



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>


ВЛИЯНИЕ ТИТРА МИКРООРГАНИЗМОВ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ИХ РОСТ- СТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ В УСЛОВИЯХ ГЕТЕРОТРОФНОГО ПИТАНИЯ РАСТЕНИЙ

Архипова Т.Н., Кузьмина Л.Ю.,
Кудоярова Г.Р.

Уфимский институт биологии Уфимского
федерального исследовательского центра РАН, Уфа
E-mail: tnarkhipova@mail.ru

Препараты на основе рост стимулирующих бактерий все шире применяются в растениеводстве, о чем свидетельствует ежегодный прирост их продаж на 10 %. В этих условиях возрастает необходимость повышения эффективности отбора новых штаммов рост стимулирующих бактерий. Объектом исследований служила почвенная бактерия *Paenibacillus ehimensis* IB 739 из коллекции УИБ УФИЦ РАН (основа препарата “Бациспекин”). Была показана способность штамма *Paenibacillus ehimensis* IB 739 продуцировать цитокинины. Оценивался рост трехсуточных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) после бактеризации семян различными препаративными формами штамма (исходной и разведенной суспензией, биомассой и культуральной жидкостью) в норме и при стрессе (100мМ NaCl) в условиях гетеротрофного питания растений. Показано, что как бактериальные клетки, так и культуральная жидкость оказывают влияние на результаты биотестирования, и оба эти компонента должны присутствовать при испытании штаммов – стимуляторов роста растений. Для получения адекватных результатов по регуляции роста корней важно разводить исходную суспензию и не очищать ее от культуральной жидкости. Вместе с тем, при акценте на рост побега обработка биомассой, отделенной от культуральной жидкости, может дать положительный результат. Наши результаты показывают, что первичное биотестирование потенциальной способности бактериальных препаратов стимулировать рост растений как в оптимальных, так и в стрессовых условиях можно проводить на всходах, выращенных в темноте. Штамм *Paenibacillus ehimensis* IB 739 можно рассматривать в качестве перспективного биоагента для его применения в условиях засоления.

Ключевые слова: PGPR, экспресс-оценка рост стимулирующей активности, фитогормоны, *Triticum aestivum*

THE INFLUENCE OF THE TITER OF MICROORGANISMS ON THE RESULTS OF THEIR GROWTH-STIMULATING ACTIVITY IN THE HETEROTROPHIC NUTRITION OF PLANTS

Arkhipova T.N., Kuzmina L.Y.,
Kudoyarova G.R.

Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre
of Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: tnarkhipova@mail.ru

The promising nature of biotechnology based on increasing crop yield and plant resistance with the help of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) determines the urgency of the search for new and more effective strains. The object of the study was a soil bacteria *Paenibacillus ehimensis* IB 739 (the basis of the preparation “Bacispecin”) from the collection of the UIB RAS. The ability of the strain *Paenibacillus ehimensis* IB 739 to produce cytokinins has been shown. The growth of three-day wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) was assessed after seed bacterization with various preparative forms of the strain in normal and stress (100 mM NaCl) under conditions of heterotrophic plant nutrition. It was shown that both bacterial cells and cultured fluid affect the results of biotesting, and both of these components should be present during the testing of bacterial preparations. To obtain adequate results on the regulation of root growth, it is important to dilute the initial suspension and not to purify it from the culture liquid. However, with an emphasis on shoot growth, treatment with biomass separated from the culture liquid may yield a positive result. Thus our results show that the primary biotesting of the potential ability of bacterial preparations to stimulate plant growth under both optimal and stress conditions can be carried out on seedlings grown in the dark. The strain of *Paenibacillus ehimensis* IB 739 can be considered as a promising bioagent for its application in salinization conditions.

Keywords: PGPR, rapid assessment of growth-stimulating activity, phytohormones, *Triticum aestivum*

Поступила в редакцию: 2.10.2018

DOI: [10.31163/2618-964X-2018-1-2-97-104](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2018-1-2-97-104)

Способность некоторых ризосферных бактерий (так называемых Plant Growth Promoting Rhizobacteria - PGPR) стимулировать рост растений как в нормальных, так и стрессовых условиях, стало основой биотехнологии использования бактериальных препаратов как средства повышения урожайности и устойчивости возделываемых растений. Судя по публикациям последних лет, этот подход становится все более популярным [Olanrewaju et al., 2017; Nadeem et al., 2014; Воеводина, Балакай 2017; Numan et al., 2018]. Предполагается, что способность бактерий этого типа стимулировать рост растений в определенной степени зависит от продукции ими фитогормонов [Dusa et al., 2014; Glick 2015]. Ранее нами было выявлено повышенное накопление биомассы у растений салата и пшеницы под влиянием интродукции в их ризосферу бактерий, продуцирующих цитокинины [Архипова и др., 2006; Arkhipova et al., 2007; Kudoyarova et al., 2014] и ауксины [Kudoyarova et al., 2017], а также возрастание урожайности растений пшеницы при обработке семян бактериями, продуцирующими фитогормоны [Wilkinson et al., 2012]. Очевидная перспективность биотехнологии повышения урожайности и устойчивости растений с помощью PGPR определяет актуальность поиска новых, более эффективных штаммов. Хотя оценка способности бактерий к накоплению фитогормонов в их культуральной жидкости может быть использована для первичного отбора перспективных штаммов, не было обнаружено прямой корреляции между уровнем продукции фитогормонов *in vitro* и их рост стимулирующим действием на растения *in vivo* [Kudoyarova et al., 2017]. Эти результаты свидетельствуют о недостаточности оценки присутствия гормонов в культуральной жидкости и о необходимости тестирования роста стимулирующего действия бактерий непосредственно на растениях. Хотя в конечном итоге важно проверить действие бактерий на растения, которые растут на свету в почве, этот подход достаточно трудоемок и длителен даже в лабораторных условиях, что определяет необходимость использования более простых первичных биотестов. Таким подходом может быть обработка семян бактериальным препаратом перед их проращиванием в чашках Петри в термостате в отсутствие освещения, т.е. в условиях гетеротрофного питания растений. Предварительная оценка влияния нескольких штаммов, продуцирующих цитокинины и ауксины, на рост растений пшеницы в этих условиях выявила рост стимулирующую активность у некоторых из них при тестировании в присутствии хлорида натрия и без него [Кудоярова и др., 2017]. Однако последующие результаты оказались противоречивыми и рост стимулирующая активность бактерий не определялась. Мы предположили, что противоречивость результатов оценки может быть связана с неодинаковым титром бактериального препарата, что было проверено в данной работе.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования служил штамм *Paenibacillus ehimensis* IB -739 (ВКМ В-2680D) (основа биопрепарата Бациспецин). Выбор штамма *Paenibacillus ehimensis* IB 739 как объекта исследований был продиктован возможностью отработки экспресс-метода оценки роста стимулирующей активности микроорганизмов на штамме с известным положительным

действием на рост растений [Мелентьев 2007; патент RUS 1743010]. Штамм *Paenibacillus ehimensis* IB 739 культивировали в жидкой питательной среде, содержащей крахмал (10 г/л), кукурузный экстракт, пептон, дрожжевой экстракт (3 г/л каждый), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and KH_2PO_4 (2 г/л каждый) в колбах на шейкере VTM-12-250 при 37°C и 160 об/мин в течение 72 часов. Биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 минут.

Стерилизацию семян мягкой пшеницы сорта Омская 35 (*Triticum aestivum* L.) проводили их замачиванием в растворе 96% этанола и 3% H_2O_2 (1:1) в течение 3 минут. Затем, после многократной промывки семян стерильной водопроводной водой, проводили их бактеризацию с добавлением Na-карбоксиметилцеллюлозы и воды. Биотестирование роста регулирующей активности штамма *Paenibacillus ehimensis* IB 739 проводили, обрабатывая семена исходной бактериальной суспензией, десятикратно разведенной суспензией, культуральной жидкостью и биомассой, разведенной в 10 раз. Семена пшеницы по 20 штук помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную 4 мл стерильной водопроводной воды или таким же количеством 100 мМ раствора NaCl. Контролем служил вариант без обработки семян микроорганизмами (без внесения соли или на фоне 100 мМ раствора NaCl). Чашки Петри находились в темноте при комнатной температуре в течение трех суток. В конце эксперимента оценивали длину coleoptилей, длину корней, сырую массу проростков.

Для оценки уровня накопления цитокининов в процессе культивирования бактерий цитокинины дважды экстрагировали из культуральной жидкости *n*-бутиловым спиртом в соотношении 2:1 (водная фаза/органическая фаза) [Yokota, Murofushi, 1980]. После упаривания спирта сухой остаток растворяли в 20 мкл 80 %-ного спирта и проводили тонкослойную хроматографию на пластинах для ТСХ производства фирмы “Sigma-Aldrich” в верхней фазе хроматографической смеси *n*-бутанол:аммиак:вода (6:1:2). Зоны хроматограммы, соответствующие положению метчиков зеатина, его рибозида и нуклеотида элюировали нейтральным фосфатным буфером и проводили количественное определение цитокининов с помощью иммуноанализа как описано [Kudoyarova et al., 2014].

Статистическую обработку данных проводили по стандартным программам MS Excel. Результаты по длине и массе побегов и корней представляли в виде средней арифметической \pm ошибка средней, где достоверность различий по сравнению с контролем оценивали по *t*-критерию Стьюдента $p \leq 0.05$, *t*-тест.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммуноанализ цитокининов в культуральной жидкости бактерий выявил присутствие этих гормонов (рис.1). Поскольку, цитокинины отсутствовали в исходной среде для культивирования бактерий, а концентрация этих гормонов возрастала с нарастанием бактериальной массы в процессе культивирования, эти результаты свидетельствуют о способности бактерий данного штамма продуцировать цитокинины.

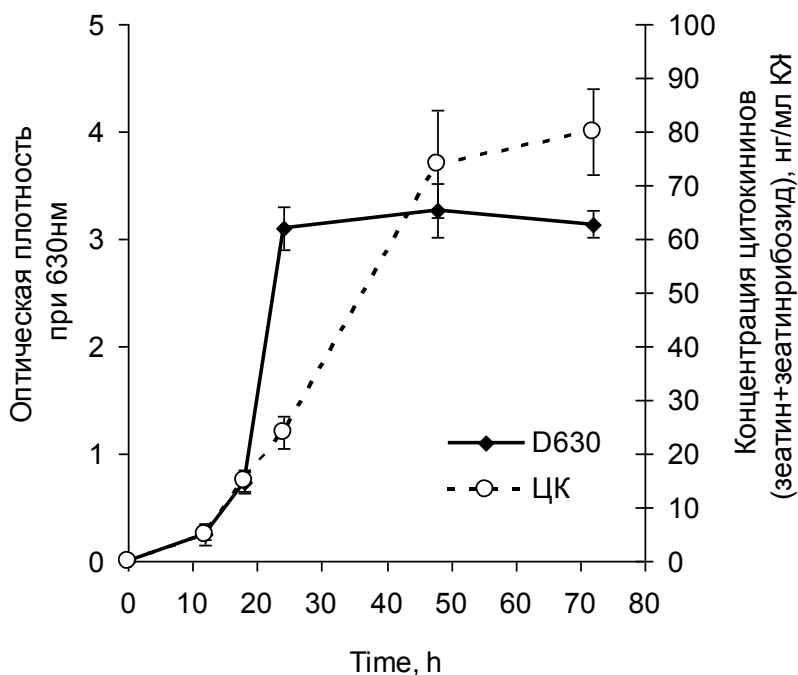


Рис.1 Динамика роста биомассы и накопления цитокининов в культуральной жидкости штамма *Paenibacillus ehimensis* IB 739.

Титр штамма на семенах, обработанных культуральной жидкостью, отделенной от биомассы, был низким, что свидетельствует об эффективности отделения биомассы (рис.2). Максимальный высокий титр был в случае обработки семян исходной бактериальной суспензией, а у семян, обработанных разведенной суспензией, величина КОЕ снижалась на порядок, что соответствовало десятикратному разведению препарата. Численность бактерий в варианте с обработкой биомассой, отделенной от культуральной жидкости, была такой же, как и в варианте с обработкой семян разведенной суспензией.

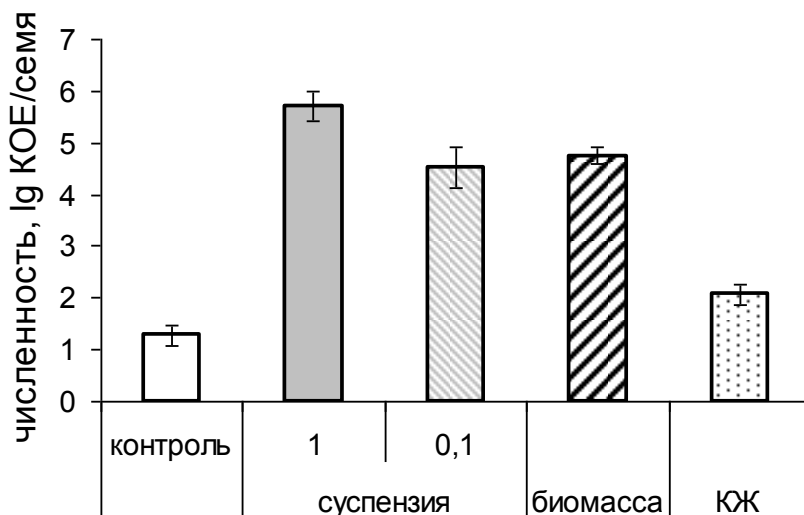


Рис.2 Титр *Paenibacillus ehimensis* IB 739 на семенах пшеницы после их бактеризации различными препаративными формами штамма. 1–исходная суспензия; 0.1–десятикратное разведение суспензии.

Сравнение длины и массы проростков пшеницы выявило большую отзывчивость корней, чем побегов после обработки семян (табл. 1, рис. 3). Так, суммарная длина всех корней возрастала под влиянием обработок в отдельных вариантах от полутора до 2,3 раза, а масса корней – от 1,3 до 1,8 раза, в то время как достоверное изменение длины побега было

зарегистрировано только в варианте обработки семян биомассой, и масса побега в этом случае возростала на 20 %. Таким образом, сравнительная оценка разных вариантов обработки в основном проводилась по показателям длины и массы корней.

Таблица 1. Влияние бактериализации семян различными препаративными формами штамма *Paenibacillus ehimensis* IB 739 на массу проростков пшеницы в норме и при стрессе (100 мМ NaCl). (n=60)

Вариант обработки семян		Сырая масса корней, мг/растение		Сырая масса побегов, мг/растение	
		- NaCl	+ NaCl	- NaCl	+ NaCl
Контроль (без бактериализации)		19.6±1.2	13.1±0.6	30.1±1.5	17±0.7
Суспензия	исходная	13.2±0.8	11.5±0.8	24.6±1.3	15±0.7
	10-кр. разведение	33.2±1.6*	23.2±1*	31.2±1.3	17.8±0.6
Биомасса		23.1±1*	13.2±0.6	35.7±0.9*	18.5±0.7
Культуральная жидкость		25.2±1.1*	14.9±0.3*	32.1±1.3	16.6±0.8

* различия по сравнению с контролем достоверны при $p \leq 0.05$, *t*-тест.

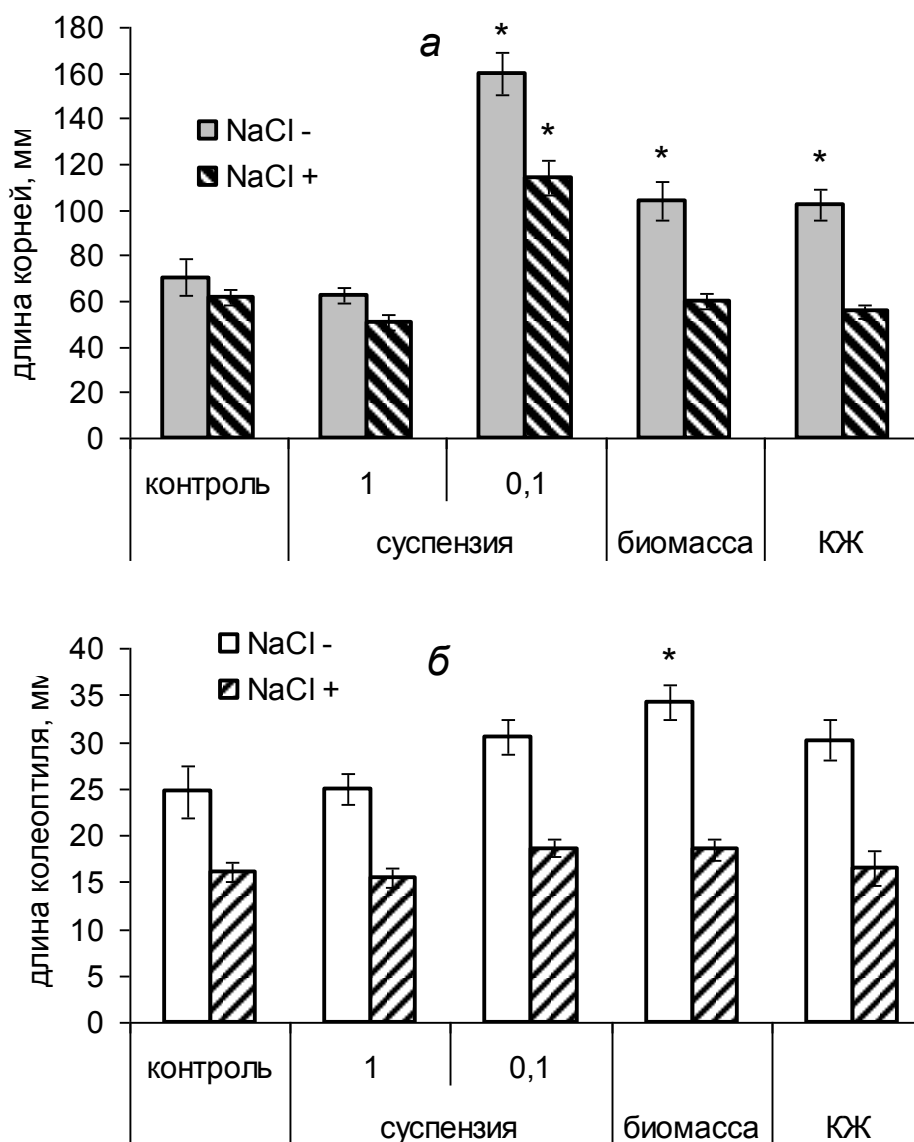


Рис.3 Влияние бактериализации семян различными препаративными формами штамма *Paenibacillus ehimensis* IB 739 на рост трехсуточных проростков пшеницы в норме и при стрессе (100 мМ NaCl). 1–исходная суспензия; 0,1–десятикратное разведение суспензии.

Обработка семян исходным бактериальным препаратом отрицательно сказывалась на росте растений, что наиболее ярко проявлялось в отсутствие стрессового воздействия (засоления), которое само по себе также ингибировало рост растений. Корни в варианте с обработкой семян в этом случае (без NaCl) были на 12 % короче, а их масса на 33 % меньше, чем в контроле. Даже по массе побега на фоне обработки исходным бактериальным препаратом было зарегистрировано достоверное снижение по сравнению с контролем (на 19 %). Мы предположили, что результаты биотестирования могли быть связаны с избыточно высоким титром исходной бактериальной суспензии.

Десятикратное разведение исходной суспензии сопровождалось проявлением способности штамма стимулировать рост растений. Это было хорошо заметно по увеличению массы корней в 1,7 раза по сравнению с контролем (от 20 до 33 мг на растение) у растений, которые росли в отсутствие соли, и в 1,8 раза (от 13 до 23 мг на растение) у растений на фоне добавления в среду хлорида натрия. В отсутствие засоления корни растений, семена которых перед посадкой обрабатывали разведенной суспензией, были более, чем в 2 раза длиннее контрольных растений (суммарная длина всех корней в расчете на одно растение составила 70 и 160 мм в контроле и опыте, соответственно). На фоне засоления прибавка была меньше, но также существенна (62 и 114 мм на контроле и в опыте, соответственно). Таким образом, биотестирование разведенной суспензии подтвердило способность бактерий данного штамма стимулировать рост растений, что соответствовало предшествующим результатам полевых экспериментов [Кузьмина и др., 2003]. Обнаруженная в данных экспериментах способность бактериального препарата активировать рост растений не только в оптимальных, но и стрессовых условиях соответствует полученным нами ранее результатам, где было показано рост стимулирующее действие бактерий, синтезирующих цитокинины, в условиях засухи [Arkhipova et al., 2007].

Ингибирующее действие исходной неразведенной бактериальной суспензии могло быть следствием того, что биотестирование проводилось в темноте, когда рост растений осуществлялся за счет гетеротрофного питания. При этом бактерии, очевидно, конкурировали с растениями за субстрат для роста, что проявлялось при их высоком титре. Ранее нами было показано, что продуцируемые бактериями цитокинины стимулируют корневую экссудацию растений, обеспечивая тем самым доступность синтезируемых растениями метаболитов для бактерий [Kudoyarova et al., 2014]. Этот эффект не проявлялся при высоком титре бактериального препарата в наших экспериментах, что свидетельствует о необходимости разведения бактериальных препаратов перед их биотестированием. Однако, ингибирующее действие высокого титра бактериального препарата не проявлялось ни в полевых экспериментах [Wilkinson et al., 2012], ни в лабораторных исследованиях на растениях, которые выращивали на свету [Arkhipova et al., 2006; Архипова и др., 2006]. Хотя урожайность пшеницы снижалась при предпосевной обработке семян бактериальным препаратом с высоким титром (10^7 КОЕ/семя) по сравнению с разведенным препаратом (титр 10^6 КОЕ/семя), в полевых условиях в обоих случаях обработки масса зерен была выше, чем в контроле (4,1 и 4,9 г зерна на растение при обработке более концентрированным и разведенным препаратом соответственно, при урожайности в контроле – 2,9 г зерна на растение). Очевидно в автотрофных условиях, когда растения могли продуцировать достаточно органических соединений, как для себя, так и для ризосферных микроорганизмов, бактерии в полной мере проявляли свою способность стимулировать рост и урожайность растений.

В отсутствие засоления отделение биомассы от культуральной жидкости снижало стимулирующее действие бактерий на рост корней. Если в этих условиях длина корней растений, семена которых обрабатывали разведенной суспензией, содержащей культуральную жидкость, была в два с лишним раза больше, чем в контроле, то обработка семян отделенной от культуральной жидкости бактериальной биомассой приводила лишь к полуторакратному удлинению корней по сравнению с контролем. Важно отметить, что количество бактерий, которые были выявлены на семенах при обоих вариантах обработки (обработка разведенной суспензией, содержащей культуральную жидкость, и отделенной от нее бактериальной биомассой) было примерно одинаковым.

На фоне засоления рост стимулирующее действие биомассы на длину корней не проявлялось. При оценке массы корней прослеживалась та же закономерность. В варианте обработки только биомассой без культуральной жидкости рост стимулирующий эффект снижался с 1,7 до 1,3 раза при проведении испытаний в отсутствие засоления среды. При этом на фоне добавления хлорида натрия различий по сравнению с контролем по накоплению биомассы растений выявлено не было. Эти результаты указывают на рост-стимулирующую активность, которая проявлялась в отношении роста корней у компонентов, содержащихся в самой культуральной жидкости, роль которых возрастает на фоне стрессового воздействия. Представляет интерес небольшая, но достоверная прибавка (по сравнению с контролем) массы побега у растений при обработке их семян именно очищенной от культуральной жидкости бактериальной массой (ни в одном другом варианте обработки стимулирующего эффекта не было выявлено). На фоне засоления эта реакция не проявлялась. Эти результаты указывают на неоднозначное действие синтезируемых бактериями веществ на рост побегов и корней.

Сама по себе обработка семян культуральной жидкостью, отделенной от бактериальных клеток, также стимулировала рост корней растений пшеницы, что проявлялось как в увеличении длины корней, так и их биомассы. В отсутствие засоления стимулирующий эффект был таким же, как у отделенной от культуральной жидкости бактериальной биомассы (но ниже, чем в случае обработки семян разведенной суспензией). Стимулирующий эффект культуральной жидкости на рост корней проявлялся не только в отсутствие засоления, но и в стрессовых условиях. В этом было отличие его действия от биомассы без культуральной жидкости, рост стимулирующее действие которой на корни проявлялось только в отсутствие стресса. Эти результаты свидетельствуют о том, что как бактериальные клетки, так и культуральная жидкость оказывают влияние на растения и оба эти компонента должны присутствовать при испытании бактериальных препаратов.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что первичное биотестирование потенциальной способности бактериальных штаммов стимулировать рост растений, как в оптимальных, так и стрессовых условиях, может проводиться на проростках, которые растут в темноте. Однако для получения адекватных результатов по регуляции роста корней важно разводить исходную суспензию и не очищать ее от культуральной жидкости. Вместе с тем, при акценте на рост побега обработка биомассой, отделенной от культуральной жидкости, может дать положительный результат. По результатам тестирования штамм *Paenibacillus ehimensis* IB 739 можно рассматривать в качестве перспективного биоагента для его применения в условиях засоления почв. Рост-стимулирующий эффект возможно связан с его способностью продуцировать цитокинины.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-00577 А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Мелентьев А.И. и др. Влияние микроорганизмов, продуцирующих цитокинины, на рост растений. *Биотехнология*. 2006, (4), 50–55.
2. Воеводина Л.А., Балакай Г.Т. Обзор новых направлений исследований по использованию микроорганизмов для повышения биопродуктивности засоленных земель. *Научный журнал Российского НИИ проблем мелиорации*, 2017, 4(28), 154–169.
3. Кудоярова Г.Р., Архипова Т.Н., Кузьмина Л.Ю., Веселов С.Ю. Влияние рост стимулирующих и гормон продуцирующих бактерий на уровень оксидативного стресса у растений пшеницы при засолении. В сборнике: Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений. Роль активных форм кислорода в жизни растений. Материалы II Международного симпозиума и международной научной школы. Редактор И.В. Максимов и др. 2017. С. 137–140
4. Кузьмина Л.Ю., Мелентьев А.И. Колонизация ризосферы яровой пшеницы бактериями рода *Bacillus Cohn* при бактеризации семян. *Микробиология*. 2003, 72(2), 268–274.
5. Мелентьев А. И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus Cohn* в агроэкосистемах. М.: Наука, 2007, 148 с
6. Штамм бактерий *Bacillus sp.* для получения препарата против возбудителей болезней злаковых культур. Мелентьев А.И., Усанов Н.Г., Логинов О.Н. Патент на изобретение [RUS 1743010 03.10.1989](#).
7. Arkhipova T.N., Melentev A.I., Martynenko E.V. et al. Comparison of effects of bacterial strains differing in their ability to synthesize cytokinins on growth and cytokinin content in wheat plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2006. 53(4). 507–513.
8. Arkhipova T.N., Prinsen E., Veselov S.U. et al. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant Soil*. 2007, 292, 305–315. DOI: [10.1007/s11104-007-9233-5](#)
9. Duca D., Lorv J., Patten C. et al. Microbial indole-3-acetic acid and plant growth. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2014, 106(1), 85–125. DOI: [10.1007/s10482-013-0095-y](#)
10. Glick B.R. (2015) Modulating phytohormone levels. In: Beneficial plant-bacterial interactions. Springer International Publishing, Cham, pp 65–96. DOI: [10.1007/978-3-319-13921-0_3](#)
11. Kudoyarova G.R., Melentiev A.I., Martynenko E.V. et al. Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 2014, (83), 285–291. DOI: [10.1016/j.plaphy.2014.08.015](#)
12. Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N. et al. Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate and P acquisition by wheat plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 2017, 39(11), 253. DOI: [10.1007/s11738-017-2556-9](#)
13. Nadeem S.M., Ahmad M., Zahir Z.A. et al. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology advances*, 2014, 32, 429–448. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2013.12.005](#)
14. Numan M., Bashir S., Khan Y. et al Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. *Microbiological Research*, 2018, 209, 21-32. DOI: [10.1016/j.micres.2018.02.003](#)
15. Olanrewaju O.S., Glick B.R., Babalola O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.*, 2017, 33(11), 197. DOI: [10.1007/s11274-017-2364-9](#)
16. Wilkinson S., Kudoyarova G.R., Veselov D.S. et al. Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *Journal of Experimental Botany*. 2012, 63(9), 3499–3509. DOI: [10.1093/jxb/ers148](#)
17. Yokota T., Murofushi N. Extraction, Purification and Identification // Hormonal Regulation of Development 1.-Springer-Verlag Heidelberg New York. 1980. P. 113-190. DOI: [10.1007/978-3-642-67704-5_3](#)