широко применяется препарат «Фитоспорин-М», основой которого является эндофитный штамм *B. subtilis* 26Д. Бактерии *B. subtilis* продуцируют множество биологически активных веществ (фитогормоны, ферменты, антибиотики и др.), очень стойких к различным физико-химическим факторам, и способны приспосабливаться к изменениям окружающей среды [11, 13].

Несмотря на имеющиеся литературные данные о роли *B. subtilis* в повышении иммунитета растений и их антистрессовой активности [4], вопрос о видовых особенностях ответа растений на инокуляцию клетками бактерий в условиях воздействия различных стрессовых факторов остается открытым.

Целью исследования явилось изучение влияния предварительной инокуляции семян клетками *Bacillus subtilis* штаммов 26Д и 11ВМ на рост различных культурных растений в условиях воздействия ионов тяжелых металлов.

Материалы и методы

Исследования проводили на растениях пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Волжская качественная), кукурузы (*Zea mays* L., сорт РИК-340), подсолнечника (*Helianthus annuus* L., сорт Спортивный), ржи (*Secale cereal* L., сорт Чулпан-7) в лабораторных условиях. Перед проращиванием семена растений промывали в мыльной воде, ополаскивали, стерилизовали 96%-ным этанолом в течение 3 мин, затем трижды ополаскивали в дистиллированной воде.

Штаммы *Bacillus subtilis* Cohn штам 26Д, (деп. в коллекции ВНИИСХМ, № 128) и 11ВМ (ВНИИСХМ № 519) предоставлены сотрудниками лаборатории биотехнологии Башкирского ГАУ. 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 выщелоченном черноземе при температуре 18–20°C. Металл в почву вносили в виде раствора соли ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ или $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), однократно после посева семян, концентрации готовили в пересчете на ионы металла. Контрольные растения поливали дистиллированной водой. Длину корней и побегов измеряли на тридцатые сутки роста. Опыты проводили в трехкратной повторности.

Индекс толерантности (I %) растений определяли как отношение среднего значения длины корня или стебля растений, выросших при определенной концентрации ионов металла ($\Delta L_{опыт}$), к среднему значению длины стебля/корня контрольных растений, выросших без металла ($\Delta L_{контроль}$) [14]:

$$I(\%) = \frac{\Delta L_{опыт}}{\Delta L_{контроль}} \cdot 100\%$$

Для растений, семена которых были обработаны бактериями, рассчитывали два индекса толерантности: относительный (ОИТ) и абсолютный (АИТ). При расчете относительного индекса толерантности в качестве контрольных считали растения, предобработанные бактериями и выросшие в почве, не содержащей металл. При расчете абсолютного индекса толерантности контрольными считались проростки, выросшие в почве без металла из инокулированных бактериями семян.

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

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что обработка семян *B. subtilis* положительно влияла на рост растений, однако стимулирующий эффект у исследованных видов растений различался. Наиболее отзывчивой на инокуляцию семян бактериями оказалась кукуруза, наименее чувствительной – рожь. Ростовые показатели обработанных бактериями растений кукурузы были выше необработанных на 32-35% при использовании *B. subtilis* шт. 26Д и 106-116% – шт. 11ВМ. Следует отметить, что у инокулированных бактериями растений этого вида, в равной степени хорошо наблюдалась стимуляция роста, как побегов, так и корней (табл. 1). У других сельскохозяйственных культур стимуляция роста была в пределах от пяти до тридцати пяти процентов. Штаммы бактерий проявляли различную активность по отношению к растениям. У растений пшеницы лучшая стимуляция роста отмечена при обработке *B. subtilis* шт. 26Д; у подсолнечника штамм 11ВМ лучше стимулировал рост побегов; рожь лучше отзывалась на обработку штаммом 11ВМ, а при обработке шт. 26Д наблюдалось ингибирование побегов.

Известно, что исследованные штаммы бактерии *B. subtilis* являются эндофитными микроорганизмами, способными стимулировать рост растений, синтезируя многочисленные регуляторы роста, защищая растения от фитопатогенов, мобилизуя питательные вещества и улучшая структуру почвы [1, 2, 5].

Следует также, учитывать, что рост является интегральным показателем воздействия на растения различных экологических факторов, в том числе зависит и от активности почвенных микроорганизмов. В свою очередь и корневые выделения растений воздействуют на реакцию почвенного раствора и влияют на микроорганизмы прикорневой сферы [9]. Вероятно, в силу индивидуальных особенностей растений, активности почвенных микроорганизмов и влияния бацилл на прикорневую микрофлору, стимуляция роста при инокуляции семян бактериями была различной у исследованных культур.

Таблица 1

Ростовые показатели растений, инокулированных клетками *B. subtilis* (см)

С/х культура	Вариант					
	Без обработки		<i>B. subtilis</i> 26Д		<i>B. subtilis</i> 11ВМ	
	корни	побеги	корни	побеги	корни	побеги
Пшеница	46,1±1,9	32,1±1,5	62,5±1,8*	37,0±1,8*	57,0±1,5*	36,3±1,4*
Кукуруза	43,7±0,8	36,7±1,1	58,6±0,9*	48,3±1,1*	90,2±0,9*	79,3±1,2*
Подсолнечник	12,1±0,4	18,3±0,3	13,7±0,4*	19,1±0,4*	13,7±0,5*	20,5±0,5*
Рожь	29,5±0,2	15,7±0,1	31,8±0,5*	14,9±0,9	32,1±0,2*	17,5±0,2*

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

При исследовании влияния тяжелых металлов было выявлено, что низкие концентрации кадмия (40 мг/кг) и свинца (10 мг/кг) не угнетали рост растений (за исключением растений ржи). Индексы толерантности были выше контрольных растений (табл. 2, 3). Известно, что ионы тяжелых металлов в небольших концентрациях способны оказывать положительное влияние на состояние растений: стимулировать рост, повышать интенсивность фотосинтеза, уменьшать интенсивность перекисного окисления липидов [8].

У растений, обработанных бактериями, при воздействии низких концентраций металлов относительные индексы толерантности были ниже, а абсолютные выше, чем у необработанных растений. Исключение составили растения пшеницы (стимуляцию наблюдали только при обработке семян клетками *B. subtilis* шт. 26Д) и ржи, у которых только индексы толерантности корней были высокими.

Реакция растений на воздействие высоких концентраций металлов зависела от вида растения, металла и его концентрации. Кадмий угнетал рост корней и побегов у всех растений. Наиболее низкие индексы толерантности были отмечены для растений пшеницы: угнетение роста у необработанных бактериями растений при концентрации кадмия 500 мг/кг составило 16,2% и 36,1%, для побегов и корней, соответственно. Более устойчивыми к

действию кадмия были растения ржи. У всех исследованных растений корневая система повреждалась сильнее, чем побеги. Корень является органом, непосредственно соприкасающимся с ионами металлов, участвующим в их транспорте, и, несомненно, первым испытывает их негативное влияние [6].

Таблица 2

Индексы толерантности растений в условиях загрязнения почвы ионами кадмия, %

С/х культура	Концентрация Cd, мг/кг почвы	Вариант				
		Без обработки	<i>B. subtilis</i> 26Д		<i>B. subtilis</i> 11ВМ	
		ОИТ	ОИТ	АИТ	ОИТ	АИТ
Пшеница	40	$\frac{110,4}{169,1}$	$\frac{105,9}{162,5}$	$\frac{113,7}{199,5}$	$\frac{104,5}{111,9}$	$\frac{113,2}{128,1}$
	500	$\frac{83,8}{63,9}$	$\frac{94,0}{70,0}$	$\frac{101,1}{85,8}$	$\frac{98,3}{66,4}$	$\frac{102,2}{75,9}$
Кукуруза	40	$\frac{147,4}{135,7}$	$\frac{110,5}{129,2}$	$\frac{166,7}{200,2}$	$\frac{92,5}{88,8}$	$\frac{210,3}{169,2}$
	1000	$\frac{86,3}{77,6}$	$\frac{62,9}{63,4}$	$\frac{94,9}{98,1}$	$\frac{41,4}{47,9}$	$\frac{94,0}{91,3}$
Подсолнечник	40	$\frac{104,9}{106,6}$	$\frac{109,9}{106,6}$	$\frac{114,7}{120,7}$	$\frac{104,0}{105,0}$	$\frac{116,9}{119,8}$
	1000	$\frac{98,4}{76,0}$	$\frac{94,8}{87,6}$	$\frac{98,9}{99,2}$	$\frac{103,9}{59,9}$	$\frac{116,4}{67,8}$
Рожь	40	$\frac{84,8}{100,8}$	$\frac{96,8}{100,0}$	$\frac{78,0}{108,8}$	$\frac{88,9}{100,4}$	$\frac{96,9}{112,5}$
	1000	$\frac{99,5}{92,8}$	$\frac{92,2}{100,0}$	$\frac{74,4}{108,8}$	$\frac{79,8}{107,6}$	$\frac{86,9}{120,5}$

Примечание. Над чертой – ИТ побегов, под чертой – ИТ корней.

Наиболее чувствительной культурой к действию ионов свинца в концентрации 1500 мг/кг оказалась рожь: индексы толерантности необработанных растений снижались по сравнению с контрольными на 11,6 и 28,6%, для побегов и корней, соответственно. Ингибирующий эффект у растений кукурузы и пшеницы наблюдался только при концентрации свинца в почве 3000 мг/кг. Так же, как и при воздействии кадмия, у всех исследованных растений корневая система повреждалась сильнее, чем побеги. Следует отметить, что ионы свинца в высоких концентрациях слабее ингибировали рост растений,

чем ионы кадмия, что и определяется, согласно литературным данным [6, 8] его меньшей токсичностью на организмы.

Таблица 3

Индексы толерантности растений в условиях загрязнения почвы ионами свинца, %

С/х культура	Концентрация Pb, мг/кг почвы	Вариант				
		Без обработки	<i>B. subtilis</i> 26Д		<i>B. subtilis</i> 11ВМ	
		ОИТ	ОИТ	АИТ	ОИТ	АИТ
Пшеница	10	<u>129,0</u>	<u>125,9</u>	<u>145,2</u>	<u>106,1</u>	<u>119,9</u>
		158,8	113,3	153,6	122,3	151,2
	3000	<u>140,8</u>	<u>117,3</u>	<u>135,2</u>	<u>117,1</u>	<u>132,4</u>
		45,9	34,7	47,1	40,0	49,5
Кукуруза	10	<u>113,4</u>	<u>82,8</u>	<u>109,3</u>	<u>98,1</u>	<u>112,7</u>
		110,0	83,9	112,6	59,5	123,7
	3000	<u>102,6</u>	<u>80,1</u>	<u>105,5</u>	<u>52,1</u>	<u>112,5</u>
		81,3	59,4	79,6	42,9	88,6
Подсолнечник	10	<u>111,6</u>	<u>108,9</u>	<u>127,4</u>	<u>103,9</u>	<u>128,7</u>
		106,9	109,8	109,8	105,7	111,4
	1500	<u>123,2</u>	<u>120,8</u>	<u>141,5</u>	<u>101,7</u>	<u>142,7</u>
		84,8	88,6	88,6	97,1	102,3
Рожь	10	<u>112,5</u>	<u>122,1</u>	<u>115,9</u>	<u>109,1</u>	<u>121,7</u>
		99,5	89,7	103,2	97,8	106,3
	1500	<u>88,4</u>	<u>109,7</u>	<u>103,8</u>	<u>86,8</u>	<u>96,8</u>
		71,4	75,2	81,1	74,5	81,1

Примечание. Над чертой – ИТ побегов, под чертой – ИТ корней.

Растения, семена которых были предварительно обработаны бактериями, при действии высоких концентраций тяжелых металлов имели более высокие абсолютные индексы толерантности, чем выросшие из необработанных семян. Исключение составили только растения ржи: индексы толерантности, рассчитанные для корней растений, испытывающих воздействие кадмия, были выше необработанных растений; при воздействии свинца индексы были выше только у побегов. Интересно, что у растений, семена которых предварительно были обработаны бактериями, значения относительного индекса толерантности были в отдельных случаях несколько ниже, чем у необработанных растений. Вероятно, это связано с тем, что проростки подвергались двойному стрессу – инокуляции клетками бактерий и воздействию тяжелых металлов.

Повышение устойчивости растений к действию тяжелых металлов при инокуляции семян клетками эндофитных бактерий, вероятно, связано с синтезом микроорганизмами гормонов, улучшением минерального питания, а также со способностью синтезировать фермент деаминазу 1-аминоциклопропанкарбоновой кислоты [2, 10]. Благодаря этому ферменту, предшественник этилена, гормона, ингибирующего рост в стрессовых условиях, разрушается. Кроме того, ряд авторов связывают устойчивость растений к действию тяжелых металлов со способностью растительных клеток противостоять окислительному стрессу, сохраняя активность ферментов на определенном уровне [12]. Ранее нами было показано [3], что растения горчицы, инокулированные клетками *B. subtilis*, при Cd-стрессе отличались более высокими показателями биомассы, активности пероксидазы и каталазы и менее интенсивным накоплением продуктов перекисного окисления липидов, чем необработанные растения. Пониженное содержание малонового диальдегида в тканях растений, инокулированных клетками бактерий, может свидетельствовать о менее интенсивном развитии окислительного стресса, вызванного ионами металлов.

В результате проведенных исследований было показано, что обработка семян различных сельскохозяйственных культур бактериями *B. subtilis* положительно влияла на рост растений. Стимулирующий эффект бацилл определялся видом растений и штаммом бактерий. Наиболее отзывчивой на инокуляцию семян бактериями оказалась кукуруза, наименее чувствительной – рожь.

Низкие концентрации кадмия и свинца стимулировали рост растений, высокие – ингибировали. При обработке растений бактериями в условиях действия низких концентраций металла проявлялся слабый синергетический эффект. Показано, что обработка семян растений бактериями *B. subtilis* ослабляла токсическое действие при воздействии высоких концентраций ионов кадмия и свинца. Каждый штамм проявлял себя индивидуально в сочетании с различными видами растений и ионами металла.

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 // Научный журнал Сибирского федерального университета. – 2011. – № 1. – С.172-182.

3. Курамшина З.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. – Т.18, №3. – С.739-742.

4. Мубинов И.Г. Реакции пшеницы на действие клеток эндофитного штамма 26Д *Bacillus subtilis* – основы биофунгицида фитоспорин: автореф. дис... канд. биол. наук. – Уфа, 2007. – 23 с.

5. Недорезков В.Д. Биологическое обоснование применения эндофитных бактерий в защите пшеницы от болезней на Южном Урале: автореф. дисс... д-ра с.-х. наук. – С-Пб, 2003. – 41 с.

6. Серегин И.В. Распределение тяжелых металлов в растениях и их действие на рост: автореф. дисс... д-ра биол. наук. – М., 2009. – 53 с.

7. Сиунова Т.В. Влияние ризосферных бактерий на аккумуляцию никеля растениями ячменя / Т.В. Сиунова, В.В. Кочетков, А.М. Боронин // Агрехимия. – 2006. – №10. – С. 80 – 84.

8. Титов А.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам / А.Ф. Титов, В.В. Таланова, Н.М.Казнина, Г.Ф. Лайдинен. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. – 172 с.

9. Хомяков Ю.В. Роль корневых выделений растений в формировании биохимических свойств корнеобитаемой среды: автореф. дис... канд. биол. наук. – С-Пб, 2009. – 144 с

10. Ahemad M. Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: a review / M. Ahemad // IOABJ. – 2012. – V. 3. – P. 39–46.

11. Chen F. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber Fusarium wilt by *Bacillus subtilis* B579 / F. Chen, M. Wang, Y. Zheng, J. Luo, X. Yang, X. Wang // World J. Microbiology and Biotechnology. – 2010. – V. 26. – P. 675–684.

12. Cho U.H. Oxidative Stress in *Arabidopsis thaliana* Exposed to Cadmium Is due to Hydrogen Peroxide Accumulation / U.H. Cho, N.H. Seo // Plant Science. – 2005. – V. 168. – P. 113 – 120.

13. Jourdan E. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis* / E. Jourdan, G.Henry, F. Duby, J. Dommès, J.P. Barthelemy, P. Thonart, M. Ongena // Mol. Plant Microbe Interact. – 2009. – V. 22. – P. 456–468.

14. Wilkins D.A. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth / D.A. Wilkins // New Phytologist. – 1978. – № 80. – P. 623–633.