

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МИКРОБНО-РАСТИТЕЛЬНОГО СИМБИОЗА ПУТЕМ СОЗДАНИЯ КОМПОЗИЦИОННЫХ БИОПРЕПАРАТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ БИОГЕННЫХ МЕТАЛЛОВ

Е.Н. ГОНЧАР, аспирант, Национальный Университет Биоресурсов и Природопользования Украины, Киев, Украина

А.В. ЩЕРБАКОВ, младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург – Пушкин, Россия

К.Г. ЛОПАТЬКО, кандидат технических наук, доцент, зав. кафедрой конструкционных материалов и материаловедения, Национальный Университет Биоресурсов и Природопользования Украины, Киев, Украина

Л.Н. ГОНЧАР, кандидат сельскохозяйственных наук, старший преподаватель кафедры растениеводства, Национальный Университет Биоресурсов и Природопользования Украины, Киев, Украина

В.К. ЧЕБОТАРЬ, кандидат биологических наук, зав. лабораторией, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург – Пушкин, Россия

С.М. КАЛЕНСКАЯ, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, член. кор. НАН Украины, зав. кафедрой растениеводства, Национальный Университет Биоресурсов и Природопользования Украины, Киев, Украина

1- Национальный Университет Биоресурсов и Природопользования Украины, Киев, Украина

Резюме. *Впервые будет разработана технология, сочетающая в себе бактериальный компонент, который оптимизирует рост и развитие растений за счет прямой стимуляции, усиления эффективности корневого питания, и комплекс биологически активных наночастиц металлов, обеспечивающий растительно-микробную систему микроэлементами.*

Ключевые слова: наночастицы, микроэлементы, биопрепараты.

К настоящему времени существует научно-обоснованная необходимость обеспечить современное земледелие высокоэффективными микробными препаратами для обработки не менее 20 млн. га посевных площадей в РФ и 27,6 млн. га в Украине. [1; 2; 3]. Ассоциации растений с полезными микроорганизмами привлекают внимание ученых с точки зрения не только изучения фундаментальных основ взаимодействия различных организмов, но и возможного использования данных взаимодействий в практике экологически ориентированного адаптивного растениеводства.

Современное высокоэффективное сельскохозяйственное производство невозможно без применения удобрений и средств защиты растений. Так, широкое использование минеральных удобрений, в первую очередь азотных, позволило за последние 50 лет более чем в 5 раз поднять урожайность основных сельскохозяйственных культур в развитых странах. Однако процесс получения и применения минеральных удобрений является наиболее энергоемким - на него расходуется от 30 до 50% всей энергии, потребляемой в сельскохозяйственном производстве. Применение минеральных удобрений оказывает негативное влияние на здоровье человека, биоразнообразие, выброс парниковых газов, плодородие почв и только в Европе требует компенсационных затрат от 70 до 320 млрд. евро ежегодно [4].

Адаптационный потенциал основных сельскохозяйственных культур может быть значительно расширен за счёт использования препаратов на основе наночастиц (НЧ), которые являются водными дисперсиями биогенных металлов. В настоящее время применение и исследования различных наноматериалов стало ноу-хау многих отраслей промышленности. Однако, несмотря на более чем полувековую историю получения наночастиц, недостаточно изучено много вопросов касающихся механизмов их действия на биологических объектах. Основными причинами подобной ситуации является недостаточное количество проводимых исследований физико-биологических свойств и структуры подобных систем, полученных разными способами, что в корне определяет характеристики функциональности их действия. Сложность использования НЧ для биологических объектов состоит зачастую в выборе препаративной формы, которая способна включаться в метаболизм. Имея свои преимущества и недостатки, на сегодняшний день ни один из способов получения НЧ не может быть выделен как универсальный, особенно учитывая применение в области биотехнологии. Среди существующих методов и способов получения наноматериалов выделяют метод объемного электроискрового диспергирования металлов (ОЕИДМ) в жидкости как одного из наиболее эффективных методов получения частиц с размерами 1-100 нм [5]. Технологии, основанные на этом методе, имеют преимущества перед другими (взрыв проводников, испарения-конденсации, механическое, химическое, электронно-лучевая и газотермическое диспергирования материалов). Физико-химические методы исследования, количественный и качественный анализы полученных водных дисперсий и самих частиц дают представление об их структуре и свойствах. Размеры, форма и структурно-фазовый состав во многом определяет биофункциональность и токсичность дисперсных материалов. Отрицательный заряд на поверхности раздела твердой и жидкой фаз, формируется за счет адсорбции атомов кислорода и гидроксильной группы. Размер ζ - потенциала составляет около 50 mV, что является достаточным для обеспечения агрегативной устойчивости системы и проведения дальнейших биологических исследований [6].

Предложенный метод получения НЧ позволил получить препараты с уникальными свойствами, которые имеют ряд преимуществ перед аналогичными препаратами, полученными другими способами. Эффективность препаратов НЧ металлов (ПНМ) обусловлена не только размерным фактором, но и более интенсивным взаимодействием частиц с окружающей средой и катионов соответствующих металлов, что схематически показано (Рис.1).

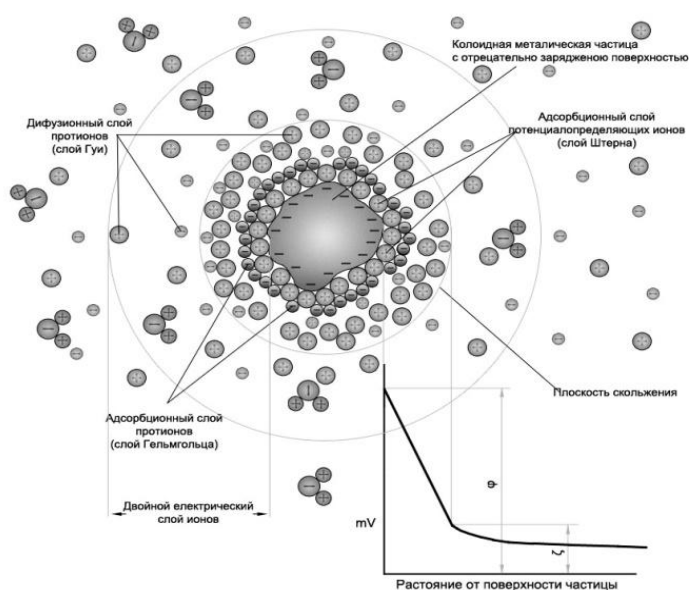


Рис.1. Структура мицеллы искроэрозионных частицы

Известно, что катионная форма является более приемлемой для использования в биологических средах, чем ионная, это является одним из главных отличий от препаратов этого же ряда, полученных другими способами.

В растениеводстве применение НЧ, в качестве микроудобрений, обеспечивает повышение устойчивости к неблагоприятным климатическим условиям и увеличение урожайности почти всех

продовольственных и технических культур [5; 6]. Нанопрепараты имеют ряд преимуществ по сравнению с традиционными веществами: не расслаиваются под

воздействием тепла и света, приготовленный рабочий раствор может храниться и сохранять свою активность годами. Однако одно из главных свойств, что НЧ обеспечивают полное смачивание поверхности растения, полностью всасываются растениями и не смываются дождем. В отличие от микроэлементов в солевой форме, НЧ биологически активных металлов менее токсичны и имеют пролонгированное действие [7].

Цель данной работы – повысить эффективность растительно-микробных систем на основе ризосферных и клубеньковых бактерий путем совмещения с нанорастворами биогенных металлов.

Условия, материалы и методы.

Основной концепцией, определяющей постановку экспериментальной и теоретической части было установление влияния микроэлементов (в форме наноразмерных частиц биогенных металлов) на растительно-бактериальные системы с последующим объяснением предполагаемых механизмов действия и возможности использования их в сельскохозяйственном производстве.

Работа осуществлялась на базе Центра коллективного пользования ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии и Национального Университета Биоресурсов и Природопользования Украины. Были использованы высокоэффективные штаммы ассоциативных и симбиотических микроорганизмов-продуцентов, которые совмещались с различными композициями наночастиц биогенных металлов. Исследовали действие нанорастворов семи металлов (Ag, Mg, Fe, Zn, Mo, Mn, Al) на рост, развитие и хозяйственно-ценные свойства культур бактерий: *B. subtilis* Ч13 (продуцент препарата Экстрасол), *M. ciceri* Н-12 (продуцент препарата Ризобифит), *Mezorizobium cicer* St-208 (выделенный с клубеньков нута).

Скорость роста и морфологию колоний оценивали на твердой среде ГМФ, в которую были добавлены нанорастворы указанных металлов в конечных разведениях 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. Жидкую культуру *B. subtilis* Ч13 методом последовательных серийных разведений высевали на поверхность среды, чашки с посевами инкубировали 48 ч при температуре 28°C, после двух суток роста культуры измеряли диаметр, морфологию колоний и их количество. Оценивали скорость роста культуры.

Влияние нанорастворов биогенных металлов на рост продуцента биопрепарата в жидкой культуре проводили на среде LB, в которую были добавлены нанорастворы указанных металлов в конечных разведениях 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. Культуру объемом 1 мл засеивали в качалочные колбы с 200 мл питательной среды и инкубировали 24 ч при 28°C и 200 об/мин. По истечению срока инкубации определяли оптическую плотность культуры и ее титр методом последовательных серийных разведений и посевом на среду ГМФ.

Совместное действие нанорастворов металлов и культуры *B. subtilis* Ч13 оценивали *in vitro* на проростках кресс-салата по следующей схеме: 1. – контроль (стер. вода); 2. – культура *B. subtilis* Ч13; 3. – металл 1:1000; 4. – металл 1:10000; 5. – культура *B. subtilis* Ч13 + металл 1:1000; 6. – культура *B. subtilis* Ч13 + металл 1:10000. Семена кресс-салата замачивали на 30 мин в указанных растворах и выкладывали в стерильные влажные камеры по 20 семян в 3-х повторностях. Проростки выращивали 96 ч в фитотроне, затем измеряли длину корешка и общую сырую массу проростка.

Определение цитохромоксидазы проводили по Эрлиху с помощью «набора реактива для определения цитохромоксидазы по Эрлиху». Результат реакции оценивали спектрофотометрическим методом.

Исследование влияния культивирования микроорганизмов на среде с добавлением разных концентраций нанораствора Mo штаммами клубеньковых бактерий нута *Mezorizobium cicer* ST282 и *M. ciceri* Н-12 оценивали на жидкой среде МДА, в которую были добавлены нанорастворы Mo в конечных разведениях 1:100, 1:1000, 1:10000.

Для определения влияния нанораствора Mo на способность синтезировать ауксины (ИУК) исследуемые изоляты бактерий культивировали 5 суток стационарно при

температуре 28°C на жидкой среде R2A с добавлением 2 mM L-триптофана. Затем 1 мл культуры вносили в микроцентрифужные пробирки и центрифугировали 2 мин на 14000 об/мин. 0,5 мл супернатанта вносили в чистые пробирки, затем добавляли 0,5 мл реактива Сальковского (Salkowski, 1885; Gordon и Weber, 1951). Пробирки инкубировали 10 мин при комнатной температуре, по интенсивности изменения окраски жидкости от бледно-розового до насыщенно-малинового судили об уровне продукции ИУК и ее производных исследуемыми изолятами бактерий. Для проведения хроматографического анализа в полученных экстрактах проводили с помощью системы ультрапроизводительной жидкостной хроматографии (УПЖХ, UPLC) Waters ACQUITY UPLC H-class с флуоресцентным детектором.

Полевые опыты были заложены в 2013 году на базе опытного поля ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии и в стационарном опыте кафедры растениеводства, агрономической опытной станции Национального Университета Биоресурсов и Природопользования Украины. Размещение участков – рандомизированное, сорт нута – Краснокутский.

Данные статистически обрабатывали с помощью программы Diana (ГНУ ВНИИСХМ, С.Петербург).

Результаты и обсуждение.

Из 7-и исследованных нанорастворов биогенных металлов пять оказали наиболее выраженное влияние на скорость роста колоний исследуемого штамма *Bacillus subtilis* Ч13 после 24 ч инкубирования. Четыре металла оказали стимулирующее действие на развитие культуры (серебро и железо в разведении 1:1000 и 1:10000, молибден в разведении 1:100, медь в разведении 1:100, 1:1000), при этом наблюдалось выраженное разрастание колоний, изменение морфологии, диаметр колоний увеличивался в несколько раз по сравнению с контрольным вариантом. Нанорастворы цинка оказали выраженное угнетающее действие на развитие культуры, при этом угнетающий эффект наблюдался при уменьшении концентрации (вплоть до разбавления 1:10000) и проявлялся как в уменьшении диаметра колоний, так и их численности.

Дальнейшие исследования проводили с четырьмя нанорастворами металлов, оказавшими более выраженное стимулирующее действие: Ag, Fe, Mo, Cu. Повторный опыт с нанорастворами указанных металлов проводили аналогично первому, результаты были получены после 48 ч культивирования (рис. 2).

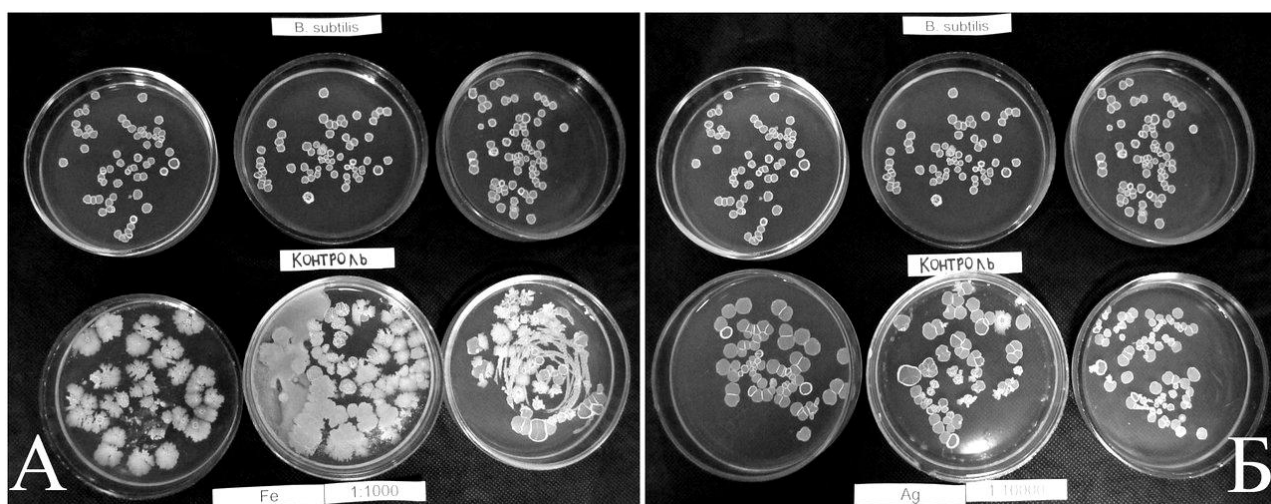


Рис. 2. Действие нанораствора железа (А) и серебра (Б) на скорость роста и культуральные свойства культуры *B. subtilis* Ч13

Отмечено, что в образцах с нанорастворами металлов за период проведения эксперимента показатель оптической плотности повысился на 0,1 отн. ед., титр культуры – в среднем на 0,36 млрд. КОЕ/мл. Разница между данными, полученными от опытных

вариантов и контрольного, статистически достоверна на уровне НСР05. Учитывая изменения количества микробных единиц и сопоставляя их с данными определения титра по показателю оптической плотности, можно сделать вывод, что использование нанорастворов металлов оказывает благоприятный эффект и обеспечивает увеличение количества живых клеток *B. subtilis* Ч13. Наиболее высокий титр наблюдался у вариантов с добавлением Fe, Cu, Ag – в концентрации 1:1000, а добавление Cu в концентрации 1:100 и Fe в концентрации 1:10000 приводило к небольшому уменьшению живых клеток *B. subtilis* Ч13, но это уменьшение незначительное и находится в пределах погрешности (Табл.1).

Таблица. 1. Оптическая плотность (разведение 1:1) и титр культуры *B. subtilis* Ч13 при культивировании на жидкой среде с добавлением нанорастворов металлов.

Вариант	Оптическая плотность, отн. ед.	Титр культуры, млрд. КОЕ/мл
Контроль	0,81	1.07
Ag 1:1000	0,88	1.48
Ag 1:10000	0,94	1.45
Fe 1:1000	0,94	2.18
Fe 1:10000	0,87	0.83
Cu 1:100	0,88	0.96
Cu 1:1000	0,86	1.85

Исследование ростостимулирующей активности на проростках кресс-салата выявило стимулирующий эффект культуры *B. subtilis* Ч13 и нанорастворов серебра в разведении 1:1000 и 1:10000, при этом максимальный эффект наблюдался в варианте с совместным применением обоих компонентов (рис.3).

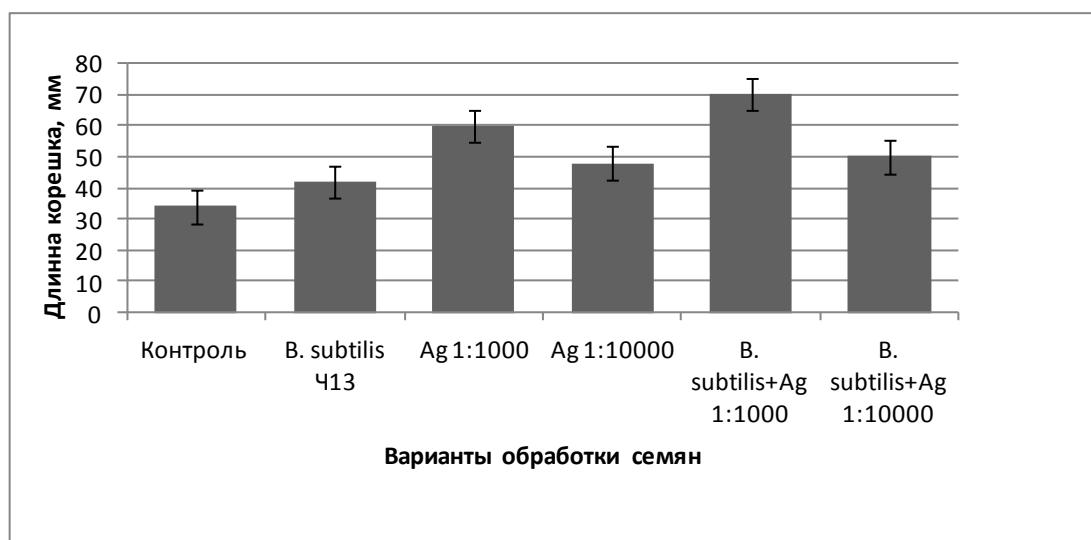


Рис. 3. Ростостимулирующая активность культуры *B. subtilis* Ч13 и нанорастворов серебра на проростках кресс-салата (по длине корешков в мм).

Культура *B. subtilis* Ч13 обеспечила стимуляцию проростков кресс-салата на уровне 23,5%, нанораствор серебра в разведении 1:1000 (отдельно) – 76,4%, максимальный эффект наблюдался при совместной обработке нанораствором серебра и культурой *B. subtilis* Ч13 – 105%.

Для объяснения стимулирующего влияния нанорастворов металлов на морфолого-культуральные свойства *B. subtilis* Ч13 было сделано предположение, что наночастицы металлов способны влиять на окислительно-восстановительные процессы бактерий. Проведенные исследования показывают, что добавление нанорастворов металлов железа и меди в питательную среду стимулируют выработку внутриклеточной цитохромоксидазы *B. subtilis*; возможно, что данные металлы включаются в метаболическую сеть бактерий в составе медных комплексов и гемов цитохромоксидазы, активируя, таким образом, дыхательный метаболизм бактерий. В свою очередь, можно предположить, что данные металлы способствуют интенсификации дыхания бактериальной клетки, а соответственно и усиленному делению и увеличению титра культуры.

Второй частью исследований стало изучение влияния нанораствора Мо на симбиотрофные азотфиксаторы. Известно, что молибден входит в состав ключевого для азотфиксации ферментного комплекса – нитрогеназы, наряду с этим он обнаружен в ксантиндегидрогеназе. Оптимальным количеством, для эффективной симбиотической деятельности бобовых, следует считать содержание Мо в почве на уровне 1,0 - 0,5 мг/кг почвы (Посыпанов и др., 1997). Однако, среди составляющих, которые влияют на рост и развитие растений, кроме активного связывания азота атмосферы выделяют способность бактерий к синтезу веществ гормональной природы [10, 11]. Синтез фитогормонов считается одним из главных свойств ризосферных, эпифитных и симбиотических микроорганизмов [12, 11, 13]. Ассоциированные с растениями бактерии, которые находятся в ризосфере, стимулируют рост растений за счет секреции в ризосферу веществ ауксиновой природы, в частности, индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) [10, 13].

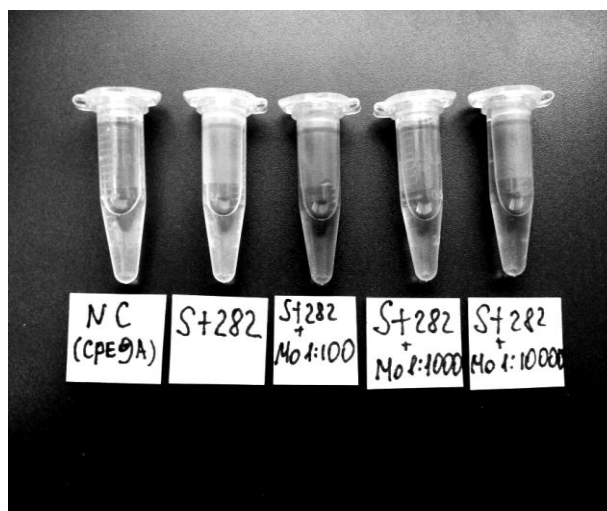
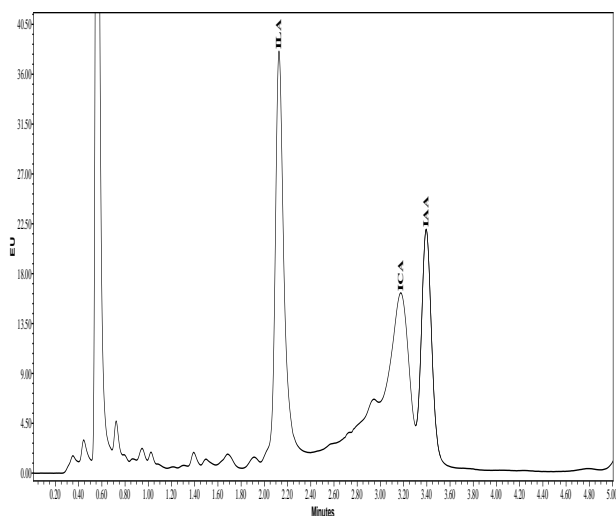


Рис. 5. Усиление синтеза ИУК при выращивании *Mezorizobium cicer* ST282 на среде с L-триптофаном и нанораствором Мо: А - реакция с реактивом Сальковского (NC-негативный контроль - питательная среда МДА с L-триптофаном); Б - Хроматографический анализ ауксинов в культуральной жидкости штамма ST282 (IA – Индолил-3-молочная кислота (ИМК), ICA – Индолил-3-карбоновая кислота (ИКК), IAA – Индолил-3-уксусная кислота (ИУК)). EU – интенсивность флуоресценции (единицы эмиссии – Emission Units). Объем анализируемого образца 3 мкл.

Участие эндогенных фитогормонов в процессах инфицирования бобовых растений клубеньковыми бактериями, формировании и функционировании симбиотических систем не вызывает сомнения. Как показывают результаты исследований, нанораствор Мо способствует повышению выработки ИУК бактериальными штаммами клубеньковых бактерий. Для подтверждения принадлежности выделенных фитогормонов к индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) был проведен хроматографический анализ ауксинов в культуральной жидкости, согласно которому в культуральной жидкости обнаружено присутствие к индолил-3-уксусной кислоты, а также двух ее производных - индолил-3-

молочной и индолил-3-карбоновой кислот. Таким образом, результаты представленных исследований позволяют сделать вывод о прямой связи между добавлением нанораствора Mo в среду с клубеньковыми бактериями, и их способностью синтезировать ИУК *in vitro* на среде с L-триптофаном. Возможно, речь идет о перспективности использования показателей биосинтеза фитогормонов, в частности ИУК, бактериями в чистой культуре в повышении эффективности штаммов ризобий и создания на их основе бактериальных препаратов комплексного действия.

Эффективность новых растительно-бактериальных систем оценивалась в полевых опытах РФ и Украины. Влияние нанораствора Mo на рост и развитие растений нута изучали в вегетационном и полевом опыте, измеряя ростовые показатели растений нута и общую сырую биомассу растений (рис 4., табл. 2).

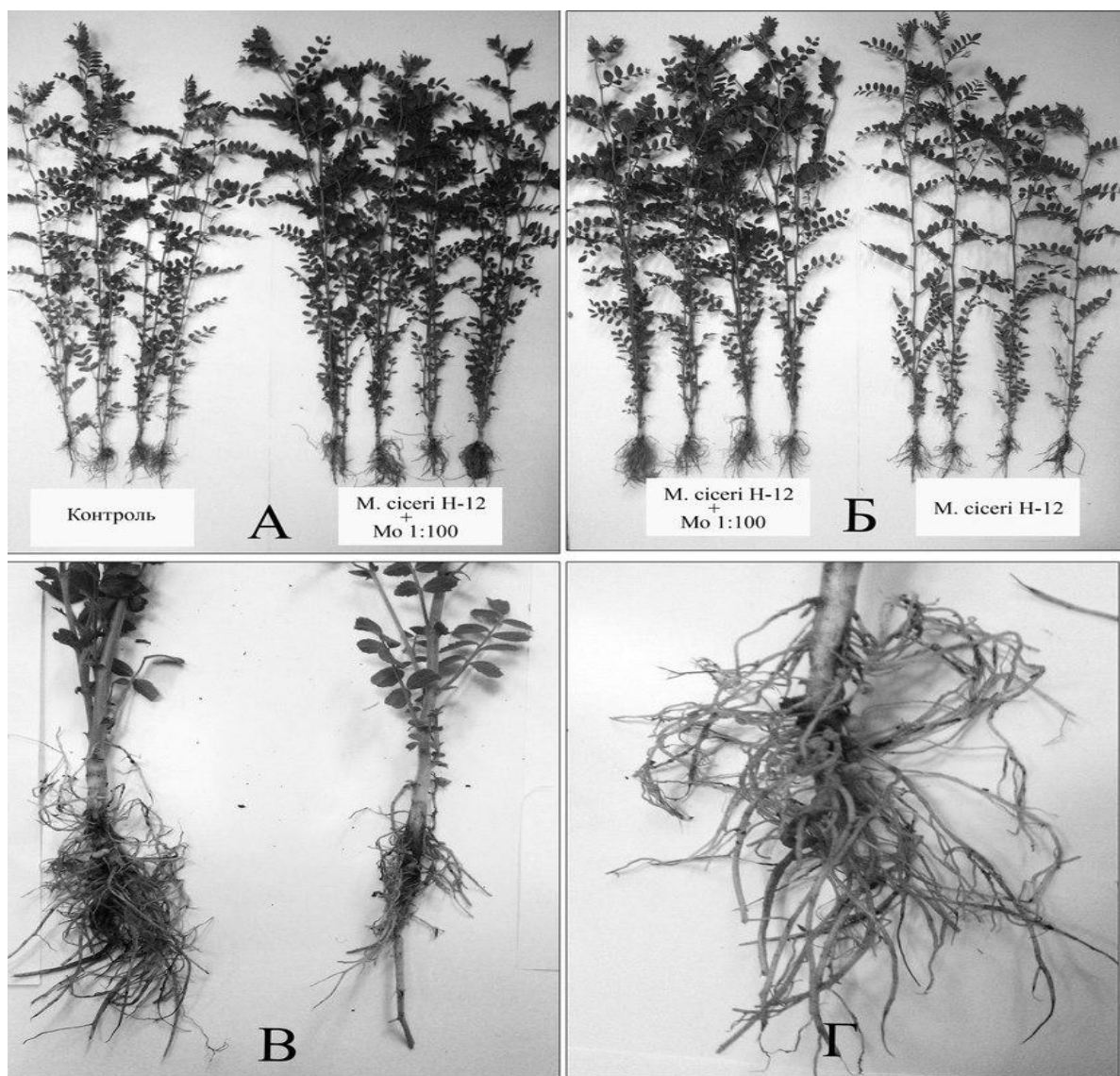


Рис. 4. Растения нута в зависимости от варианта обработки нанораствором Mo и клубеньковыми бактериями, вегетационный опыт: А. – Варианты: без обработки и обработка культурой клубеньковых бактерий и нанораствором молибдена; Б. – Варианты: обработка комплексным биопрепаратом с нанораствором молибдена и контрольным биопрепаратом; В. – Корневая система нута при обработке нанораствором молибдена и без него; Г. – формирование клубеньков на корнях нута при обработке композиционным биопрепаратом.

Таблица 2. Биометрические показатели и урожайность нута в зависимости от вариантов обработки нанорастворами молибдена и клубеньковыми бактериями.

Вариант	РФ					Украина				
	Средний вес одного растения, гр.	Вес надземной части, гр.	Вес подземной части, гр.	Урожайность, т/га.	Среднее количество клубеньков на одном растении	Средний вес одного растения, гр.	Вес надземной части, гр.	Вес подземной части, гр.	Урожайность, т/га.	Среднее количество клубеньков на одном растении
Контроль	10,3	7,3	0,6	0,65	4,2	11,8	7,9	3,9	0,78	5,1
<i>M. ciceri</i> Н-12	9,4	7,2	0,6	0,80	7,1	12,5	8,3	4,2	0,88	8,0
<i>M. ciceri</i> ST282	13,6	10,1	0,8	0,83	8,0	13,4	12,1	3,3	0,89	9,3
Mo 1:10	11,7	7,3	0,5	0,85	0	11,5	8,3	3,2	0,80	0
Mo 1:100	10,5	8,3	0,9	0,89	0	12,6	10,2	2,4	1,09	0
<i>M. ciceri</i> Н-12 + Mo 1:10	9,6	6,3	0,5	1,06	6,5	14,7	8,5	2,4	1,26	8,0
<i>M. ciceri</i> ST282 + Mo 1:10	9,18	6,3	0,5	1,08	5,6	11,9	8,4	3,5	1,18	9,2
<i>M. ciceri</i> Н-12 + Mo 1:100	22,4	13,8	1,1	1,24	14,2	25,8	15,8	10	1,68	17,1
<i>M. ciceri</i> ST282 + Mo 1:100	15,3	12,6	0,8	1,15	16,2	22,3	14,5	7,8	1,56	22,4
НСП _{0.05}	1,6	1,2	0,3	0,9	2,3	1,5	1,4	1,0	1,2	4,2

Установлено, что у растений, инокулированных комплексными биопрепаратами с добавлением наночастиц, обнаружены достоверно высокие отличия с контролем по признакам: высота растения, количество клубеньков, длина корня, надземная и подземная масса растения. Проведенные исследования показали эффективность применения новых композиционных биопрепаратов, которые способны повысить адаптационный потенциал растительно-микробных систем, увеличить симбиотическую активность клубеньковых бактерий и, как результат, увеличить урожайность нута на 35-40%.

Выводы

Показана высокая эффективность растительно-бактериальных систем с применением НЧ, продуктивность которых оценена в лабораторных и вегетационных опытах в почвенно-климатических условиях Российской Федерации и Украины. В результате проведенных исследований впервые в России и Украине будут созданы композиционные биопрепараты на основе высокоэффективных штаммов ризосферных и эндофитных бактерий с включением микроэлементов в форме наноразмерных частиц биогенных металлов.

Литература

1. Берестецкий О.А., Васюк Л.Ф. Азотфиксирующая активность в ризосфере и на корнях небобовых растений // Известия АН СССР. Серия биологическая. -1983.-№6.-С. 41-44.
2. Тихонович И.А., Круглов Ю.В'. (отв. ред.) Биопрепараты- в сельском хозяйстве. (Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве). М.: Б.и., 2005 - 154 с.

3. Завалин А.А., Кожемяков А.П. (отв. ред.) Новые технологии производства и применения биопрепаратов комплексного действия. — СПб.: ХИМИЗДАТ, 2010. 64 с.
4. Sutton, M. A., Howard, C., Erisman, J. W., Billen, G., Bleeker, A., Grennfelt, P., van Grinsven H., and Grizzetti, B.: The European Nitrogen Assessment, Cambridge University Press, 612 pp., 2011a.
5. Лопатько К., Афтандиянц Е.Г., Тонха А.Л., Каленская С.М.; / Пат. 38459 Украины на полезную модель. Маточный коллоидный раствор металлов / - заявитель и Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. - Зарегистр. в Гос. реестре патентов Украины 12.01.2009. Получено 16.10.2009.
6. Каленская С.М., Новицкая Н.В., Гончар Л.М., Лопатько К.Г., Ситар О.В. /Научное обоснование применения наноразмерных биогенных металлов в системе удобрений полевых культур // Научно-практические рекомендации. Киев: 2012. – 65 с.
7. Ишлер С.Ю., Новицкая Н.В. Наноперспективы Украины [Электронный ресурс]: Материалы международной научно-практической Интернет-конференции «Современные направления теоретических и прикладных исследований '2011» с 15 по 28 марта 2011 г. - Режим доступа: www.sworld.com.ua/
8. Чеботарь В.К., Завалин А.А., Кипрушкина Е.И. Эффективность применения биопрепарата экстрасол. М.: ВНИИА, 2007, 216 С.
9. Chebotar' V.K., Makarova N.M., Shaposhnikov A.I., Kravchenko L.V. Antifungal and Phytostimulating Characteristics of *Bacillus subtilis* Ch-13 Rhizospheric Strain, Producer of Biopreparations. Applied Biochemistry and Microbiology, 2009, Vol. 45, No. 4, pp. 419–423.
10. Волкогон В.В., Сальник В.П. Значення регуляторів росту рослин у формуванні активних азотфіксувальних симбіозів та асоціацій // Там само. — 2005. — 37, № 3. — С. 187.
11. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы-продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикл. био-химия и микробиология. — 2006. — 42, № 2. — С. 133—143.
12. Моргун В.В., Коць С.Я., Кириченко Е.В. Ростстимулирующие ризобактерии и их практическое применение // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — 41, № 3. — С. 187—207.
13. Plant Hormones — Biosynthesis, Signal Transduction, Action! — Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ., 2004. — 750 p.