

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* НА РОСТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР ПРИ Cd-СТРЕССЕ© З. М. Курамшина^{1*}, Ю. В. Смирнова¹, Р. М. Хайруллин²

¹Стерлитамакский филиал Башкирского государственного университета
Россия, Республика Башкортостан, 453109 г. Стерлитамак, пр. Ленина, 49.
Тел./факс: +7 (347) 343 38 69.

E-mail: kuramshina_zilya@mail.ru

²Институт биохимии и генетики УНЦ РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 71.
Тел./факс: +7 (347) 235 60 88.

E-mail: krm62@mail.ru

Изучено влияние предварительной инокуляции семян клетками бактерий *Bacillus subtilis* штаммов 26Д и 11ВМ на рост сельскохозяйственных культур: пшеницы, кукурузы и подсолнечника в условиях воздействия ионов кадмия. Показано, что бактериализация семян повышает устойчивость растений к стрессу, вызванному действием ионов металла. Разница в показателях роста между инокулированными и контрольными растениями была более заметной в вегетационных опытах, несмотря на то, что в почве прослеживали токсическое действие более высоких концентраций металла, по сравнению с экспериментами в чашках Петри. Эффект от применения эндофитных штаммов *B. subtilis* был не только сопоставим с действием антистрессового препарата эпин, но в отдельных экспериментах даже превосходил его.

Ключевые слова: сельскохозяйственные растения, кадмий, эндофитные штаммы *Bacillus subtilis*, антистрессовый эффект.

Введение

Загрязнение сельскохозяйственных угодий тяжелыми металлами обусловлено преимущественно выбросами промышленных, энергетических, химических предприятий, а также ненормированным применением средств химизации (минеральные удобрения, мелиоранты, средства химической защиты растений от вредителей и болезней). Проникая в растения, поллютанты накапливаются в них, снижают урожайность и качество продукции. Одним из наиболее опасных металлов является кадмий, поскольку он обладает высоким кумулятивным эффектом, не подвергается биодеградации и ведет к серьезным физиологическим, биохимическим нарушениям в организме [1, 2].

В связи с возрастающим загрязнением окружающей среды ионами кадмия большое внимание уделяется поиску различных методов снижения фитотоксичности металла. В отличие от известных агротехнических приемов (известкование, внесение гуматов, навоза, подвижных форм фосфора), современные биотехнологические методы являются высокоэффективными, экологически безопасными и дешевыми. Результаты некоторых исследований [3–5] свидетельствуют о том, что бактерии, например, ассоциативные ризосферные, могут играть существенную роль в устойчивости растений к стрессу, вызванному токсичностью тяжелых металлов. 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, очень стойких к различным физико-химическим факторам, и способны приспосабливаться к изменениям окружающей среды [6]. Име-

ются сведения [7] о протекторном действии *B. subtilis* по отношению к растениям при различных стрессах. Однако мало работ посвящено изучению влияния эндофитных бактерий на рост растений в условиях воздействия тяжелых металлов.

Целью работы явилось изучение влияния предварительной инокуляции семян клетками *Bacillus subtilis* штаммов 26Д и 11ВМ на рост сельскохозяйственных культур в условиях воздействия ионов кадмия.

Методика

Исследования проводили на растениях яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Омская 35), кукурузы (*Zea mays* L., сорт РИК-340), подсолнечника (*Helianthus annuus* L., сорт Спортивный) в лабораторных условиях. Перед проращиванием семена растений стерилизовали 96%-ным этанолом в течение 3 мин, затем трижды ополаскивали в дистиллированной воде.

Штаммы *Bacillus subtilis* 26Д (коллекция ВНИИСХМ С.-Пб.-Пушкин, №128) и 11ВМ (ВНИИСХМ №519) предоставлены сотрудниками лаборатории биотехнологии Башкирского ГАУ. В опытах использовали суточную культуру, растущую на мясо-пептонном агаре при 37 °С. Клетки бактерий отмывали раствором 0.01М КСl. Суспензию клеток доводили до необходимой концентрации по оптической плотности. Семена инокулировали бактериями из расчета на 1 г 20 мкл суспензии клеток с титром 1 млрд./мл.

Для исследования антистрессового действия Эпин-экстра семена растений замачивали в растворе препарата (2 капли на 100 мл воды) в течении суток при температуре +20 °С, затем семена высевали в сосуды с почвой.

Инокулированные и контрольные семена выращивали в чашках Петри ($d = 140$ мм, $h = 24$ мм)

* автор, ответственный за переписку

на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой или раствором $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Раствор соли готовили в пересчете на содержание иона металла.

В вегетационных опытах растения выращивали на выщелоченном черноземе при температуре 18–20 °С. Кадмий в почву вносили в виде раствора, однократно после посева семян. Контрольные растения поливали дистиллированной водой. Размещение вегетационных сосудов меняли каждый день по единой схеме, чтобы обеспечить равномерную освещенность. Длину корней и побегов определяли на пятые (эксперимент в чашках Петри) и четырнадцатые (в почве) сутки.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных экспериментов выявлено, что обработка семян бактериями *B. subtilis* положительно влияла на рост растений, однако штаммы проявляли различную активность по отношению к разным видам растений. Так, при проращивании семян подсолнечника в чашках Петри наблюдали стимуляцию побегов на 39% и 61% по отношению к контрольным (необработанным) растениям, корней – на 89% и 98%, соответственно, штаммами 26Д и 11ВМ. У других сельскохозяйственных культур стимуляция роста была в пределах от пяти до тридцати процентов (табл. 1, 2). При выращивании растений в почве более заметный ростстимулирующий эффект предобработки семян клетками эндофитов наблюдался у пшеницы и кукурузы. Так, обработка семян кукурузы бактериями *B. subtilis* приводила к стимуляции роста корней на 50% и 90%, побегов на 54% и 127% штаммами 26Д и 11ВМ, соответственно. У пшеницы усиление роста побегов было незначительно, тогда, как длина корней увеличивалась на 37% (штамм 26Д) и 18% (штамм 11ВМ). Растения подсолнечника слабо отзывались на обработку бактериями.

Известно, что исследованные штаммы бактерии *B. subtilis* являются эндофитными микроорганизмами, живущими в растительных тканях без нанесения растению существенного вреда или получения выгоды [8]. Показано, что стимуляция роста растений может обуславливаться повышением в растительных тканях уровня индолилуксусной кислоты, а также проявлением клетками бактерий цитокинин-подобной активности [9, 10]. Более выраженный стимулирующий эффект бактерий при росте растений в почве, вероятно, связан с тем, что бациллы являются типичными представителями педосферы, в первую очередь колонизируют корни растений, формируют биопленку на поверхности корней, продуцируют стимуляторы роста, повышают содержание питательных веществ в доступной для растений форме (минерализация фосфатов), подавляют фитопатогенные микроорганизмы [11].

Кадмий, являясь высокотоксичным элементом, существенно подавляет рост растений, при этом корневая система наиболее чувствительна к действию металла [12]. Однако, известно, что тяжелые

металлы, в том числе и кадмий, в очень низких концентрациях не вызывают заметных изменений и даже способны оказывать положительное влияние на состояние растений: уменьшать интенсивность перекисного окисления липидов, стимулировать рост, повышать содержание пигментов [13]. В проведенных нами экспериментах низкие концентрации ионов кадмия (как в растворе, так и в почве) либо не оказывали существенного влияния на рост растений, либо проявляли слабую стимуляцию (табл. 1, 2). В почве наибольший стимулирующий эффект низких концентраций кадмия был отмечен по отношению к растениям пшеницы и кукурузы.

Растения, семена которых были обработаны бактериями, при низких концентрациях металла росли лучше необработанных. Разница между инокулированными и контрольными растениями была более заметной при постановке эксперимента в почве (табл. 2).

Повышение содержания металла в растворе (в чашках Петри) и в корнеобитаемой среде (в почве) приводило к снижению интенсивности роста растений. Угнетение роста надземной части проростков (побегов) в чашках Петри при концентрации 20 мг/л не наблюдалось, тогда как корни заметно реагировали на присутствие кадмия. Растения подсолнечника были устойчивыми к действию кадмия и размеры их органов практически не отличались от контроля. Известно, что такие культуры, как подсолнечник и кукуруза способны произрастать на почвах, сильно загрязненных тяжелыми металлами [14]. Известны критические концентрации тяжелых металлов для растений, однако чувствительность у различных видов к ионам металлов может варьировать.

По сравнению с экспериментами в чашках Петри в вегетационных опытах в почве прослеживали действие более высоких концентраций металла (500, 1000 мг/кг). В почве происходит иммобилизация металлов ее компонентами: органическим веществом, глинистыми минералами и микроорганизмами [15]. Отмечено, что при концентрациях 500 и 1000 мг/л происходило угнетение роста всех растений, за исключением кукурузы. Чувствительность корневой системы к ионам кадмия была выше.

Различные виды растений по-разному реагировали на инокуляцию различными штаммами бацилл. Протекторные свойства бактерий штамма *B. subtilis* 26Д при Cd-стрессе были хорошо выражены по отношению к подсолнечнику. Антистрессовая активность по отношению к пшенице хорошо проявлялась у обоих изученных штаммов (табл. 2). В присутствии ионов металла более высокие ростовые показатели у проростков кукурузы были отмечены при обработке клетками *B. subtilis* 11ВМ. Токсический эффект ионов кадмия в почве был менее выражен у растений, инокулированных клетками бактерий *B. subtilis* 26Д.

Таблица 1

Влияние ионов кадмия на длину стебля и корня растений, см (эксперимент в чашках Петри)

С/х культура	Концентрация Cd, мг/л	Вариант		
		контроль	+ <i>B. sub.</i> 26Д	+ <i>B. sub.</i> 11ВМ
Пшеница	0	6.4 ± 0.1	7.0 ± 0.2	7.2 ± 0.2
		38.3 ± 1.5	41.8 ± 1.5	40.5 ± 1.3
	1	6.5 ± 0.1	7.1 ± 0.2	7.0 ± 0.1
		41.5 ± 1.3	44.3 ± 1.8	42.5 ± 1.4
	20	6.1 ± 0.1	6.5 ± 0.2	6.6 ± 0.2
		27.1 ± 1.4	28.8 ± 0.9	29.2 ± 1.1
Кукуруза	0	4.2 ± 0.3	5.3 ± 0.3	5.1 ± 0.2
		12.1 ± 0.9	13.6 ± 0.8	13.7 ± 1.1
	1	4.4 ± 0.3	4.5 ± 0.2	4.8 ± 0.2
		11.3 ± 0.6	11.4 ± 0.9	11.9 ± 0.9
	20	3.9 ± 0.4	4.3 ± 0.5	4.4 ± 0.4
		7.6 ± 0.7	8.5 ± 0.9	8.5 ± 0.8
Подсолнечник	0	2.7 ± 0.3	3.7 ± 0.3	4.3 ± 0.3
		3.4 ± 0.4	6.3 ± 0.3	6.7 ± 0.7
	1	4.4 ± 0.3	4.7 ± 0.3	4.4 ± 0.3
		7.7 ± 0.8	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.6
	20	4.2 ± 0.5	4.5 ± 0.2	4.3 ± 0.2
		2.9 ± 0.3	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.2

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

Таблица 2

Ростовые показатели растений в условиях загрязнения почвы ионами кадмия (см)

С/х культура	Концентрация Cd, мг/кг	Вариант			
		контроль	+ <i>B. sub.</i> 26Д	+ <i>B. sub.</i> 11ВМ	Эпин
Пшеница	0	37.2 ± 1.2	40.2 ± 1.2	42.9 ± 1.2	40.0 ± 1.1
		53.6 ± 1.8	73.5 ± 3.3	63.3 ± 1.1	57.5 ± 3.2
	40	40.4 ± 1.3	43.2 ± 1.1	45.4 ± 1.0	37.8 ± 1.3
		84.8 ± 3.0	101.3 ± 3.6	67.8 ± 0.9	90.4 ± 3.1
	500	42.7 ± 1.4	43.9 ± 1.7	38.3 ± 1.4	36.6 ± 1.5
		36.1 ± 2.4	30.5 ± 1.7	52.1 ± 1.1	25.5 ± 1.1
Кукуруза	0	23.4 ± 1.2	35.3 ± 1.2	53.2 ± 1.5	26.7 ± 1.1
		26.3 ± 0.6	40.7 ± 0.7	50.1 ± 1.0	38.6 ± 1.0
	40	34.5 ± 1.6	39.0 ± 0.8	49.2 ± 1.1	30.1 ± 1.4
		35.7 ± 1.1	52.6 ± 0.7	44.5 ± 0.4	35.3 ± 1.1
	1000	20.2 ± 2.1	22.2 ± 1.3	22.0 ± 1.3	23.1 ± 1.5
		20.4 ± 1.1	25.8 ± 1.1	24.0 ± 1.2	29.2 ± 1.3
Подсолнечник	0	18.3 ± 0.3	19.1 ± 0.4	20.5 ± 0.5	18.7 ± 0.4
		12.1 ± 0.4	13.7 ± 0.4	13.7 ± 0.5	13.2 ± 0.3
	40	19.2 ± 0.4	21.0 ± 0.3	21.4 ± 0.4	22.3 ± 0.6
		12.9 ± 0.4	14.6 ± 0.6	14.5 ± 0.3	13.0 ± 0.4
	1000	18.0 ± 0.5	18.1 ± 0.9	21.3 ± 0.5	17.6 ± 0.5
		9.2 ± 0.4	12.0 ± 0.5	8.2 ± 0.3	9.1 ± 0.4

Примечание. То же, что для табл. 1

Для сравнения антистрессового эффекта клеток бацилл в вегетационных опытах был включен вариант, в котором семена предварительно замачивали в растворе эпина. Как показали результаты стрессоустойчивость растений, обработанных клетками *B. subtilis* не только не отличалась от действия эпина, но даже превосходила его (табл. 2).

Таким образом, обработка растений эндофитными штаммами *B. subtilis* ослабляла токсическое действие ионов кадмия. Каждый штамм проявлял себя индивидуально в сочетании с различными видами растений и ионами кадмия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Квеситадзе Г. И., Хатисашвили Г. А., Евстигнеева З. Г. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях. М.: Наука, 2005. –199 с.
2. Серегин И. В., Иванов В. Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 606–630.
3. Белимов А. А., Кунакова А. М., Сафронова В. И., Степанок В.В., Юдкин Л. Ю., Алексеев Ю. В., Кожемяков А. П. Использование ассоциативных бактерий для инокуляции ячменя в условиях загрязнения почвы свинцом и кадмием // Микробиология. 2004. Т. 73. №1. С. 118–125.
4. Burd G. I., Dixon D. G., Glick B. R. Plant growth promoting that decrease heavy metal toxicity in plants // Canadian Journal of Microbiology. 2000. V. 46. P. 247–255.
5. Сиунова Т. В., Кочетков В. В., Боронин А. М. Влияние ризосферных бактерий на аккумуляцию никеля растениями ячменя // Агрехимия. 2006. №10. С. 80–84.
6. Mannanov R. N., Sattarova R. K. Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria // Chemistry of Natural Compounds. 2001. V. 37. №2. P. 117–123.
7. Мубинов И. Г. Реакции пшеницы на действие клеток эндофитного штамма 26D *Bacillus subtilis* – основы биофунгицида фитоспорин: Автореф. дисс... канд. биол. наук. Уфа, 2007. 22 с.
8. Хайруллин Р. М., Недорезков В. Д., Мубинов И. Г., Захарова Р. Ш. Повышение устойчивости пшеницы к абиотическим стрессам эндофитным штаммом *Bacillus subtilis* // Вестник ОГУ. 2007. №2. С. 129–134.
9. 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.
10. Архипова Т. Н., Веселов С. Ю., Мелентьев А. И., Мартыненко Е. В., Кудоярова Г. Р. Сравнение действия штаммов бактерий, различающихся по способности синтезировать цитокинины, на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы // Физиология растений. 2006. Т. 53. №4. С. 567–574.
11. Мелентьев А. И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohc в агроэкосистемах. М.: Наука. 2007. 147 с.
12. Cagno R., Guidi L., Stefani A., Soldatini G. F. Effects of cadmium on growth of *Helianthus annuus* seedlings: physiological aspects // New Phytologist. 1999. V.144. P. 65–71.
13. Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. –172 с.
14. Иванов В. Б., Быстрова Е. И., Серегин И. В. Сравнение влияния тяжелых металлов на рост корня в связи с проблемой специфичности и избирательности их действия // Физиология растений. 2003. Т.50. С. 445–454.
15. Битюцкий Н. П. Необходимые микроэлементы растений. СПб: Издательство ДЕАН, 2005. 256 с.

Поступила в редакцию 13.11.2012 г.