



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



ВЛИЯНИЕ *BACILLUS GINSENGIHUMI* M2.11 И *PANTOEA BRENNERI* AS3 НА ПРИРОСТ БИОМАССЫ РАСТЕНИЙ И ЭНЕРГИЮ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН

Иткина Д.Л.*, Сокольникова Л.В.,
Сулейманова А.Д., Шарипова М.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Казань (Россия)

*E-mail: laia9301@mail.ru

В современных условиях развития сельского хозяйства широкий интерес и практическую значимость приобретает применение микробиологических препаратов в качестве альтернативы минеральным удобрениям и химическим средствам защиты растений.

Почвенные микроорганизмы обладают способностью вступать во взаимодействие с корневой системой растений, оптимизировать минеральное питание, синтезировать гормоны роста и антимикробные соединения, угнетающие развитие фитопатогенных грибов и бактерий и оказывающие стимулирующее влияние на рост и развитие возделываемых культур, повышая их устойчивость к фитопатогенам и стрессам. Поиск экологически чистых технологий, применение ферментов и активных метаболитов бактериального происхождения или использование штаммов бактерий, способствующих росту растений является перспективным направлением.

Изучено влияние культуральной жидкости бактерий *Bacillus ginsengihumi* и *Pantoea brenneri* на среднюю длину стебля растения. При обработке семян пшеницы *P. brenneri* AS3 длина первого листа увеличилась на 50%, а *B. ginsengihumi* M2.11 на 25%.

Ключевые слова: биоудобрения ♦ бактерии ♦ растения ♦ *Pantoea* ♦ *Bacillus*

EFFECT OF *BACILLUS GINSENGIHUMI* M2.11 AND *PANTOEA BRENNERI* AS3 ON PLANT BIOMASS GROWTH AND SEED GERMINATION ENERGY

Itkina D.L.*, Sokolnikova L.V.,
Suleimanova A.D., Sharipova M.R.

Kazan (Volga region) Federal University,
Kazan (Russia)

*E-mail: laia9301@mail.ru

In the modern conditions of agricultural development, the use of microbiological preparations as an alternative to mineral fertilizers and chemical plant protection products is gaining wide interest and practical significance.

Soil microorganisms have the ability to interact with the root system of plants, optimize mineral nutrition, synthesize growth hormones and antimicrobial compounds that inhibit the development of phytopathogenic fungi and bacteria and have a stimulating effect on the growth and development of cultivated crops, increasing their resistance to phytopathogens and stress. The search for environmentally friendly technologies, the use of enzymes and active metabolites of bacterial origin, or the use of bacterial strains that promote plant growth is a promising direction.

The effect of culture fluid of *Bacillus ginsengihumi* and *Pantoea brenneri* on the average length of the plant stem was studied. When processing wheat seeds of *P. brenneri* AS3, the length of the first leaf increased by 50%, and *B. ginsengihumi* M2.11 by 25%.

Keywords: biofertilizer ♦ bacteria ♦ plant ♦ *Pantoea* ♦ *Bacillus*

Поступила в редакцию: 21.03.2021

DOI: 10.31163/2618-964X-2021-4-1-49-55

ВВЕДЕНИЕ

Население планеты увеличивается, и, следовательно, возрастает потребность в продуктах питания. На урожайность растений влияет множество факторов. Среди них нехватка питательных ресурсов почвы, вредное воздействие патогенных микроорганизмов. Чтобы поддерживать количество урожая на должном уровне, приходится прибегать к химическим пестицидам [Vasseur-Coronado et al., 2021]. В результате использования

пестицидов происходит истощение питательных веществ почвы, загрязнение воды, включение ядохимикатов в круговорот веществ и другие негативные последствия. Поэтому актуальной является проблема замены химических удобрений на биологические, в основе которых – микроорганизмы [Olanrewaju et al., 2017]. Биоудобрения в отличие от химических препаратов являются биоразлагаемыми, что делает их безопасными в использовании [Lugtenberg, Kamilova, 2009]. Важной характеристикой является низкая цена биоудобрений, они менее затратные, что экономически выгодно для сельского хозяйства [Olanrewaju et al., 2017]. Главным преимуществом в использовании биоудобрений на основе микроорганизмов является положительное влияние на рост и развитие растений, способствующее увеличению урожайности. Такие бактерии называют бактериями, стимулирующими рост растений – PGPB (plant growth promotion bacteria) [Olanrewaju et al., 2017]. Они способствуют росту растений путем синтеза и выделения фитогормонов, которые имеют огромное значение в развитии растения. В случае их дефицита у растений, могут помочь бактерии, вырабатывающие эти соединения и способные поддерживать оптимальный уровень фитогормонов при взаимодействии с растениями.

PGPB бактерии обитают на поверхности различных частей растений (корнях, стеблях, листьях, цветах, плодах), в их тканях и органах, колонизируют ризосферу, филосферу [Chen et al., 2017]. К PGPB бактериям можно отнести ризосферные бактерии, живущие вблизи корней растений и питающиеся органическими веществами, выделяемыми из них, бактерии, живущие на корнях и образующие клубеньки, а также эндофитные бактерии, которые обитают не только на поверхности, но и во внутренних тканях растений [Olanrewaju et al., 2017].

Стимуляция роста растений может быть достигнута благодаря различным механизмам, которыми обладают PGPB. Их можно разделить на прямые, приводящие к прямой стимуляции роста растений, и косвенные, основанные на подавлении жизнедеятельности патогенных микроорганизмов. К прямым механизмам относится выработка бактериями таких факторов роста, как ауксины, цитокинины, гиббереллины, а также же к ним можно отнести продукцию фермента 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы (КФ 3.5.99.7), катализирующего первичную деструкцию предшественника образования этилена [Olanrewaju et al., 2017, Sorty et al., 2016]. К прямым действиям PGPB бактерий можно отнести их способность к фиксации атмосферного азота и/или превращение труднорастворимых соединений фосфора в доступную для растений форму. Среди косвенных можно выделить выработку антибиотиков и ферментов, разрушающих клетки патогенов, индуцируемую системную резистентность и подавление чувства кворума [Olanrewaju et al., 2017].

Распространенным механизмом для стимуляции роста растений, является выработка ауксина [Olanrewaju et al., 2017]. Ауксины оказывают большое влияние на рост и развитие корней, листьев и зародышей растений [Sorty et al., 2016]. Распространенным гормоном ауксинового ряда является индол-3-уксусная кислота (ИУК) [Wagi et al., 2019; Estenson et al., 2018]. Также можно встретить такие соединения как индол-3-ацетамид, индол-3-пируват и индол-3-ацетальдегид, но они являются менее распространенными [Olanrewaju et al., 2017]. ИУК проникает в клетки растений и активирует протонную помпу. В результате ее работы происходит закисление матрикса клеточных стенок и усиление активности кислых гидролаз. Эти факторы являются необходимыми для роста клеток. ИУК играет важную роль в развитии проростков растений путем взаимодействия с абсцизовой кислотой, гиббереллинами и этилен-опосредованными путями [Sorty et al., 2016].

Другим значимым механизмом, обеспечивающим рост растений, является солюбилизация труднорастворимых соединений фосфора. Фосфор для растений является вторым по важности макроэлементом после азота. Он важен для метаболизма, а также для деления клеток, фотосинтеза, устойчивости к болезням и других механизмов, происходящих в растении [Bakhshandeh et al., 2014]. В почве содержится до 80-90% связанного фосфора [Ku et al., 2018]. В этой форме фосфор не усваивается растениями, дефицит доступного фосфора ограничивает рост растений и снижает урожайность. Чтобы решить эту проблему используют химические удобрения, содержащие фосфор в доступной для растений форме. Однако, внесение в почву минерального фосфора отрицательно сказывается не только на экологии окружающей среды, но и на конечной цене урожая. Решением проблемы может служить использование фосфатсоллюбилизирующих бактерий в качестве биоудобрений [Tahir et al., 2020]. Фосфатсоллюбилизирующие бактерии способны утилизировать фосфор из органических и неорганических, в том числе плохо растворимых фосфатов почвы [Li et al., 2017].

Соллюбилизация фосфора осуществляется за счет секреции экстрацеллюлярных ферментов, таких как фосфатазы, фитазы и С-Р-лиазы, которые могут расщеплять соединения фосфора [Lugtenberg, Kamilova, 2009], или благодаря секреции органических кислот, которые растворяют минеральные комплексы [Ku et al., 2018]. В результате бактериального воздействия фосфор становится доступным для растений и способствует ускоренному росту и развитию. Таким образом, положительное воздействие PGPB-бактерий на рост и развитие растений может осуществляться за счет продукции гормонов, литических ферментов, а также за счет превращения труднодоступных элементов минерального питания почвы в доступную для растений форму. Вместе с тем, при исследовании бактерий, способных одновременно к продукции ауксинов и соллюбилизации фосфатов, было обнаружено, что в полевых условиях повышенное накопление биомассы растений не коррелирует с потенциальной способностью штаммов бактерий продуцировать ауксины или осуществлять мобилизацию фосфатов *in vitro* [Kudoyarova et al., 2017]. Таким образом, считать, что наличие у PGPB бактерий одного из рассмотренных выше признаков недостаточно для окончательного вывода об их потенциальной практической пригодности.

Целью работы явилось исследование бактериальных штаммов *Bacillus ginsengihumi* M2.11 и *Pantoea brenneri* AS3, выделенных из почвы республики Татарстан по признаку максимальной фосфатсоллюбилизирующей активности, на энергию прорастания семян и прирост биомассы растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы растения пшеницы *Triticum aestivum* L сорт «Злата» и сорт «Тулаевская». и бактериальные штаммы *Bacillus ginsengihumi* M2.11 (ВКПМ В-11988) и *Pantoea brenneri* AS3 (ВКПМ В-11689), выделенные из почвы республики Татарстан по признаку максимальной фосфатредуцирующей способности. Питательные среды для культивирования микроорганизмов: Среда LB (%): триптон – 1.0; дрожжевой экстракт – 0.5; NaCl – 0.5; pH 8.5. Агаризованная среда LA включает дополнительно 2% агара. Культивирование бактерий проводили с использованием среды LB в соотношении объема среды к объему колбы (100 мл) составляло 1:5. Культивирование проводили в термостате при 37 °C при скорости ротации 200 мин⁻¹ в течение 24 часов.

Методика стерилизации семян. Стерилизацию семян производили в стерильных условиях по методике Ishiga [Ishiga et al., 2011]. Семена пшеницы в количестве 120 штук каждого сорта обрабатывали 70% этанолом в течении 3 минут при 100 мин⁻¹. Затем спирт сливали и обрабатывали семена стерилизующим раствором, состоящим из гипохлорита натрия, дистиллированной воды и Тритона X-100 в соотношении 5 мл : 5 мл : 50 мкл, в течении 10 минут при 100 об/мин. Раствор сливали и семена трижды промывали дистиллированной водой.

Обработка семян бактериями, и методика определения энергии прорастания. Простерилизованные семена инкубировали 2 часа при 100 мин⁻¹ в колбах с 15 мл бактериальной суспензии (в каждую колбу определенным штамм) и 15 мл дистиллированной воды. Контрольными образцами служили стерильные семена, выдержанные в дистиллированной воде

Обработанные семена раскладывали на увлажненную дистиллированной водой фильтровальную бумагу. Чашки Петри с семенами выдерживали при комнатной температуре. Добавляли дистиллированную воду в чашки. Делали замеры длины корней и формирующихся побегов через 72, 96, 144 и 264 часа и анализировали энергию прорастания семян в % по числу проросших семян, как описано в работе [Chen et al., 2017].

Статистическая обработка результатов. Для статистического анализа экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel. Для описания и сравнения признаков использовали построения 95%-х доверительных интервалов для средних величин. Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma < 10\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для выявления энергии прорастания семян нами проведен подсчет числа проросших семян пшеницы. Энергия прорастания семян контрольной группы, выдержанных в стерильной дистиллированной воде, составила 76%, а опытной группы, обработанных культуральной жидкостью бактерий *Bacillus ginsengihumi* M2.11 и *Pantoea brenneri* AS3, составила 92%, что свидетельствует о положительном влиянии обработки семян бактериями.

Для выявления способности исследуемых штаммов бактерий к стимулированию роста растений, нами измерялись длины корней и листьев зародышей из семян пшеницы, обработанных бактериями, у опытных и контрольных образцов (Рис.1). К 264 часу длины корней у зародышей семян сорта «Туалевская» и у зародышей семян сорта «Злата», инокулированных исследуемыми штаммами, были достоверно больше, чем у контрольных семян, обработанных дистиллированной водой. Также нами измерялись длины листьев зародышей семян (Рис. 1). Установлено, что длины листьев зародышей инокулированных семян обоих сортов больше, чем длины листьев у соответствующих контрольных образцов. Нами показано, что предпосевная обработка семян пшеницы культурой бактерий *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 существенно улучшает прорастание корней на 50% по сравнению с контролем.

Исследовали влияние обработки культуральной жидкостью бактерий на среднюю длину стебля растения. При обработке семян пшеницы культуральной жидкостью *P. brenneri* AS3 длина первого листа увеличилась на 50%, а *B. ginsengihumi* M2.11 на 25%.

Проводили измерение прироста биомассы пшеницы на 264 час исследования. Биомасса семян контрольной группы составила 6,079 г, биомасса семян опытной группы,

обработанных культуральной жидкостью *P. brenneri* AS3 составила 9,107 г, что соответствует 33% прироста биомассы. Биомасса семян опытной группы, обработанных культуральной жидкостью *B. ginsengihumi* M2.11, составила 8,821 г, что соответствует 31% прироста биомассы.

Исходя из полученных результатов, мы сделали вывод, что культуральная жидкость исследуемых бактерий *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 оказывала положительное влияние на прорастание семян пшеницы. При сравнении длин корней и листьев зародышей у инокулированных и неинокулированных семян пшеницы сортов «Тулаевская» и «Злата» нами установлено, что при обработке культуральной жидкостью бактериальных штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 показатели были больше, чем у контрольных образцов.

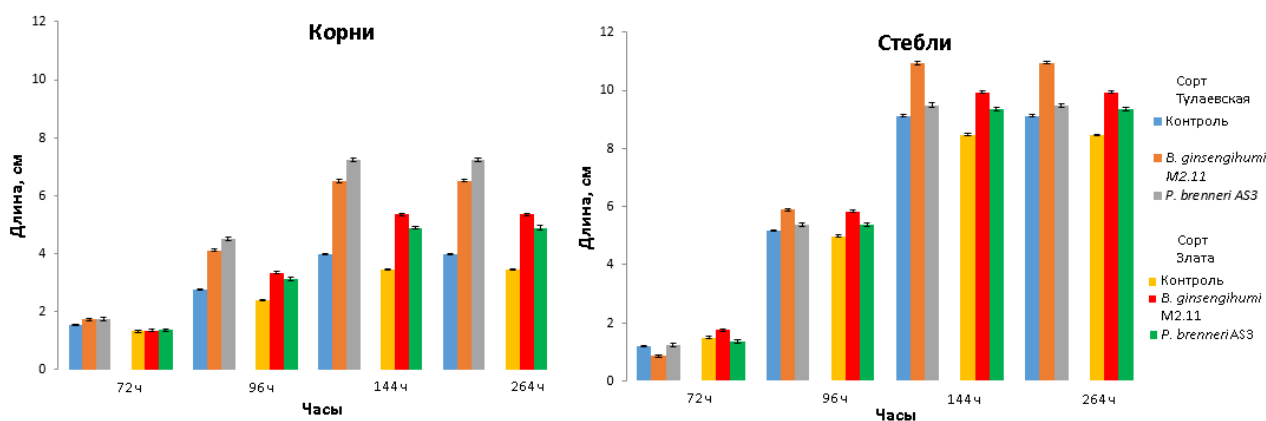


Рис. 1. Влияние штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 на длину формирующегося корня и высоту формирующегося проростка семян пшеницы сортов «Тулаевская» и «Злата».

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным результатам штаммы бактерий *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 обладают положительными эффектами на рост и жизнедеятельность растений. В ходе исследования нами выяснено, что обработка семян бактериями способствует увеличению прорастания семян на 16%. Предпосевная обработка семян пшеницы *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 улучшает прорастание корней на 50% и до 50% увеличивает длину первого листа по сравнению с контролем, а также способствует приросту биомассы на 33%. Положительное влияние бактериализации семян бактериями, способствующими росту растений, на урожайность пшеницы описано в работе [Arkhipova et al, 2019]

В последние годы бактериальные эндофиты привлекли значительное внимание из-за способности улучшать устойчивость растений к абиотическим стрессам. Исследования показали, что микробные симбионты обеспечивают растениям-хозяевам стрессоустойчивость, специфичную для среды обитания путем совместной эволюции растений и микроорганизмов в условиях окружающей среды. По данным литературы для штамма *Pantoea* LTYR-11ZT показано, что при инокуляции бактериями корней пшеницы длина корней, а также свежая масса увеличились на 29,3% и 20,8% соответственно, по сравнению с неинокулированными. Штамм *Pantoea* LTYR-11ZT способствовал росту пшеницы и повышал устойчивость растения к засухе [Chen et al., 2017]. Другие исследователи описали влияние бактерий *B. siamensis* на пшеницу, выращенную в загрязненной кадмием почве, в этих условиях в результате обработки пшеницы

эндофитным штаммом *B. siamensis* происходило увеличение длины корня на 15%, длины побега на 13%, площади поверхности листьев на 12%, свежей биомассы на 15% и сухой биомассы на 49% [Awan et al., 2020].

Таким образом, поиск полезных для растений микроорганизмов и создание их композиций, которые обеспечивают устойчивость растений к экологическому стрессу, особенно в почвенной среде, где стрессовые условия являются регулярным явлением, остается актуальным и востребованным для практического использования. Исследуемые нами бактерии *B. ginsengihumi* M2.11 и *P. brenneri* AS3 продемонстрировали экологический потенциал и могут служить основой как перспективные объекты для создания эффективных биоудобрений, улучшающих рост и развитие растений. Внедрение биоудобрений на основе микроорганизмов и их композиций в систему сельскохозяйственного производства приведет к повышению урожайности и снижению количества вносимых минеральных удобрений, а значит оздоровлению почвы. Разработка новых биоудобрений на основе фундаментальных знаний о физиологии и биологической активности бактерий, обогащение почвы микроорганизмами с полезными свойствами - это новый инновационный подход, который способствует уменьшению вредного воздействия минеральных удобрений на почвенную среду.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-38-90208.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arkhipova T.N., Galimsyanova N.F., Kuzmina L.Y., Vysotskaya L.B., Sidorova L.V., Gabbasova I.M., Melentiev A.I., Kudoyarova G.R. Effect of seed bacterization with plant growth-promoting bacteria on wheat productivity and phosphorus mobility in the rhizosphere // Plant, Soil and Environment. 2019. V. 65 (6). P.313-319. DOI: [10.17221/752/2018-PSE](https://doi.org/10.17221/752/2018-PSE)
2. Awan S.A., Piyas N., Khan I., Raza M.A., Rehman A.U., Rizwan M., Rastogi A., Tariq R., Brestic M. *Bacillus siamensis* Reduces Cadmium Accumulation and Improves Growth and Antioxidant Defense System in Two Wheat (*Triticum aestivum* L.) Varieties // Plants. 2020. V. 9 (7). Article: 878. DOI: [10.3390/plants9070878](https://doi.org/10.3390/plants9070878)
3. Bakhshandeh E., Rahimian H., Pirdashti H., Nematzadeh G.A. Phosphate solubilization potential and modeling of stress tolerance of rhizobacteria from rice paddy soil in northern Iran // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2014. V. 30 (9). P. 2437-2447. DOI: [10.1007/s11274-014-1669-1](https://doi.org/10.1007/s11274-014-1669-1)
4. Chen C. Xin K., Liu H., Cheng J., Shen X., Wang Y., Zhang L. *Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat // Scientific Reports. 2017. V. 7. Article: 41564. DOI: [10.1038/srep41564](https://doi.org/10.1038/srep41564)
5. Estenson K., Hurst G.B., Standaert R.F., Bible A.N., Garcia D., Chourey K., Doktycz M.J., Morrell-Falvey J.L. Characterization of indole-3-acetic acid biosynthesis and the effects of this phytohormone on the proteome of the plant-associated microbe *Pantoea* sp. YR343 // Journal of Proteome Research. 2018. V. 17 (4). P. 1363-1365. DOI: [10.1021/acs.jproteome.7b00708](https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00708)
6. Gao J., Xue J., Yan H., Tong S., Khan M.S., Wang L., Mao X., Zhang X., Sun J. *Pantoea endophytica* sp. nov., novel endophytic bacteria isolated from maize planting in different

- geographic regions of northern China // *Systematic and Applied Microbiology*. 2019. V. 42 (4). P. 488-489. DOI: [10.1016/j.syapm.2019.06.001](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.06.001)
7. Ishiga Y., T. Ishiga, S.R. Uppalapati, K.S. Mysore. *Arabidopsis* seedling flood-inoculation technique: a rapid and reliable assay for studying plant-bacterial interactions // *Plant Methods*. 2011. V. 7. Article: 32. DOI: [10.1186/1746-4811-7-32](https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-32)
 8. Ku Y., Xu G., Tian X., Xie H., Yang X., Cao C. Root colonization and growth promotion of soybean, wheat and Chinese cabbage by *Bacillus cereus* YL6 // *PLoS One*. 2018. V.13 (12). Article: e0210035. DOI: [10.1371/journal.pone.0200181](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200181)
 9. Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N., Kuzmina L.Yu., Galimsyanova N.F., Sidorova L.V., Gabbasova I.M., Melentiev A.I., Veselov S.Yu. 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. V. 39 (11). Article: 253. DOI: [10.1007/s11738-017-2556-9](https://doi.org/10.1007/s11738-017-2556-9)
 10. Li Z., Jiang J., Yu X., Wu C., Shen D., Feng Y. Poly(A) polymerase I participates in the indole regulatory pathway of *Pantoea agglomerans* YS19 // *Microbiology*. 2017. V. 163 (2). P. 197-206. DOI: [10.1099/mic.0.000415](https://doi.org/10.1099/mic.0.000415)
 11. Lugtenberg B., Kamilova F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria // *Annual Review of Microbiology*. 2009. V. 63 (1). P. 541-546. DOI: [10.1146/annurev.micro.62.081307.162918](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918)
 12. Olanrewaju O.S., Glick B.R., Babalola O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017. V. 33 (11). Article: 197. DOI: [10.1007/s11274-017-2364-9](https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9)
 13. Sorty A.M., Meena K.K., Choudhary K., Bitla U.M., Minhas P.S., Krishnani K.K.. Effect of Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Halophytic Weed (*Psoralea corylifolia* L) on Germination and Seedling Growth of Wheat Under Saline Condition// *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2016. V. 180 (5). P. 872-880. DOI: [10.1007/s12010-016-2139-z](https://doi.org/10.1007/s12010-016-2139-z)
 14. Tahir M., Naeem M. A., Shahid M., Khalid U., Farooq A. B. U., Ahmad N., Ahmad I., Arshad M., Waqar A. Inoculation of pqqE gene inhabiting *Pantoea* and *Pseudomonas* strains improves the growth and grain yield of wheat with a reduced amount of chemical fertilizer // *Journal of Applied Microbiology*. 2020. V. 129 (3). P. 575-587. DOI: [10.1111/jam.14630](https://doi.org/10.1111/jam.14630)
 15. Vasseur-Coronado M., du Boulois H. D., Pertot I., Puopolo G. Selection of plant growth promoting rhizobacteria sharing suitable features to be commercially developed as biostimulant products // *Microbiological Research*. 2021. V. 245. Article: 126672. DOI: [10.1016/j.micres.2020.126672](https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126672)
 16. Wagi S., Ahmed A. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA // *PeerJ*. 2019. V. 7. Article: e7258 DOI: [10.7717/peerj.7258](https://doi.org/10.7717/peerj.7258)