

КОРНЕВЫЕ ЭКССУДАТЫ ТОМАТА ПРИ ИНТРОДУКЦИИ В ПОЧВУ РИЗОБАКТЕРИЙ ПРОДУЦЕНТОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Л.В. Кравченко, Н.М. Макарова, А.И. Шапошников, В.К. Чеботарь

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин

Исследовано влияние инокуляции томатов промышленными штаммами *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas chlororaphis* на интенсивность выделения корнями органических кислот и сахаров. Проведен расчет изменения энергетической обеспеченности ризосферной зоны при росте растений и бактерий в модельном биоценозе. Из приведенных расчетов показано, что корневая экссудация при инокуляции томатов штаммами *B. subtilis* возрастала в 1.4 раза, а при инокуляции *P. chlororaphis* – в 8.7 раз. Несмотря на повышенное выделение органических соединений из корней, сухая масса растений при инокуляции томатов увеличивалась 1.1-1.2 раза.

Ключевые слова: корневые экссудаты, ризобактерии, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, биопрепараты

Корневые экссудаты представлены широким спектром органических молекул, относящихся к различным классам химических соединений и обладающих разнообразными физиологическими свойствами [1, 2]. Ризосфера является экологической нишей для рост-стимулирующих ризобактерий (РСРБ), в которой за счет корневых экссудатов трофический и сигнальный потенциал очень высок [3]. Штаммы РСРБ, обитающие в ризосфере, играют важную роль в адаптации растений к влиянию окружающей среды. Интродукция высокоактивных ризобактерий – продуцентов микробиологических препаратов в почву приводит к их эффективному взаимодействию с растениями, при этом образуются дополнительные защитные биопленки или антибиотики с антифунгальными свойствами.[4,6].

Изучение воздействия микроорганизмов, входящих в состав биопрепаратов, на корневую экссудацию расширяет понимание общих аспектов энергетического обеспечения ризосферы и характера растительно-микробных взаимодействий. Однако работы по определению влияния микроорганизмов, входящих в состав современных биопрепаратов, на количество органического вещества корневых экзометаболических овощных культур до сих пор не проводились.

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния инокуляции РСРБ *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas chlororaphis* на интенсивность выделений основных трофических компонентов корневых экзометаболических томата – органических кислот и сахаров и расчете количества питательного субстрата в ризосфере.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты. В работе изучали промышленные штаммы: *B. subtilis* Ч-13 и *P. chlororaphis* SPB1217, входящих в состав почвоудобрительных биопрепаратов [3, 4, 6]. Штаммы обладали высокой антифунгальной активностью, ингибировали прорастание спор и рост мицелия широкого спектра фитопатогенных грибов. В исследовании использовали фитопатогенный гриб *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl). В качестве растительного тест-объекта был выбран томат *Lycopersicon esculentum* сорта Кармелло.

Методы. Для получения корневых выделений семена томата стерилизовали в течение 3 мин 5%-ным раствором гипохлорита натрия, с последующей многократной промывкой стерильной водой. Корневую экссудацию изучали в гнотобиотическом биоценозе. Система состояла из 5 сосудов объемом 800 мл, заполненных 100 мл стерильных стек-

лянных шариков диаметром 2 мм. В каждый сосуд высаживали по 30 семян и добавляли по 35 мл разбавленного в 10 раз питательного раствора PNS следующего состава (мМ): KNO_3 – 5.0, $Ca(NO_3)_2$ – 2.0, $MgSO_4$ – 1.0, KH_2PO_4 – 1.0 с микроэлементами и доведенным до pH 6.8. В вариантах с инокуляцией семян использовали клеточную суспензию, которую готовили из 40-часовой культуры *B. subtilis* и 18-часовой *P. chlororaphis*. Бактерии выращивали на жидкой среде LC следующего состава (г/л): NaCl – 8.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2.5, глюкозы – 5.0, триптона – 10.0, дрожжевого экстракта – 5.0, pH 6.8, микроэлементы (мг/л): Fe-ЭДТА – 20; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1.7; $B_4Na_2O_7 \cdot 7H_2O$ – 3.5; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0.3; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0.1 на качалке (220 об/мин) при 28°C. Клетки бактерий отделяли центрифугированием и для удаления остатков питательной среды промывали раствором PNS. Для инокуляции семян готовили раствор PNS с концентрацией клеток 10^5 КОЕ/мл и добавляли в стерильные сосуды, куда высаживали семена. Растения выращивали в течение 14 сут в световом боксе при температуре 19 – 23°C. Численность бактерий на корнях и в PNS определяли после окончания опыта высевом на агаризованную среду LC. Корневые экссудаты из сосудов смывали водой и для удаления бактериальных клеток, центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об/мин, после чего экссудаты концентрировали под вакуумом на роторном испарителе (Buchі Labortchnik AG, Швейцария) при 45°C.

Молекулярный состав органических кислот и сахаров определяли методом жидкостной хроматографии высокого давления (ЖХВД). Для анализов корневых экссудатов использовали ЖХВД систему JASCO LC-900 (Jasco International LTD, Япония). Органические кислоты разделяли на ионообменной хроматографической колонке SUPELCOGEL C-610H (Supelco Gland, Швейцария), 300 × 4.6 мм с размером частиц 10 мкм. В качестве подвижной фазы применяли раствор 10.0 мМ H_3PO_4 , длина волны ультрафиолетового детектора составляла 220 нм. Сахара разделяли на хроматографической колонке SUPELCOSIL LC-NH₂ (Supelco Gland, Швейцария) в качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил / вода (85 / 15 об./об.). Детектирование редуцирующих сахаров осуществляли методом послеклоночной реакции. Этот метод заключался в автоматической колориметрической реакции разделяемых сахаров. В качестве окрашивающего реактива использовали раствор 2,3,5-трифенил-тетразолий хлорид [2]. Поглощение окрашенного комплекса измеряли на УФ-детекторе JASCO UV-975 (Jasco, Япония) при длине волны 487 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 приведены результаты анализа выделения органических кислот корнями томата при интродукции в почву изучаемыми штаммами РСРБ.

Таблица 1. Изменение содержания органических кислот в корневых выделениях томатов при инокуляции антифунгальными штаммами *B. subtilis* Ч-13 и *P. chlororaphis* SPB1217

Кислота	Количество органических кислот					
	Стерильный контроль		<i>B. subtilis</i> Ч-13		<i>P. chlororaphis</i> SPB1217	
	мкг/растение	%*	мкг/растение	%	мкг/растение	%
Щавелевая	2.3 ± 0.4	4.3	1.1 ± 0.2	2.2	1.9 ± 0.3	2.04
Лимонная	42.3 ± 5.4	79.0	44.6 ± 6.3	89.9	85.8 ± 10.6	92.26
Аконитовая	0.02 ± 0.01	0.04	Н.д.	-	0.03 ± 0.01	0.03

Яблочная	0.76 ± 0.13	1.42	0.1 ± 0.1	0.2	0.28 ± 0.06	0.30
Янтарная	7.43 ± 1.1	13.89	3.7 ± 0.8	7.5	4.8 ± 1.3	5.17
Фумаровая	0.17 ± 0.05	0.32	0.09 ± 0.01	0.2	0.10 ± 0.04	0.11
Пироглутаминовая	0.55 ± 0.05	1.03	Н.д.**	-	0.08 ± 0.02	0.09

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 цифры – средние величины из четырех независимых опытов. Величина ошибок измерений представлена стандартным отклонением.

* Процент от суммарного количества органических кислот в корневых выделениях.

**Недетектируемый уровень содержания, ниже 0.01 мкг.

В корневых выделениях обнаружено 7 количественно определяемых органических кислот. В экссудатах доминирующими являлись лимонная и янтарная кислоты, также во всех пробах наблюдали следы (меньше 0.01 мкг) молочной, уксусной и пропионовой кислот. Содержание лимонной кислоты в зависимости от варианта опыта составляло 79.0 – 92.3% от суммарного количества выделившихся органических кислот. Количество лимонной кислоты при интродукции штамма Ч-13 равнялось значению в стерильном варианте, а при интродукции SPB1217 было в 2 раза выше. Суммарное количество органических кислот в корневых экссудатах существенно менялось и являлось минимальным при инокуляции *B. subtilis* и максимальным при инокуляции *P. chlororaphis*. В пересчете на одно растение экссудация органических кислот при интродукции штаммов Ч-13 и SPB1217 составляла соответственно 49.6 и 93.0 мкг/ растение.

Помимо органических кислот в корневых выделениях идентифицировано 5 сахаров, во всех пробах доминировали фруктоза и глюкоза (табл. 2).

Таблица 2. Изменение содержания сахаров в корневых выделениях томатов при инокуляции антифунгальными штаммами *B. subtilis* Ч-13 и *P. chlororaphis* SPB1217

Сахар	Количество сахаров					
	Стерильный контроль		<i>B. subtilis</i> Ч-13		<i>P. chlororaphis</i> SPB1217	
	мкг/растение	%	мкг/растение	%	мкг/растение	%
Рибоза	0.08 ± 0.02	3.04	0.12 ± 0.05	3.51	0.10 ± 0.03	3.47
Ксилоза	0.19 ± 0.04	7.22	Н.д.	-	0.25 ± 0.05	8.68
Фруктоза	1.42 ± 0.12	54.0	2.09 ± 0.31	61.11	1.69 ± 0.47	58.68
Глюкоза	0.75 ± 0.11	28.52	1.09 ± 0.13	31.87	0.84 ± 0.16	29.17
Мальтоза	0.19 ± 0.08	7.22	0.12 ± 0.06	3.51	Н.д.	-

Содержание фруктозы составляло 54.0 – 61.1%, а глюкозы – 28.5 – 31.9% от суммарного количества выделившихся сахаров. Суммарное количество фруктозы и глюкозы находилось в диапазоне 82.5– 93.0 % от содержания всех сахаров. Количество фруктозы и глюкозы было наибольшим при инокуляции *B. subtilis*, а наименьшим в стерильном варианте. Содержание сахаров в различных пробах имело стабильный характер. В пересчете на одно растение экссудация сахаров в вариантах с инокуляцией штаммами Ч-13 и SPB1217 равнялась соответственно 3.42 и 2.88 мкг/растение.

При выращивании инокулированных ризобактериями растений томата в минеральном растворе или почве одним из основных источников углерода и энергии для бактерий являются корневые экссудаты растений. Имея данные о количественных изменениях корневых выделений при инокуляции растений и показатели численности бактерий в ризосфере (табл. 3), можно оценить влияние микроорганизмов на интенсивность корневой экссудации.

Таблица 3. Отношение суммарного количества органических кислот к сахарам в корневых выделениях томата при инокуляции антифунгальными штаммами *B. subtilis* Ч-13 и *P. chlororaphis* SPB1217

Вариант	Суммарное количество*, мкг/растение		Отношение количества органических кислот к сахарам
	Кислоты	Сахара	
Стерильный контроль	53.5	2.63	20.4
<i>B. subtilis</i> Ч-13	49.6	3.42	14.5
<i>P. chlororaphis</i> SPB1217	93.0	2.88	32.3

Примечание. Суммарное количество органических кислот и сахаров получено расчетным путем из табл. 1 и 2.

Для определения интенсивности корневой экссудации при наличии в среде микроорганизмов был применен подход, при котором учитывается запас энергии, содержащейся в углеродном субстрате корневых выделений [7]. Величина углерода корневых экзометаболитов подсчитывалась из учета минимального количества субстрата, требуемого для роста измеряемой биомассы бактерий. Тогда массу углерода, выделяемого корнями, можно определить по следующей формуле [7]:

$$C = 0.956 \cdot (V_M + V_R - V_C) + C_R,$$

где C – масса углерода, выделяемая корнями, растущими в присутствии бактерий, 0.956 – коэффициент, учитывающий массу углерода субстрата, необходимого для синтеза в оптимальных условиях роста 1 г сухой массы бактерий; V_M – биомасса бактерий в минеральном растворе, V_R – биомасса на поверхности корней и V_C – биомасса в контрольном варианте, в инокулированном минеральном растворе без растений, C_R – масса углерода, оставшаяся в минеральном растворе после окончания опыта.

Таблица 4. Показатели корневых выделений и роста антифунгальных штаммов в ризосфере томата

Количество углерода в корневых выделениях, мкг/растение	Численность бактерий, 10^6 КОЕ/растение	Сухая биомасса растений, мг/растение	
Стерильные	22.5	-	3.41 ± 0.08

SPB1217	38.3	33.0 ± 3.7	4.12 ± 0.10
Ч-13	21.2	2.3 ± 0.3	3.81 ± 0.15

Примечание. Расчетная массовая доля углерода составляет 0.4 от суммарного количества выделившихся органических кислот и сахаров.

Массу сухой бактериальной клетки в ризосфере в стадии активного роста можно принять за 5×10^{-12} г [8]. Тогда для *B. subtilis* и *P. chlororaphis* биомасса клеток, учитывая их численность (табл. 4) будет составлять соответственно 11.5 и 165.0 мкг. Подставляя в формулу данные о количестве углерода в корневых выделениях (C_R) из табл. 4 и рассчитанную биомассу бактериальных клеток, получаем величину суммарного количества выделенного корнями углерода. Она составляет при инокуляции *B. subtilis* 32.2 мкг/растение (2.1% от сухой биомассы растения) и 196.1 мкг/растение (11.9% от сухой биомассы растения) в варианте с инокуляцией *P. chlororaphis*. Стерильные растения выделяли углерода 22.5 мкг/растение (1.7% от сухой биомассы растения). Данная оценка показывает, что корневая экссудация растениями томата органических кислот и сахаров в присутствии ризобактерий *B. subtilis* Ч-13 и *P. chlororaphis* SPB1217 в 1.4 и 8.7 раз выше, чем у стерильных растений. При этом наблюдался интенсивный рост интродуцированных бактерий в ризосфере.

Для активности ряда продуцентов антифунгальных биопрепаратов большое значение играет соотношение органических кислот и сахаров в корневых выделениях – состав и количество органических кислот значительно сильнее влияли на рост и антифунгальную активность ряда штаммов, чем количество сахаров [2]. В корневых выделениях томата доминируют органические кислоты: их суммарное количество в корневых выделениях стерильных растений в 20.4 раза выше, чем количество сахаров (табл. 3). Инокуляция растений ризобактериями изменяла это соотношение, однако доля органических кислот оставалась высокой, что может положительно влиять на антифунгальную активность биопрепаратов.

Таким образом, несмотря на потребление корневых выделений ризобактериями, обеспеченность питательным субстратом ризосферы томата остается высокой, что является одним из факторов успешного взаимодействия растений и ризобактерий – продуцентов микробиологических препаратов. Полученные данные свидетельствуют, что в растительно-микробной системе возникает метаболическая интеграция партнеров, определяемая регуляцией ризосферного пула питательных соединений за счет воздействия ризобактерий на систему выделения углерода у растений в виде корневых экссудатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Walker T.S., Bais H.P., Grotewold E., Vivanco J. M. Root exudation and rhizosphere biology // Plant physiology. 2003. V. 132. P. 44–51.
2. Кравченко Л.В., Азарова Т.С., Леонова-Ерко Е.И., Шапошников А.И.,
3. Макарова Н.М., Тихонович И.А. Корневые выделения томатов и их влияние на рост и антифунгальную активность штаммов *Pseudomonas* // Микробиология. 2003. Т. 72. № 1. С. 48–53.
4. В.К. Чеботарь, Н.М. Макарова, А.И. Шапошников, Л.В. Кравченко. Антифунгальные и фитостимулирующие свойства ризосферного штамма *Bacillus subtilis* Ч-13 – продуцента биопрепаратов. Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т.45. №4. С.465-469.
5. Kamilova F., Kravchenko L.V., Shaposhnikov A.I., Makarova N.M., Azarova T.S., Lugtenberg B. Organic acids, sugars and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria // Mol. Plant–Microbe Interact. 2006. V. 19. N 2. P. 250–256.
6. Chebotar V., Khotyanovich A., Cazacov A. EXTRASOL – a new multifunctional biopreparation for ecologically safe agriculture. In: Practice Oriented Results on Use and Production of Neem Ingredients and Pheromones IX / H. Kleeberg and C.P.W. Zebitz (eds), Druck&Graphic, Giessen. P. 127-134.

7. *Bais H.P., Tiffany L.W., Laura G.P., Gilroy S., Vivanco J.M.* The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms // *Annu. Rev. Plant. Biol.* 2006. V. 57. P. 233–266.
8. *Vancura V., Pricryl Z., Kalachova L., Wurst M.* Some quantitative aspects on root exudation // *Soil organisms as components of ecosystems. / Ecol. Bull. (Stockholm)* 1977. V. 25. P. 381-386.
9. *Lorian V., Tosch W., and D. Joyce.* 1985. Weight and morphology of bacteria exposed to antibiotics. In *D. Adam (ed.). The influence of antibiotics on the host- parasite relationship II.* Springer-Verlag, Berlin

