

УДК 630\*114.68

**М. Я. Острикова**, старший научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси);  
**А. В. Константинов**, аспирант, младший научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси);  
**И. М. Баландина**, научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси)

### **ВЛИЯНИЕ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ОБЛАДАЮЩИХ АЗОТФИКСИРУЮЩЕЙ И ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТЬЮ, НА РОСТ И РАЗВИТИЕ СЕЯНЦЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ**

Установлено положительное влияние предпосевной обработки штаммом *Rahnella aquatilis* E10 на грунтовую всхожесть семян сосны обыкновенной и показатель средней высоты проростков. Выявлено положительное действие азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий (*Rahnella aquatilis* E10, штамм 53). При обработке в вегетационный период они оказывают положительное влияние на биометрические показатели роста сеянцев сосны обыкновенной. Высота стволиков при обработке штаммом 53 в среднем равна 5,7, при использовании *Rahnella aquatilis* E10 – 5,6 см. Генетическая структура штамма 53 соответствовала *Serratia plymuthica* (99%-ная генетическая идентичность).

The positive effect of the soil pretreatment by strain *Rahnella aquatilis* E10 on the seed germination of Scots pine and average height of seedlings was established. The positive effect of nitrogen fixing and phosphate mobilizing bacteria was revealed. *Rahnella aquatilis* E10, strain 53 during treatment in the growing season have a positive impact on the biometric growth parameters of seedlings of pine. Height trunks when processing strain 53 average is 5.7, using *Rahnella aquatilis* E10 – 5.6 cm. Genetic structure of strain 53 corresponded *Serratia plymuthica* (99% probability genetic identity).

**Введение.** Перспективным и экономически целесообразным направлением в микробных технологиях в последние годы признано создание двухкомпонентных биопрепаратов, характеризующихся комплексом положительных свойств, синергическим взаимодействием продуцентов, высокой их выживаемостью и конкурентоспособностью в экосистемах. Полученные на основе высокоэффективных штаммов азотфиксирующих и фосфатмобилизующих микроорганизмов биопрепараты повышают биологический потенциал ризосферы, улучшают корневое питание растений, повышают интенсивность ассимиляции корнями питательных веществ, содержащих азот и фосфор [1].

Нормальный рост и здоровье растений определяются, в частности, сложными конкурентными взаимодействиями между разнообразными микроорганизмами, контактирующими с семенами, корнями и наземными вегетирующими органами растений. Наиболее конкурентоспособные микроорганизмы, сумевшие занять такие ключевые ниши, как ризосфера, спермосфера (поверхность и ткани семян и плодов) и филосфера (поверхность листьев) растений, вступают, в свою очередь, в тесные взаимоотношения с растением-хозяином [2]. Ризосферные микроорганизмы выполняют комплекс функций, полезных для растения-хозяина, важнейшей из которых является улучшение корневого питания растения, повышение интенсивности ассимиляции корнями питательных веществ, содержащих азот и фосфор.

Перспективными объектами для получения широкого спектра биопрепаратов различного

происхождения являются штаммы некоторых свободноживущих бактерий (*Azotobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* и др.), которые играют значительную роль как в ассоциативных, так и в симбиотических сообществах. Штаммы ризосферных микроорганизмов, оказывающих положительное влияние на рост и развитие растений принято называть PGPR (Plant Growth Promotion Rhizosphere) – ризосферные бактерии, способствующие росту растений [1, 3].

Для создания микробиологических препаратов на базе ассоциативных бактерий используются штаммы, которые способны к активному заселению ризосферы, что создает условия для ее искусственного обогащения [4, 5].

Целью данного исследования явилось изучение влияния суточных культур азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий на грунтовую всхожесть семян и биометрические характеристики роста сеянцев сосны обыкновенной в лесных питомниках.

**Основная часть.** Для проведения эксперимента по определению влияния препаратов на основе микроорганизмов, обладающих азотфиксирующей и фосфатмобилизующей способностью на грунтовую всхожесть семян сосны обыкновенной был выбран питомник Корневской ЭЛБ, на котором были проведены следующие мероприятия:

1. Ранней весной на питомнике проведена предпосевная обработка почвы, направленная на создание ровной, разрыхленной поверхности почвы. Она включала весеннюю перепахку почвы без отвалов, боронование, культивацию,

шлейфование, прикатывание, фрезерование и разделку гряд.

2. Для посева были отобраны семена сосны обыкновенной 1 класса. Контрольные семена замачивались в водном растворе перманганата калия в течение 20 ч. Опытные семена замачивались в двух суточных культурах *Agrobacterium* sp. 17 (азотфиксирующий) и *Rahnella aquatilis* E10 (азотфиксирующий и фосфатмобилизующий) в течение 20 ч. Бульонные культуры микроорганизмов нарабатывали на питательной среде ГРМ-бульон при 28°C в течение 48 ч.

3. После замачивания семена освобождали от раствора культур микроорганизмов. Обработанные семена в день посева подсушивали на открытом воздухе в тени до состояния полной сыпучести.

4. Для уничтожения спор грибов на семенах их протравили сухим протравителем Фундазол из расчета – 4 г на 1 кг семян. Благодаря этому обработанные семена в период прорастания имели зону, свободную от возбудителей грибковых инфекций.

Уход за посевами включал уничтожение сорняков, рыхление почвы. В течение первого месяца после посадки было проведено два рыхления почвы и две прополки вручную.

При изучении влияния ризосферных бактерий на рост сеянцев сосны обыкновенной нами были использованы микробные изоляты, с неизвестным таксономическим положением. Для идентификации применялись методы молекулярно-генетической диагностики. Из чистых культур микроорганизмов по методике, описанной А. А. Прозоровым [6], была выделена суммарная ДНК.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в тонкостенных полипропиленовых пробирках объемом 0,2 мл. В ходе исследований был использован следующий состав реакционной смеси: 10×ПЦР буфер (100 мМ Трис HCl, pH 9,2, 250 мМ KCl) – 2,5 мкл, 25 мМ MgCl<sub>2</sub> – 2,5 мкл, вода (ПЦР-реагент) – 16 мкл, смесь 5 мМ нуклеотидтрифосфатов – 1 мкл, праймер (прямой) 10 мМ раствор – 1 мкл, праймер (обратный) 10 мМ раствор – 1 мкл, образец ДНК (40 нг/мкл) – 1 мкл, Таq ДНК-полимераза (1 ед./мкл) – 1 мкл.

ПЦР проводили по следующей программе:

1 этап (1 цикл). Денатурация.  $t = 3$  мин,  $T = 94^\circ\text{C}$ . 1 этап (5 циклов). Денатурация.  $t = 1$  мин,  $T = 94^\circ\text{C}$ . Отжиг.  $t = 1$  мин,  $T = 60^\circ\text{C}$ . Элонгация.  $t = 1$  мин,  $T = 72^\circ\text{C}$ .

2 этап (35 циклов). Денатурация.  $t = 45$  с,  $T = 94^\circ\text{C}$ . Отжиг.  $t = 60$  с,  $T = 47^\circ\text{C}$ . Элонгация.  $t = 2$  мин,  $T = 72^\circ\text{C}$ .

3 этап (1 цикл). Элонгация.  $t = 7$  мин,  $T = 72^\circ\text{C}$ .

4 этап (1 цикл). Охлаждение реакционной смеси.  $t = 5$  мин,  $T = 4^\circ\text{C}$ .

Для подтверждения видовой принадлежности бактерий методом секвенирования были использованы универсальные праймеры, фланкирующие фрагмент гена 16S РНК: u1 (прямой) – CCAGCAGCCGCGGTAATACG, u2 (обратный) – ATCGG(C/T)TACSTTGTTACGACTTC.

Электрофоретическое разделение проводили в горизонтальных электрофоретических камерах, используя агарозный гель [7].

Фотодокументирование продуктов электрофореза достигалось за счет видеосканирования в УФ-свете специальной системой Image Master (фирма Amersham Pharmacia Biotech).

Величина размеров каждой амплифицированной зоны вычислялась относительно электрофоретической подвижности маркеров с известной молекулярной массой с помощью программного обеспечения 1D-Elite (фирма Amersham Pharmacia Biotech).

В конце первого месяца после посадки была проведена оценка всхожести семян. На каждой ленте было заложено по три пробные площадки, размером 1 м<sup>2</sup>. Также был проведен подсчет количества растений на каждой пробной площадке и замер высоты 30 сеянцев (на каждой строчке по 6 растений).

Для изучения влияния ассоциативных микроорганизмов, обладающих азотфиксирующей и фосфатмобилизующей способностью на рост и развитие сеянцев сосны обыкновенной была проведена обработка сеянцев по вегетации. Для этого были наработаны чистые культуры микроорганизмов, подготовлены 2%-ные рабочие растворы микроорганизмов, проведена внекорневая обработка (опрыскивание). Обработку проводили вечером, чтобы избежать гибели микроорганизмов в результате попадания прямых солнечных лучей.

Каждая лента была разбита на пробные площадки и зоны защиты от взаимовлияния бактериальных препаратов. Размер пробных площадок и зон защиты составлял 5×1 м. Опыты по изучению влияния бактериальных препаратов на сеянцы сосны обыкновенной проводены в 3-кратной повторности.

На ленте 1 семена сосны обыкновенной перед посевом были обработаны *Agrobacterium* sp. 17, для обработки по вегетации использовались штаммы *Agrobacterium* sp. 17, штамм 53, штамм Ф22, штамм П1/а.

На ленте 2 семена сосны обыкновенной перед посевом обработаны *Rahnella aquatilis* E10, для обработки по вегетации использовались штаммы *R. aquatilis* E10, штаммы 64, 57 и П2/1.

На ленте 3 (контроль) семена сосны обыкновенной перед посевом обработаны марганцево-кислым калием. По вегетации сеянцы штаммами микроорганизмов не обрабатывались.

Оценка эффективности обработки семян сосны обыкновенной по вегетации различными штаммами проводилась в 3-кратной повторности в июле, августе и октябре.

В случае обработки штаммом *Agrobacterium* sp. 17 полевая всхожесть семян составила 377 проростков на 1 м<sup>2</sup>, что значительно ниже показателя всхожести семян, обработанных штаммом *Rahnella aquatilis* E10 (721 проросток на 1 м<sup>2</sup>). Всхожесть в контрольном варианте составила 539 проростков на 1 м<sup>2</sup>. Выявленные различия вариантов опыта по сравнению с контролем статистически достоверны.

Обработка изучаемыми штаммами семян оказала влияние на показатель средней высоты проростков: средняя высота проростков в варианте с применением *Rahnella aquatilis* E10 составила 2,05 мм, что достоверно отличается от контроля (1,77 мм). В случае обработки штаммом *Agrobacterium* sp. 17 средняя высота проростков была 1,50 мм, что достоверно ниже контрольного ( $p = 0,05$ ).

Полученные данные по влиянию ассоциативных микроорганизмов, обладающих азотфиксирующей и фосфатмобилизующей способностью на рост и развитие семян сосны обыкновенной представлены в таблице.

Анализ семян, обработанных штаммами по вегетации, показал, что предварительная предпосевная обработка семян штаммами азотфиксирующих и фосфатмобилизующих микроорганизмов (*Agrobacterium* sp. 17, *Rahnella aquatilis* E10) в основном оказывает положительное влияние.

Самая большая высота семян наблюдалась при обработке штаммом 53, обладающим фосфатмобилизующими свойствами (семена про-

шли предпосевную обработку азотфиксатором *Agrobacterium* sp. 17) и составила 5,7 см, что выше высоты семян в контроле – 5,5 см. Однако приживаемость данных семян была 53%, что ниже, чем в случае обработки по вегетации фосфатмобилизующим штаммом Ф22 (семена также прошли предпосевную обработку азотфиксатором *Agrobacterium* sp. 17), где этот показатель равен 67,5% (при высоте стволика 5,3 см).

Для проведения дальнейших экспериментов можно рекомендовать штамм 53, обладающий фосфатмобилизующей способностью.

Анализ семян, обработанных штаммами по вегетации *Agrobacterium* sp. 17 (предварительная предпосевная обработка тем же штаммом), показал, высота стволика (5,3 см) статистически достоверно не отличалась от контрольного варианта (5,5 см), а приживаемость была выше, чем во всех опытных вариантах и составила 87 %.

Из полученных данных следует, что при проведении дальнейших исследований в качестве азотфиксирующего микроорганизма можно использовать штамм *Agrobacterium* sp. 17 в случае предпосевной обработки семян в сочетании с обработкой семян по вегетации данным штаммом.

Предварительная предпосевная обработка штаммами микроорганизмов (в данном случае *Rahnella aquatilis* E10) оказывает положительное влияние на рост и приживаемость семян. Наибольшая высота семян была отмечена при обработке по вегетации штаммом *Rahnella aquatilis* E10 (5,6 см), хотя приживаемость семян при обработке этим штаммом была ниже, чем в контроле и составила в конце вегетационного периода 67%.

#### Влияние штаммов азотфиксирующих микроорганизмов на семена сосны обыкновенной при обработке по вегетации

| Штаммы микроорганизмов                               | Средняя высота стволиков, см |                                  |                                | Диаметр, мм | Количество растений, шт. |                                | Приживаемость, % |
|--|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------|------------------|
|  | перед обработкой, см         | через 1,5 месяца после обработки | через 3 месяца после обработки |             | перед обработкой         | через 3 месяца после обработки |                  |
| Предпосевная обработка <i>Agrobacterium</i> sp. 17   |                              |                                  |                                |             |                          |                                |                  |
| <i>Agrobacterium</i> sp. 17                          | 1,9 ± 0,3                    | 3,7 ± 0,7                        | 5,3 ± 0,8                      | 2,3 ± 0,1   | 98                       | 85                             | 87               |
| 53   | 1,6 ± 0,4                    | 4,2 ± 1,1                        | 5,7 ± 1,2                      | 2,3 ± 0,1   | 32                       | 17                             | 53               |
| П1/а   | 1,5 ± 0,4                    | 3,8 ± 1,4                        | 5,2 ± 1,8                      | 2,1 ± 0,1   | 25                       | 14                             | 56               |
| Ф22  | 1,9 ± 0,4                    | 3,7 ± 1,2                        | 5,3 ± 1,1                      | 2,4 ± 0,1   | 40                       | 27                             | 67,5             |
| Предпосевная обработка <i>Rahnella aquatilis</i> E10 |                              |                                  |                                |             |                          |                                |                  |
| <i>Rahnella aquatilis</i> E10                        | 3,3 ± 0,4                    | 4,3 ± 0,6                        | 5,6 ± 0,8                      | 2,5 ± 0,1   | 159                      | 107                            | 67               |
| 64   | 2,3 ± 0,4                    | 4,5 ± 1,4                        | 5,5 ± 1,3                      | 2,0 ± 0,1   | 20                       | 11                             | 55               |
| П2/1   | 2,3 ± 0,3                    | 3,7 ± 0,6                        | 4,9 ± 0,8                      | 2,1 ± 0,1   | 194                      | 101                            | 52               |
| 57   | 2,7 ± 0,4                    | 4,5 ± 0,7                        | 5,5 ± 0,8                      | 2,2 ± 0,1   | 102                      | 65                             | 63               |
| <b>Контроль</b>                                      | 2,5 ± 0,3                    | 4,9 ± 0,6                        | 5,5 ± 0,8                      | 2,0 ± 0,1   | 96                       | 79                             | 82               |

Однако общее количество семян в данном варианте опыта было больше, чем в контрольном варианте. Это связано с тем, что предпосевная обработка семян штаммом *Rahnella aquatilis* E10 привела к повышенной всхожести семян.

Таким образом, из полученных данных следует, что в дальнейшем можно использовать для обработки по вегетации *Agrobacterium* sp. 17, *Rahnella aquatilis* E10, штамм 53 с предварительной предпосевной инокуляцией семян штаммом *Rahnella aquatilis* E10.

Из чистых культур микроорганизмов была выделена суммарная ДНК.

Проведенный спектрофотометрический анализ полученных препаратов нуклеиновых кислот показал, что из бактериальной колонии ( $2-5 \text{ мм}^2$ ) – 1–2 мкг суммарной ДНК микроорганизмов. Соотношение экстинкций  $A_{260}/A_{280}$  находилось в диапазоне 1,85–1,97, что удовлетворяло требованиям, предъявляемым к методике. Проведенное электрофоретическое фракционирование выявило отсутствие деградации ДНК в препаратах. Размер получаемых фрагментов ДНК в среднем составил 18–25 тыс. п.о.

Образцы чистых культур ризосферных бактерий, для которых была выявлена амплификация с праймерами u1 и u2, были проанализированы (методом секвенирования) по локусу, кодирующему 16S рРНК с целью проведения видовой идентификации по Генному Банку NCBI. Генетическая структура выявленных родов и видов ризосферных бактерий соответствовала следующим образцам, депонированным в базе данных: штамм П2/1 – *Pseudomonas* sp. (99% генетической идентичности с *P. putida*), штамм 2/3 – *Burkholderia* sp. (99% генетической идентичности с *Burkholderia phytofirmans*), *Rahnella aquatilis* (100%-ная гомология), штамм 64 – *Enterobacter* sp. (98% генетической идентичности), штаммы 53 и 57 – *Serratia* sp. (99% генетической идентичности с *S. plymuthica*), штамм П1/а – *Pseudomonas fluorescens* (99% генетической идентичности).

**Заключение.** Установлено, что предпосевная обработка семян сосны обыкновенной штам-

мами азотфиксирующих и фосфатмобилизующих микроорганизмов оказала влияние на показатель средней высоты проростков. Средняя высота проростков в варианте с применением *Rahnella aquatilis* E10 составила 2,1 см, что достоверно отличается от контроля (1,8 см). В случае обработки штаммом *Agrobacterium* sp. 17 средняя высота проростков была 1,5 см, что достоверно ниже контрольного показателя при уровне значимости  $p = 0,05$ . Грунтовая всхожесть семян при обработке штаммом *Rahnella aquatilis* E10 была выше, чем в контроле, а при обработке *Agrobacterium* sp. 17 ниже. Также было выявлено положительное действие штаммов азотфиксирующих и фосфатмобилизующих микроорганизмов на биометрические показатели роста семян сосны обыкновенной. Наибольший положительный эффект показало использование штамма 53, *Rahnella aquatilis* E10: высота стволиков – 5,7 и 5,6 см соответственно.

#### Литература

1. Боронин А. М., Кочетков В. В. Биологические препараты на основе псевдомонад // АГРО XXI. 2000. № 3. С. 3–5.
2. Лугтенберг Б., Камилова Ф. Ризосферные псевдомонады, полезные для растений // Экологическая генетика. 2008. Т. VI. № 2. С. 4–12.
3. Vissey J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers // Plant soil. 2003. Vol. 225. P. 571–586.
4. Кацы Е. И. Молекулярная генетика ассоциативного взаимодействия бактерий и растений. М.: Наука, 2007. 86 с.
5. Фотина П. Н. Применение микробиологических препаратов в сельском хозяйстве // Вестник Астраханского государственного технического университета. 2007. № 4 (39). С. 133–136.
6. Прозоров А. А. Трансформация у бактерий. М.: Наука, 1988. 256 с.
7. Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воропаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 2007. 176 с.

Поступила 21.01.2014