

С. Н. Масленникова, А. И. Шургин, В. К. Чеботарь,
А. В. Щербаков, А. В. Канарский

РИЗОСФЕРНЫЕ БАКТЕРИИ СЕЯНЦЕВ *Pinus sylvestris* L. И ОЦЕНКА ИХ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ КАЧЕСТВ

Ключевые слова: сеянцы сосны, ризосферные бактерии, фунгицидная и ростостимулирующая активность.

*Исследован видовой и количественный состав ризосферных бактерий сеянцев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). Показано, что средняя численность ризосферных бактерий в расчете на одно растение составляет $6,6 \times 10^6$ КОЕ. Установлено, что среди выделенных штаммов ризосферных бактерий чаще встречаются бактерии рода *Bacillus*. Исследуемые бактериальные штаммы проверены в тестах *in vitro* на способность подавлять рост фитопатогенных грибов и стимулировать рост редиса сорта «Ранний красный». Штаммы ризосферных бактерий с хозяйственно ценными свойствами рекомендованы для получения биопрепаратов и их применения в лесном хозяйстве.*

Key words: seedlings of pine, rhizospheric bacteria, fungicidal and growth stimulating activity.

*In the research species and quantitative composition of the rhizospheric bacteria of pine seedling (*Pinus sylvestris* L.) was investigated. The average number of rhizospheric bacteria per seedling was $6,6 \times 10^6$ CFU. Among the isolated strains bacteria of the genus *Bacillus* were more common. Bacterial strains under study were tested for the ability to inhibit the growth of pathogenic fungi and stimulate the growth of radish («The Early Red» variety). Strains of rhizospheric bacteria with economically valuable properties recommended for production of biological preparations and application forestry.*

Введение

Устойчивость растений к заболеваниям, вызываемым почвенными фитопатогенами, во многом определяется результатами взаимодействия между корневой системой растений и разнообразными микроорганизмами. Совокупность корневой системы с почвой представляет собой сложную экологическую нишу, заселенную полезными, вредными и нейтральными для растений микроорганизмами, и образует так называемую ризосферу [1]. Нормальная жизнедеятельность высших растений происходит только при их тесном взаимодействии с микроорганизмами, заселяющими ризосферу и составляющими ассоциацию: «микроорганизмы – корневая система растения» [2].

К настоящему времени накоплен большой экспериментальный материал [3, 4, 5, 6, 7, 8 и др.], доказывающий огромное и разнообразное значение ризосферной микрофлоры в жизни высшего растения.

Способность микроорганизмов ризосферы стимулировать рост и развитие растений связывают с улучшением их азотного и фосфорного питания, выделением гормонов, продукцией веществ антибиотической природы, угнетающих фитопатогенные микроорганизмы, и влиянием других факторов [9, 10, 11, 12].

Отмечается, что ассоциативные бактерии снижают заболеваемость растений различными вирусными, грибными и бактериальными инфекциями [4, 5, 13, 14]. Но не исключено, что они могут повышать устойчивость растений и к абиотическим стрессовым факторам [3, 6, 8], в частности к низким температурам [7, 15].

В последнее время все большее распространение получают инфекционные болезни, связанные с несбалансированным применением удобрений. Слишком высокие дозы минеральных

удобрений могут привести к деградации почвы, тем более что растения не в состоянии полностью их использовать [16]. Вместе с этим происходит загрязнение водоёмов, которое возникает как следствие перекачивания части внесённых минеральных удобрений через грунтовые воды [17].

Поэтому все более актуальным становится разработка систем интегрированной биологической защиты и стимуляции роста растений, не нарушающих экологического равновесия в почве и не загрязняющих окружающую среду. Необходимо использовать те препараты, которые не оказывают отрицательного влияния на компоненты биоценоза [16, 18]. Следует отметить, что такие биопрепараты, в частности бактериальные удобрения на основе ризосферных микроорганизмов, используют в сельском хозяйстве для стимулирующего воздействия на рост и развитие растений, продуцируя биологически активные вещества и ингибирования фитопатогенных микроорганизмов. Однако, несмотря на установленное отрицательное влияние фитопатогенных микроорганизмов на лесные культуры, до настоящего времени не созданы биопрепараты для их биозащиты [19].

В этой связи весьма актуальным является изучение симбиотических отношений такой экономически важной лесной культуры, как сосна, с ризосферными бактериями, и разработка на их основе высокоэффективных биопрепаратов для защиты лесонасаждений биологическими методами.

Целью настоящей работы явилось изучение видowego и количественного состава ризосферных бактерий проростков сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и оценка их хозяйственно ценных качеств.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. выделение штаммов ризосферных бактерий, используя метод активной колонизации корней, и определить их численность;

2. идентифицирование выделенных штаммов ризосферных бактерий на основе анализа гена 16S рРНК;

3. оценка фунгицидной и ростостимулирующей активности выделенных штаммов ризосферных бактерий.

Методы исследования

Основным растительным объектом исследования явились семена сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), собранные в Бушковском участковом лесничестве Сернурского лесничества республики Марий Эл.

Для поверхностной стерилизации отбирали 50 семян сосны обыкновенной и помещали их в стерильные колбы объёмом 50 мл. Использовали следующий вариант стерилизации:

- 1) 70 % этанол – 2 мин;
- 2) Промыть стерильной водой – 1 мин;
- 3) 5 – 15 % гипохлорит натрия (NaClO) – 7 мин;
- 4) Промыть стерильной водой – 1 мин;
- 5) 5 – 15 % гипохлорит натрия (NaClO) – 7 мин;
- 6) 5 -кратно промыть стерильной водой – 1 мин.

Эффективность метода стерилизации оценивали по всхожести семян и отсутствию бактериального роста на питательной среде. Для этого поверхностно стерилизованные семена подсушивали на стерильной фильтровальной бумаге, раскладывали на агаризованной среде R2A (г/л): дрожжевой экстракт – 0,5, пептон – 0,5, гидролизат казеина – 0,5, глюкоза – 0,5, крахмал – 0,5, KH_2PO_4 – 0,3, MgSO_4 – 0,024, пируват Na – 0,3, агар – 18, вода дистиллированная – 1000 мл, pH 6-6,5. Культивировали в течение 2-х суток в термостате при температуре 28 °С. На третьи сутки визуально регистрировали наличие или отсутствие бактериального роста вокруг семян.

Для оценки колонизирующей способности ризосферных бактерий были взяты 4 пробы дерново-подзолистой почвы из корнеобитаемого слоя сосны обыкновенной и ели европейской, растущих возле Павловского государственного музея-заповедника (г. Санкт-Петербург). Поверхностно стерилизованные семена сосны обыкновенной проращивали на стерильных фильтровальных дисках, смоченных водой, в течение 2 недель. Стерильные проростки раскладывали по чашкам Петри с 0,6 %-ной агарозой, а вокруг корня – комочки почвы на расстоянии 1 - 3 см таким образом, чтобы почва не касалась корней. Культивировали в термостате в течение 24 часов при температуре 28 °С. По истечении суток, корешок отрезали, асептически разрушали в стерильной ступке с добавлением 10 мл стерильного физиологического раствора и делали ряд последовательных разведений (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Из каждого разведения отбирали по 40 мкл суспензии и поверхностно высевали на питательный агар (Биокомпас-С, Россия). Посевы культивировали в течение 3-х суток при 28 °С. Затем проводили

подсчет выросших колоний и выделение различных по морфологии изолятов.

Идентификация выделенных штаммов бактерий проведена на основании ПЦР - амплификации и секвенирования гена 16S рРНК с использованием стандартных методов молекулярной биологии (полимеразная цепная реакция, выделение фрагментов ДНК из агарозного геля, определение и анализ нуклеотидных последовательностей) [20].

Бактериальную ДНК выделяли стандартным щелочным методом [21, 22]. Для наработки участков 16S рРНК гена использовали прямой праймер BD (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) и обратный праймер FD (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) [23]. Этапы полимеразной цепной реакции включали начальную денатурацию цепей ДНК при 94 °С в течение 1 мин; 30 циклов, каждый из которых состоял из 30 секунд при 94 °С, 30 секунд при 55 °С и 1 мин при 72 °С; и финальную стадию 5 мин при 72 °С. Амплифицированные участки ДНК выявляли с помощью горизонтального гель-электрофореза (Bio-Rad, США).

Для RFLP-анализа (Restriction fragment length polymorphism) использовали рестриктазы *Msp* I и *Hae* III (FastDigest). Рестриктонные фрагменты выявляли с помощью горизонтального гель-электрофореза. В качестве маркера использовали Ladder (50 - 1000 п. н.). Электрофорез проводили в течение 1 ч при постоянном напряжении 130 В.

Секвенирование было выполнено согласно протоколу фирмы Beckman Coulter (США) для 8-и канального секвенатора SEQ8000 с использованием коммерческого набора для секвенаторов «SEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) with Quick Start Kit». Видовую принадлежность клонов определяли с использованием программ BLAST GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) и Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Для того чтобы оценить фунгицидную активность выделенных ризосферных штаммов, из мицелия активно растущего на чашке Петри гриба вырезали кусочек, равный 1/8 от общей площади, помещали в стерильную чашку Петри и добавляли 10 мл стерильной воды. Стерильным шпателем аккуратно смывали споры с поверхности гриба. Отбирали 20 мкл суспензии спор, добавляли в 200 мл растопленной среды PDA (OXOID Ltd., Англия) температурой 40 – 45 °С, перемешивали и разливали по чашкам Петри. В застывшей среде стерильным пробочным сверлом делали «колодцы» [24], в которые добавляли по 100 мкл исследуемой бактериальной суспензии и инкубировали в течение одной недели при комнатной температуре, после чего регистрировали отсутствие или наличие зоны ингибирования роста гриба и измеряли радиус зон линейкой (рис. 1).



Рис. 1 – Зоны подавления роста фитопатогенного гриба *Fusarium sporotrichioides*

Для оценки ростостимулирующей активности выделенных штаммов ризосферных бактерий использовали семена редиса (*Raphanus sativus* L.) сорта «Ранний красный». Поверхностно-стерилизованные семена редиса (70 % этанол в течение 2 мин, затем промывали стерильной водой) замачивали в бактериальной суспензии на 30 мин, контрольный образец семян замачивали в стерильной воде. Затем в стерильные чашки Петри с фильтровальными дисками и ватой разливали по 15 мл стерильной воды и раскладывали по 16 стерильных семян. Чашки инкубировали в течение 2 суток при 28 °С. На третьи сутки измеряли линейкой длину корня и длину побега (рис. 2). Полученные данные обрабатывали с помощью программы Statistica v5.5 методом однофакторного дисперсионного анализа.



Рис. 2 – Проращивание семян редиса, обработанных суспензией ризосферных бактерий

Результаты и обсуждение

В опыте была определена средняя численность ризосферных бактерий в расчете на один проросток. Наибольшее количество бактерий наблюдается в варианте опыта № 4, где использовалась почва, взятая из-под ели европейской, и численность составила $9,5 \times 10^6$ КОЕ/растение. Несколько ниже наблюдалась численность микроорганизмов в вариантах опытов №1, 2 и 3 ($3,3 \times 10^6$, $6,3 \times 10^6$, $7,3 \times 10^6$ КОЕ/растение соответственно), в которых

использовалась почва, взятая из корнеобитаемого слоя сосны обыкновенной.

Для RFLP-анализа было отобрано 13 штаммов ризосферных бактерий. На основании полученных данных общее количество штаммов было разделено на 2 группы (А, В), в каждую из которых входят генетически сходные штаммы. В группу А вошли штаммы 1.1RP, 1.2RP, 2.1RP, 4.1RP, в группу В – 3.5RP, 4.3RP. А также была выделена группа Unique, которую составили 7 уникальных штаммов (2.4RP, 2.5RP, 2.6RP, 2.7RP, 3.1RP, 4.2RP, 4.4RP)¹.

Результаты секвенирования позволили определить видовую принадлежность выделенных штаммов, одни из которых относятся к классу *Bacilli* (уникальные штаммы 4.2RP, 2.5RP и штаммы группы А) и 1 штамм – к классу *Actinobacteria*, семейство *Micrococcaceae* (3.1RP). Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Определение видовой принадлежности выделенных штаммов ризосферных бактерий

Штамм	Вид	Схожесть, %
Группа А (1.1RP, 1.2RP, 2.1RP, 4.1RP)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100
	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	100
Группа Unique (4.2RP)	<i>Bacillus cereus</i>	99
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
Группа Unique (3.1RP)	Домен <i>Bacteria</i> Тип " <i>Actinobacteria</i> " Класс <i>Actinobacteria</i> Подкласс <i>Actinobacteridae</i> Порядок <i>Actinomycetales</i> Подотряд <i>Micrococcineae</i> Семейство <i>Micrococcaceae</i>	97
Группа Unique (2.5RP)	Домен <i>Bacteria</i> Тип <i>Firmicutes</i> Класс <i>Bacilli</i> Порядок <i>Bacillales</i> Семейство <i>Paenibacillaceae</i> Род <i>Brevibacillus</i>	97

Штаммы ризосферных бактерий проростков семян сосны обыкновенной проверены на способность подавлять *in vitro* рост фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum* Schwabe и *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 35108 (возбудители корневой гнили и фузариозов злаковых и лесных культур), взятые из рабочей коллекции лаборатории технологии микробных препаратов ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии.

¹ Обозначение: R (rhizosphere) – ризосферный штамм; P (pine) – сосна.

В результате оценки фунгицидной активности выделенных ризосферных микроорганизмов показано, что штаммы 2.5RP, 3.1RP, 2.7RP не проявляют активности в отношении фитопатогенов рода *Fusarium*. Штаммы ризосферных микроорганизмов, ингибирующие рост патогенных грибов (1.2RP, 2.6RP, 2.4RP, 4.4RP, 3.5RP), которые вовлечены в дальнейшие исследования, направленные на разработку высокоэффективных биопрепаратов для лесного хозяйства.

Выделенные штаммы ризосферных бактерий также проверены на способность стимулировать рост редиса (*Raphanus sativus* L.) сорта «Ранний красный». После обработки семян бактериальными суспензиями и инкубирования в течение 2 дней у каждого проростка замерена длина корня и побега (рис. 3).



Рис. 3 – Измерение длины корня редиса, инокулированного суспензией ризосферных бактерий

Достоверность различия с контролем проверена с помощью программы Statistica v5.5. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты оценки ростостимулирующей активности выделенных штаммов бактерий на рост редиса сорта «Ранний красный»

Вариант	Штамм	Средняя длина корня, см	Средняя длина побега, см
1	1.2RP	3,72±0,26	1,80±0,07
	2.6RP	4,22±0,34	1,74±0,09
	3.1RP	3,92±0,26	1,82±0,08
	3.5RP	5,70±0,34 (p=0,024)	1,84±0,08
	Контроль 1	4,69±0,36	1,97±0,06
2	4.2RP	3,60±0,25	1,47±0,07
	2.5RP	3,06±0,26	1,60±0,06
	2.4RP	5,02±0,28	1,82±0,07
	2.7RP	5,40±0,35	1,74±0,06
	4.4RP	5,53±0,42	1,91±0,08
	Контроль 2	5,00±0,42	1,91±0,08

Примечание. p – вероятность. Достоверно значимыми различия считаются при p < 0,05.

Однофакторный дисперсионный анализ полученных данных показал, что ризосферный штамм 3.5RP достоверно значимо (p = 0,024) стимулирует рост корня редиса. Также следует отметить штаммы (2.7RP, 4.4RP), имеющие тенденцию к стимуляции роста корня, и штаммы

(1.2RP, 4.2RP, 2.5RP), которые наоборот угнетают его рост. Достоверно установлено, что ни один из исследованных штаммов не влияет на рост побега редиса.

Выводы

1. В настоящей работе была изучена ризосфера сосны обыкновенной, из которой было выделено 18 бактериальных штаммов. Средняя численность ризосферных бактерий сосны обыкновенной составила $6,6 \times 10^6$ КОЕ в расчете на одно растение.
2. Рестрикционный анализ гена 16S рПНК изученных бактерий выявил группы идентичных RFLP-профилей и позволил разделить их на 3 обособленные группы. Последующая молекулярно-генетическая идентификация с использованием программ BLAST и RDP выявила разнообразие в таксономическом положении изучаемых штаммов.
3. Исследование хозяйственно ценных свойств изучаемых микроорганизмов позволило выделить 2 перспективных штамма 3.5RP и 4.4RP, проявляющих как фунгицидную, так и ростостимулирующую активности. Данные штаммы будут включены в дальнейшую работу для создания высокоэффективных биопрепаратов для лесного хозяйства.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 - 2013 годы» (государственный контракт № 16.552.11.7089 от 12 июля 2012 г.) с использованием оборудования ЦКП «ЭБЭЭ» ФГБОУ ВПО «ПГТУ».

Литература

1. А.М. Боронин, Соросовский образовательный журнал, 10, 25 - 31 (1998).
2. А.И. Мелентьев, Аэробные спорообразующие бактерии *Vacillus Cohn.* в агроэкосистемах. Наука, Москва, 2007. 120 с.
3. И.А. Тихонович, Ю.В. Круглов, А.П. Кожемяков, Л.Н. Пароменская, А.А. Белымов, А.Ю. Борисов, Достижения науки и техники АПК, 10, 8 - 11 (2002).
4. Ф.М. Шакирова, А.Р. Сахабутдинова, Успехи современной биологии, 123, 6, 563 - 572 (2003).
5. Е.А. Цавкелова, С.Ю. Климова, Т.А. Чердынцева, А.И. Нетрусов, Прикл. биохимия и микробиология, 42, 2, 133 - 143 (2006).
6. Г.М. Салахова, Автореф. дис. канд. биол. наук, Уфа, 2007. 24с.
7. Р.М. Хайруллин, В.Д. Недорезков, И.Г. Мубинов, Р.Ш. Захарова, Вестник Оренбургского гос. ун-та, 3, 119 - 122 (2009).
8. J. Yang, J.W. Klopper, C-M. Ryu, Trends Plant Science, 14, 1, 1 - 8 (2009).
9. Y. Okon, J. Vanderleyden, ASM News, 63, 366 - 370 (1997).
10. С.Ю. Веселов, Т.Н. Архипова, А.И. Мелентьев, Прикл. биохимия и микробиология, 34, 175 - 179 (1998).
11. А.И. Мелентьев, Л.Ю. Кузьмина, М.Ф. Галимзянова, Микробиология, 69, 426 - 432 (2000).
12. Б. Глик, Дж. Пастернак, Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Мир, Москва, 2002. 317 с.

13. В.В. Смирнов, Е.А. Киррианова, Бактерии рода *Pseudomonas*. Наук. Думка, Киев, 1990. 264 с.
14. Е.И. Кацы, Молекулярная генетика ассоциативного взаимодействия бактерий и растений. Наука, Москва, 2007. 86 с.
15. И.Г. Мубинов, Р.М. Хайруллин, Мат-лы междунар. симпозиума «Сигнальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете». Казань, 2006. С. 93 - 94.
16. Н.А. Карпушенко, О.М. Минаева, Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии, 1, (2004).
17. А.А. Халилова, А.В. Яковлева, А.С. Сироткин, Вестник Казанского технологического университета, 10, 392 - 401 (2010).
18. Е.С. Бальмова, Ф.Ю. Ахмадуллина, Р.К. Закиров, Вестник Казанского технологического университета, 11, 339 - 348 (2010).
19. Б.П. Струнин, Л.Ф. Саттарова, П.А. Гуревич, Вестник Казанского технологического университета, 4, 22 - 35 (2008).
20. З. А. Канарская, А. В. Канарский, Д. А. Дулькин, Э. И. Семенов, В. К. Чеботарь, А. В. Щербаков, Вестник Казанского технологического университета, 14, 186 - 190 (2012).
21. S. Y. Lee, S. Rasheed, Biotechniques, 9, 6, 676 - 679 (1990).
22. Е. Е. Андронов, А. Г. Пинаев, Е. В. Першина, Е. П. Чижевская. Выделение ДНК из образцов почвы. Санкт-Петербург. - 2011.
23. Е. В. Коростик, А. Г. Пинаев, Г. А. Ахметова, Е. Е. Андронов, Экологическая генетика, 4, 4, 32 - 37 (2006).
24. J. Magnusson, J. Schnurer, Applied and Environmental Microbiology, 67, 1, 1 - 5 (2001).

© С. Н. Масленникова – магистрант ПГТУ, snmaslennikova@gmail.com; А. И. Шургин – канд. с/х наук, доц. ПГТУ, зам. дир. ЦКП ЭБЭЭ, ashurgin@pochta.ru; В. К. Чеботарь – канд. биол. наук, зав. лаб. технологии микробных препаратов ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии, bisolbi-inter@rambler.ru; А. В. Щербаков – инженер-микробиолог той же лаборатории, avsherbakov@bisolbi.ru; А. В. Канарский – д-р техн. наук, проф. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ, alb46@mail.ru.