

Создание микробно-растительной ассоциации, обеспечивающей устойчивость сои (*Glycine max.*) в условиях загрязнения

Шавейко Ирина, Картыжова Лилия, Алещенкова Зинаида

Институт Микробиологии Национальной Академии Наук Республики Беларусь

Создание эффективного микробно-растительного взаимодействия в условиях загрязнения почв продуктами переработки нефти предполагает отбор устойчивых растений и ризобактерий, сохраняющих свои физиолого-биохимические свойства. В ходе опыта была подобрана пара клубеньковых и фосфатмобилизирующих бактерий - *Br. japonicum* 72+ *Enterobacter sp.* 64, которая при инокуляции семян сои, обеспечивает повышение устойчивости растения-хозяина к условиям загрязнения и стимулирует накопление сухого вещества на 23%, а также может быть рекомендована как эффективная микробно-растительная ассоциация для восстановления загрязненных почв.

Соя, ризобии, фосфатмобилизирующие бактерии, индустриальное масло, дизельное топливо

Введение

Загрязнение окружающей среды является мировой проблемой. В связи с развитием промышленности, транспорта и научно-техническим прогрессом вмешательство людей в среду обитания стало более существенным. Это приводит порой к катастрофическим последствиям.

Загрязнение окружающей среды и деградация природно-ресурсного потенциала в Беларуси происходит в результате прямого разрушения почв, при ведении различных строительных работ и добыче полезных ископаемых, вследствие развития эрозионных процессов преимущественно на пахотных угодьях, а также в результате химического загрязнения земель (в зонах влияния транспортных магистралей, полигонов складирования отходов и агрохимикатов, в местах добычи нефти, калийных удобрений и др.) и трансформации дерново-подзолистых почв при их длительном сельскохозяйственном использовании (Гусаков, 2005).

Почва, обладающая огромной адсорбирующей способностью, аккумулирует в себе большую часть загрязнений, что ведет к изменению ее физических, агрохимических и микробиологических характеристик. Загрязняющие вещества ингибируют дыхательную активность почвы, процессы азотфиксации, нитрификации, разрушения целлюлозы, нарушают почвенное плодородие. В результате утрачивается сельскохозяйственное значение угодий. В связи с этим необходимы экологически безопасные и экономически обоснованные методы, направленные на восстановление плодородия сельскохозяйственных земель (Добровольский, 2002).

Известно, что почвенные микроорганизмы активно взаимодействуют с растениями. В настоящее время накоплен большой материал о механизмах положительного воздействия ассоциативных ризосферных бактерий на растения. К таким механизмам относятся фиксация атмосферного азота, продуцирование биологически активных веществ, активизация потребления корнями питательных элементов, биоконтроль фитопатогенов и индуцирование системной устойчивости растений (Белимов, 2008). Растения, находясь в неблагоприятных условиях среды, нуждаются в дополнительных ресурсах питания и энергии,

оптимизации гормонального статуса, и снижении интенсивности воздействия стрессоров. Положительное воздействие ассоциативных бактерий затрагивает именно те процессы метаболизма растений и их взаимодействия с окружающей средой, которые нарушаются при стрессе. Можно предположить, что бактериальное воздействие потенциально ориентировано на снижение стрессовой нагрузки на растения в неблагоприятных условиях. В связи с этим создание эффективных микробно-растительной ассоциаций, обладающих новыми и уникальными качествами может существенно повысить адаптацию партнеров к стрессовым факторам и уровень гомеостаза самой ассоциации, что приблизит к решению существующей экологической проблемы (Белимов, 2008; Тихонович, 2007).

Литературные данные свидетельствуют о положительном влиянии микробно-растительных ассоциаций, используемых в условиях загрязнения окружающей среды полициклическими ароматическими углеводородами, синтетическими поверхностно-активными веществами, нефтью, хлорорганическими, нитроароматическими и фосфорорганическими соединениями, а также другими ксенобиотиками (Турковская, 2005; Киреева, 2007; Назаров, 2005).

В условиях роста и развития сельскохозяйственных культур формируется определенный микробиоценоз в почве, который и обеспечивает в той или иной степени устойчивость растений при загрязнении почвы. В этой связи интерес представляют микроорганизмы, относящиеся к группе PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria – стимулирующие рост растений ризобактерии), обладающие к тому же высоким деструктивным потенциалом в отношении поллютантов (Душенков, 1999).

Таким образом, целью наших исследований было создание эффективной микробно-растительной ассоциации, обеспечивающей устойчивость сои (*Glycine max.*) в условиях загрязнения почвы продуктами переработки нефти.

Объектами исследования являлись: соя сорта «Припять», эффективные штаммы клубеньковых *Bradyrhizobium japonicum* 72 и фосфатмобилизирующих бактерий (ФМБ) *Enterobacter sp.* 64.

Продукты переработки нефти: индустриальное масло (ИГП-30), дизельное топливо (ДТ).

Методы

Изучение физиолого-биохимических свойств и идентификацию штаммов ризобактерий проводили в соответствии с руководствами (Теппер, 2004; Егоров, 1983; Holt et al., 1994).

Ростостимулирующее действие исследуемых бактерий и влияние продуктов их метаболизма на энергию прорастания семян сои, их всхожесть, развитие и накопление сырой/сухой массы корней изучали методом, изложенным в руководстве (Возняковская, 1969).

Симбиотическую активность *Rhizobium* при совместной инокуляции с фосфатмобилизующими бактериями определяли в условиях светокультуры. Влияние ингредиентов на посевные качества семян изучали в лабораторных условиях: в течение 24 часов при использовании бинарного инокулянта (*Br. japonicum* 72: *Enterobacter sp.* 64 = 1:1).

Азотфиксирующую активность отобранных штаммов клубеньковых бактерий определяли ацетиленовым методом на газовом хроматографе Chrom-4 (Умаров, 1976).

Результаты и обсуждения

Ранее нами установлено, что соя является одной из наиболее устойчивых бобовых культур к загрязнению почвы гербицидами и продуктами нефтепереработки (Semenova et al., 2012).

Выживаемость отобранных ризобактерий (клубеньковых и фосфатмобилизующих) при совместном глубинном культивировании на среде с изученными ингредиентами (индустриальным маслом и дизельным топливом) (1% об.) через 72 часа составила 88-90%.

Установлено, что фосфатмобилизующий изолят *Enterobacter sp.* 64 устойчив к изучаемым ингредиентам. Глубинное культивирование фосфатмобилизующих бактерий на меласно-минеральной среде в течение 48 ч совместно с дизельным топливом (1% об) приводит к увеличению их численности в 1,3 раза, а с индустриальным маслом титр клеток фосфатмобилизующих бактерий возрос до $3,7 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

Совместное культивирование клубеньковых и фосфатмобилизующих бактерий обеспечивает формирование эффективной микробной композиции (*Br. japonicum* 72 + *Enterobacter sp.* 64), используемой для инокуляции семян сои, которая способствует повышению устойчивости растения-хозяина на 23% в условиях загрязнения дизельным топливом и ИГП-30.

В условиях светокультуры установлено эффективное функционирование микробной композиции (*Br. japonicum* 72 + *Enterobacter sp.* 64) в ассоциации с растением-хозяином. На фоне дизельного топлива и индустриального масла за счет использования микробно-растительной ассоциации в условиях загрязнения дизельным топливом и индустриальным маслом длина проростков увеличилась в 1,6 и 2,5 раза соответственно.

Установлено, что использование микробной композиции (*Br. japonicum* 72 + *Enterobacter sp.* 64) для инокуляции семян сои эффективнее на 5% по сравнению с моноинокуляцией семян клубеньковыми бактериями на фоне загрязнения дизельным топливом (рисунок 1).

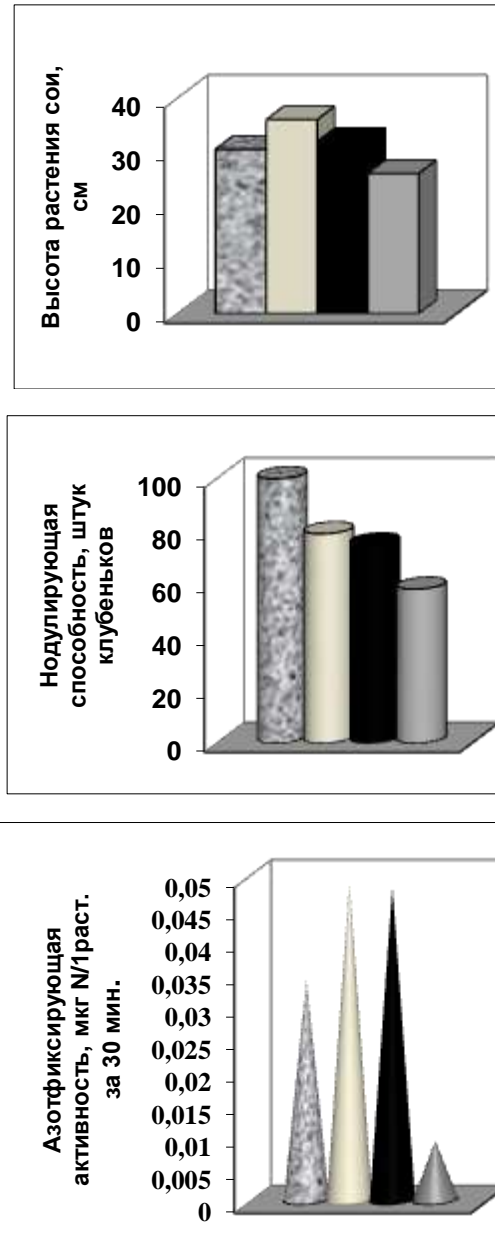


Рис. 1. Симбиотические свойства микробной композиции *Br. japonicum* 72 + ФМБ при совместной инокуляции на фоне загрязнения среды углеводородами нефти: □ - *Br. japonicum* 72, ■ - *Br. japonicum* 72 + ФМБ, ▒ - *Br. japonicum* 72 + ФМБ + ДТ, ▨ - *Br. japonicum* 72 + ФМБ + ИГП-30

Установлено, что азотфиксирующая активность клубеньковых бактерий штамма *Br. japonicum* 72 в варианте с бинарной инокуляцией выше на 43% по сравнению с моноинокуляцией в условиях загрязнения индустриальным маслом и дизельным топливом.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что микробная композиция в ассоциации с растением-хозяином (соя *Glycine Max.*) обеспечивает повышение ее устойчивости в условиях

загрязнения дизельным топливом и промышленным маслом и может быть рекомендована как эффективная микробно-растительная ассоциация для восстановления загрязненной почвы.

Выводы

1. Отобрана микробная композиция, устойчивая к загрязнению почвы дизельным топливом и промышленным маслом (1% об.), включающая эффективные штаммы клубеньковых бактерий (*Br. japonicum* 72) и фосфатмобилизующих (*Enterobacter sp.* 64).

2. Выживаемость ризобактерий (*Br. japonicum* 72 и *Enterobacter sp.* 64) при совместном культивировании в питательной среде с ингредиентами загрязнителя через 72 часа составила 88-90%.

3. Микробная композиция в условиях загрязнения дизельным топливом обеспечивает формирование эффективного симбиоза с соей (азотфиксирующая активность составила 0,049 мкг N/1 растение за 30 мин.).

4. Эффективность микробно-растительной ассоциации (*Br. japonicum* 72 + *Enterobacter sp.* 64 + *Glycine Max.*) установлена в условиях загрязнения почвы продуктами переработки нефти.

Список литературы

1. БЕЛИМОВ, А.А. Взаимодействие ассоциативных бактерий и растений в зависимости от биотических и абиотических факторов. автореф. д-ра биол. наук: 03.00.07 / А.А. Белимов; СПб. – 2008 г. - 46 с.
2. Bergey's manual of systematic bacteriology / J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sheath [et al.] // 9-nded. - Baltimore e.a. : William & Wilkins, 1994. – P. 787.
3. ВОЗНЯКОВСКАЯ, Ю.М. Микрофлора растений и урожай / Ю.М. Возняковская. – Л.: Колос, 1969. – С. 14-22.
4. ГУСАКОВ, В.Г. Актуальные вопросы мелиорации: прошлое, настоящее, будущее / В.Г. Гусаков // Весті НАН Беларусі. Сер. аграрных навук. - 2005. - №4. - С. 4-8.
5. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, Г.В. Деградация и охрана почв / Г.В. Добровольский. М.: Изд-во МГУ, 2002. – 654 с.
6. ДУШЕНКОВ, В. Фиторемедиация: зеленая революция в экологии / В. Душенков, И. Раскин // Химия и жизнь-21 век. - 1999. - № 11-12. - С. 48-49.
7. ЕГОРОВ, Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Н.С. Егоров. - Москва, 1983. – 222 с.
8. КИРЕЕВА, Н. А. Мониторинг роста и развития растений, используемых для фиторемедиации нефтезагрязненных почв / Н. А. Киреева, В.В. Водопьянов // Экология и промышленность России. - 2007. - №9. - С. 46-47.
9. НАЗАРОВ, А.В. Потенциал использования микробно-растительного взаимодействия для биоремедиации / А.В. Назаров, С.А. Иларионов // Биотехнология. - 2005. - № 5. - С. 54-62.
10. SEMENOVA, I.V. Bradyrhizobium japonicum association to soil pollution with oil hydrocarbons and pesticides/I.V. Semenova, L. E. Kartyzhova, Z. M. Alezhenkova// 18th international scientific conference "Human and Nature Safety" -2012.-№2.-P. 106-108.
11. ТЕППЕР, Е. З. Практикум по микробиологии / Е.З.Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М. ООО «Дрофа», 2004. – 256 с.
12. ТИХОНОВИЧ, И.А. Молекулярно-генетический контроль эффективности и специфичности микробно-растительных взаимодействий / И.А. Тихонович // Фундаментальные и прикладные аспекты исследования симбиотических систем: материалы всероссийской конференции с международным участием, 25-27 сентября 2007 г. – Саратов, 2008. - С. 5-8.
13. ТУРКОВСКАЯ, О.В. Биodeградация органических поллютантов в корневой зоне растений / О.В.Турковская, А.Ю. Муратова // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями. - М. : Наука. - 2005. - С. 180-208.
14. УМАРОВ, М.М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях / М.М. Умаров // Почвоведение. – 1976. – № 11. – С. 119–123.

Šaveiko Irina, Kartyzhova Liliya, Aleschenkova Zinaida

Creation of the microbe-plant association providing stability of soy (*Glycine Max.*) in the conditions of pollution

Summary

There was selected the microbial composition containing of nodulating and fosfatmobilizing bacteria (*Br. japonicum* 72+ *Enterobacter sp.* 64) that is steady in conditions of pollution with oil processing products. Application of the binary microbic inoculation of soy seeds is more effective than a monoinoculation for 43% at pollution of the soil with industrial oil and diesel fuel. The created microbe-plant association (*Br. japonicum* 72+ *Enterobacter sp.* 64+ soy (*Glycine Max.*)) promotes an effective fitoremediation of the soil polluted with industrial oil and diesel fuel.

Soya, rhizobia, fosfatmobilizing bacteria, industrial oil, diesel fuel

Получено в марте 2016 г., подписано в печать в апрель 2016 г.

Irina ŠAVEIKO. Junior researcher (postgraduate student), Institute of Microbiology Belarus National Academy of Sciences. Address: Kuprevich str, 2, 220141, Minsk, Belarus. Tel. (+37517) 2659967, e-mail: 6773381@gmail.com

Liliya KARTYZHOVA. hD of biol. science, Institute of Microbiology Belarus National Academy of Sciences. Address: Kuprevich str, 2, 220141, Minsk, Belarus. Tel. (+37517) 2659967, e-mail: Liliya_Kartyzhova@mail.ru

Zinaida ALESCHENKOVA. Dr. of biol. science, Institute of Microbiology Belarus National Academy of Sciences. Address: Kuprevich str, 2, 220141, Minsk, Belarus. Tel. (+37517) 2659967, e-mail: aleschenkova@mbio.bas-net.by