

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МИКРОБНО-РАСТИТЕЛЬНО-РАСТЕНИЯ СИСТЕМ В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ ПОЧВЫ*

А.В. Назаров, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
Е.С. Корсакова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
А.А. Пьянкова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
Е.А. Шестакова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
Л.Н. Ананьина, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

На территории Пермского края в ризосфере растений, произрастающих вблизи солевых вывалов, были обнаружены уникальные сообщества галофильных и галотолерантных бактерий. Данные бактерии могут быть использованы для создания биопрепаратов, улучшающих рост растений в стрессовых условиях. Полученные данные указывают на наличие не изученного ранее механизма положительного влияния ризосферной микрофлоры на растения в условиях засоления вследствие продукции бактериями осмопротекторного соединения – эктоина.

Ключевые слова: *бактериальные сообщества, ризосфера, техногенное засоление, осмопротекторы, эктоин.*

В настоящее время около 10% поверхности континентов покрыто засоленными почвами, при этом климатические изменения и антропогенное воздействие на окружающую среду приводят к увеличению площади почв с повышенной минерализацией [1]. Однако ризосферные бактериальные сообщества, обитающие в почве около корней растений, произрастающих на засоленных почвах, изучены относительно слабо. Имеющиеся исследования охватывают территории с засушливым климатом и прибрежно-морские регионы, где данная проблема стоит наиболее остро [2–6]. Между тем воздействие техногенного засоления почвы на ризосферные бактериальные сообщества в условиях гумидного климата, остается практически не изученным.

Данные исследования важны с теоретической точки зрения, так как дают материал для анализа механизмов функционирования растительно-микробных симбиозов в условиях засоления. Кроме того, ризосферные микроорганизмы могут снижать стрессовое воздействие на растения различных факторов, в том числе и засоления, например, улучшая минеральное питание растений, продуцируя биологически активные вещества (фитогормоны, витамины), разрушают поступающую от растений в прикорневую почву 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК) [7]. Поэтому результаты исследований ризосферных микробных сообществ в условиях засоления могут быть использованы для создания биотехнологий, повышающих продуктивность расте-

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ-Урал № 13-04-96048.

ний при засолении почв.

Одной из основных систем защиты бактерий и растений от повышенной концентрации солей в среде является накопление в клетках осмопротекторных соединений. Эктоин – наиболее распространенный осмопротектор в мире прокариот [8]. Однако роль бактериальных осмопротекторных соединений, и в частности, эктоина в положительном воздействии ризосферных бактерий на растения в условиях засоления почвы практически не изучена.

Цель данной работы – исследование бактериальных сообществ ризосферы, а также оценка влияния бактериального осмопротектора – эктоина на растения в условиях техногенного засоления почвы. Исследования проводились на территории района промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей вблизи солеотвалов предприятий Соликамского калийного производственного рудопроизводства 2 (СКПРУ 2) и Соликамского калийного производственного рудопроизводства 1 (СКПРУ 1) ПАО «Уралкалий» (г. Соликамск, Пермский край). Основным объектом исследования являлись бактериальные сообщества ризосферы растений вида мятлика лугового (*Poa pratensis* L.), доминирующего в луговых фитоценозах, находящихся рядом с солеотвалами.

Бактериальные сообщества ризосферы растений, произрастающих на почве с техногенным засолением возле солеотвалов. Вследствие поступления солей из солеотвалов происходит засоление находящихся рядом почв. В образцах

почв, отобранных в период июня (участки 2 и 3), концентрация Na^+ выше, чем в незасоленной почве (участок 1) в 36,8 и 34,9 раза, K^+ – 33,3 и 15,7 раза, Ca^{2+} – 7,7 и 3,7 соответственно. Содержание Mg^{2+} на участках с засоленной почвой было меньше, чем на площадке без засоления (табл. 1). Засоленные почвы в июле содержали большее количество солей, чем в июне, по-видимому, из-за их вымывания весной и накопления летом. В пробах почв, отобранных в июльский период (участки 5–8), концентрация Na^+ выше, чем в незасоленной почве (участок 4) в 263,1–1150,0 раза, K^+ – в 7,5–81,2 раза, Ca^{2+} – в 11,5–42,7, Mg^{2+} – в 4,1–23,4 раза.

Отмечено, что численность гетеротрофных бактерий в ризосферной зоне изученных растений, произрастающих в условиях засоления, была меньше, чем в ризосфере растений, произрастающих на незасоленных участках (табл. 2). При этом данное отрицательное воздействие на численность было сильнее выражено в более засоленных почвах, отобранных в июле. С другой стороны, в июле отмечено положительное влияние засоления почвы на таксономическое разнообразие бактерий в ризосфере, а в июне – отрицательное (табл. 2).

Также обнаружено влияние засоления почвы на таксономическую структуру ризосферных бактериальных сообществ. В образцах ризосферы, отобранных с площадок в июне, имеющих наименьшую степень засоления почвы, а также с участков без засоления доминировали предста-

Таблица 1

Содержание Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} в почве исследованных участков

Номер участка	Время отбора проб	Концентрация ионов в почве, мг/кг			
		Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}
1	Июнь	4,5	6,3	8,1	42,3
2		165,7	209,9	7,3	325,8
3		157,0	99,2	5,8	157,0
4	Июль	5,0	7,1	23,0	56,7
5		5 750,0	53,3	115,0	2 419,7
6		1 315,5	286,4	100,7	895,3
7		1 320,1	576,6	95,1	649,4
8		1 943,5	395,5	539,1	1186,0

Примечание: 1, 4 – участки с почвой без засоления; 2, 3, 5, 6, 7, 8 – участки с засоленной почвой.

Таблица 2

Влияние техногенного засоления на численность и разнообразие гетеротрофных бактерий в ризосфере растений

Номер участка	Время отбора проб	Численность бактерий	Индекс Шеннона-Уивера (H)	Количество выделенных штаммов
1	Июнь	$2,1 \times 10^8$	3,43	21
2		$1,2 \times 10^8$	3,15	16
3		$1,5 \times 10^8$	2,46	15
4	Июль	$8,4 \times 10^7$	1,47	4
5		$2,5 \times 10^7$	2,61	14
6		$1,4 \times 10^7$	1,61	9
7		$1,4 \times 10^7$	1,51	7
8		$1,2 \times 10^7$	1,82	6

Примечание: 1, 4 – участки с почвой без засоления; 2, 3, 5, 6, 7, 8 – участки с засоленной почвой.

вители родов *Pseudomonas* и/или *Luteimonas*, кроме того, все выделенные штаммы бактерий были филогенетически близки типовым штаммам, изолированным из незасоленных экосистем.

На участках с наиболее засоленной почвой, пробы с которых были отобраны в июле, доминировали бактерии семейства *Halomonadaceae*, представители родов *Kushneria* и *Halomonas*. При этом 72% выделенных штамма были наиболее близки к типовым штаммам, выделенным из мест с повышенной соленостью, что указывает на формирование в ризосферах с увеличением степени засоления почв сообществ галофильных и галотолерантных бактерий. На участке 7, также, как и в вариантах с незасоленной почвой и почвой с низкой концентрацией солей, преобладали бактерии рода *Pseudomonas*, однако они были наиболее близки по нуклеотидному составу гена 16S рРНК к морской галофильной бактерии *Pseudomonas xanthomarina* КММ 1447^T.

Ризосферные сообщества с доминированием представителей рода *Halomonas* были ранее найдены в прикорневой зоне клубнекамыша морского (*Bolboschoenus maritimus*) и бескильницы болотной (*Puccinellia limosa*), произрастающих в степи на берегах соленых озер национального парка – Кишкуншаг в Венгрии [5], а также в ризосфере солероса шишковидного (*Salicornia strobilacea*), произрастающего на солончаках в пустынях, расположенных на юге Туниса [4].

Однако особенностью ризосферных сообществ, обнаруженных на территории Пермского края вблизи солеотвалов, является филогенетическая близость достаточно большой части штаммов бактерий, выделенных из наиболее засоленных почв, – 33% к типовым штаммам, изолированным из морских экосистем. Вопрос, откуда попали данные бактерии: из морей, удаленных от этого места на сотни и тысячи километров, или из солеотвала с солями древнего Пермского моря, требует дальнейшего исследования.

Среди бактерий, выделенных в ходе работы, был проведен скрининг на способность к деструкции АЦК (на наличие АЦК-деаминазной активности). Бактерии, имеющие данный фермент, стимулируют рост растений, так как разрушают поступающую от растений в ризосферу АЦК, которая является непосредственным предшественником стрессового растительного гормона этилена, что снижает его выработку растениями [9]. Было отобрано 7 штаммов с наибольшей АЦК-деаминазной активностью. Данные штаммы: ML 4, ML13, ML17, ML26, ML36, ML37, ML65, имели максимальное сходство по нуклеотидным последовательностям гена 16S РНК с типовыми штаммами *Pedobacter agri* PB92^T, *Rhodococcus fascians* DSM 20669^T, *Kocuria rhizophila* DSM 11926^T, *Pseudomonas moorei* RW10^T, *Ps. orientalis* CFML 96-170^T, *Herbaspirillum hiltneri* N3^T соответственно. Оценено влияние данных бактерий на

солеустойчивость растений по росту корней проростков рапса (*Brassica napus* L.) в 1%-ном растворе NaCl по методу [9].

Обнаружено, что все отобранные штаммы бактерий увеличивали рост корней по сравнению с контрольным вариантом с необработанными растениями в 17,1–43,0 раза (рис. 1). Наибольшее положительное действие оказала обработка семян растений штаммами ML36, ML26 и ML13, увеличивших рост корня растений в 43,0, 29,3 и 31,2 раза соответственно.

Роль осмопротектора-эктоина в положительном влиянии ризосферных

бактерий на растения в условиях засоления. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии впервые было определено содержание эктоина в ризосфере и в почве без растений. Установлено, что концентрация эктоина в исследованных почвах зависит от их минерализации. В почве без засоления эктоин не обнаружен как в почве без растений, так и в ризосфере растений (рис. 2). С увеличением засоленности почв возрастала концентрация в них эктоина. При этом во всех вариантах содержание эктоина в ризосфере было в 2,7–7,3 раза больше, чем в

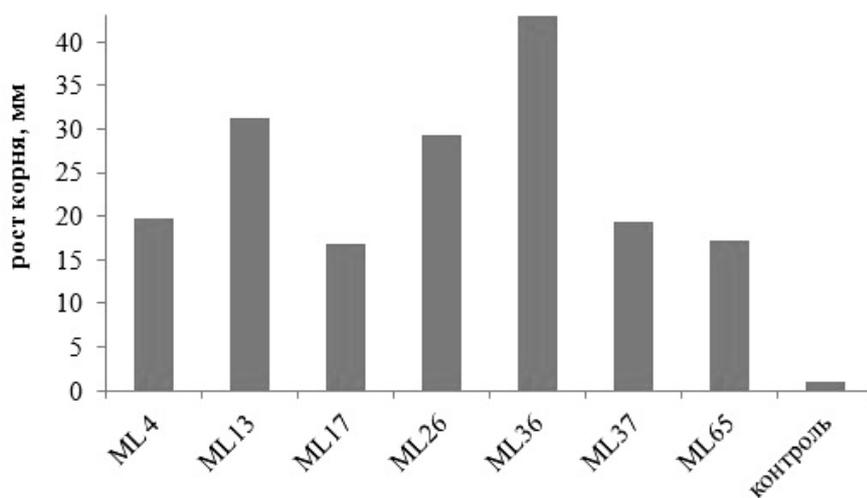


Рис. 1. Влияние обработки бактериями семян на рост корней растений в растворе 1% NaCl

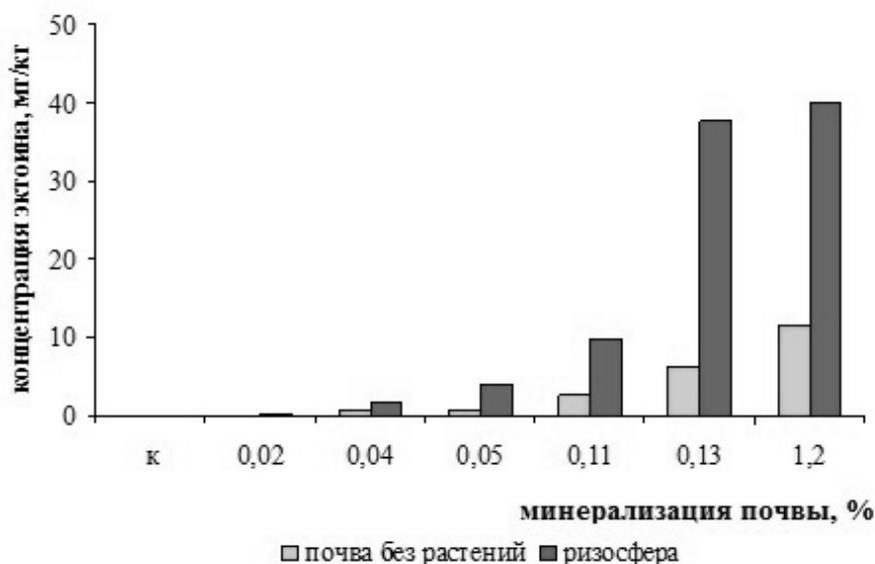


Рис. 2. Концентрация эктоина в ризосфере растений мятлика лугового. к – контрольная почва без засоления

почве без растений.

Влияние эктоина на устойчивость растений к стрессовым факторам (засолению, засухе, низким температурам) было изучено в биотестах, основанных на удлинении корней проростков растений рапса в присутствии в растворе различных концентраций эктоина (от 0 до 1%). Для оценки воздействия эктоина на солеустойчивость растений семена рапса проращивались в растворе 2%-го NaCl, на засухоустойчивость растений – в растворе сахарозы с осмотическим давлением 14 атм (4 молей/л), на холодостойкость – в холодильной камере при температуре 6°C, на морозоустойчивость – выдерживали проросшие семена с длиной корней 1 мм в морозильной камере при температуре –20°C в течение 5 мин [10].

Добавление эктоина в раствор, в котором проращивались семена, снижало негативное влияние на растения изученных стрессовых факторов. Так, у проростков растений, пророщенных в соленом рас-

творе, по сравнению с водой без соли длина корней уменьшалась в 3,4 раза. Внесение эктоина в раствор в количестве 0,001% снижало данный негативный эффект засоления в 1,2 раза, а добавление эктоина в количестве 1% – в 1,7 раза (рис. 3). Внесение эктоина в раствор в количестве 0,001–0,01% увеличивало рост корней на растворе сахарозы в 1,1 раза, а добавление эктоина в количестве 1% – в 3,4 раза. В концентрациях от 0,01% до 1% эктоина в растворе, в котором проращивались растения, приводило к повышению холодостойкости растений, увеличивая рост корней в 1,2 раза. Положительное влияние на морозоустойчивость растений эктоин оказал в концентрациях 0,1 и 1,0%, повышая рост корня по сравнению с необработанными растениями в 1,7 и 2,4 раза соответственно.

Таким образом, на территории Пермского края в ризосфере растений, произрастающих вблизи солеотвалов, были обнаружены уникальные сообщества гало-

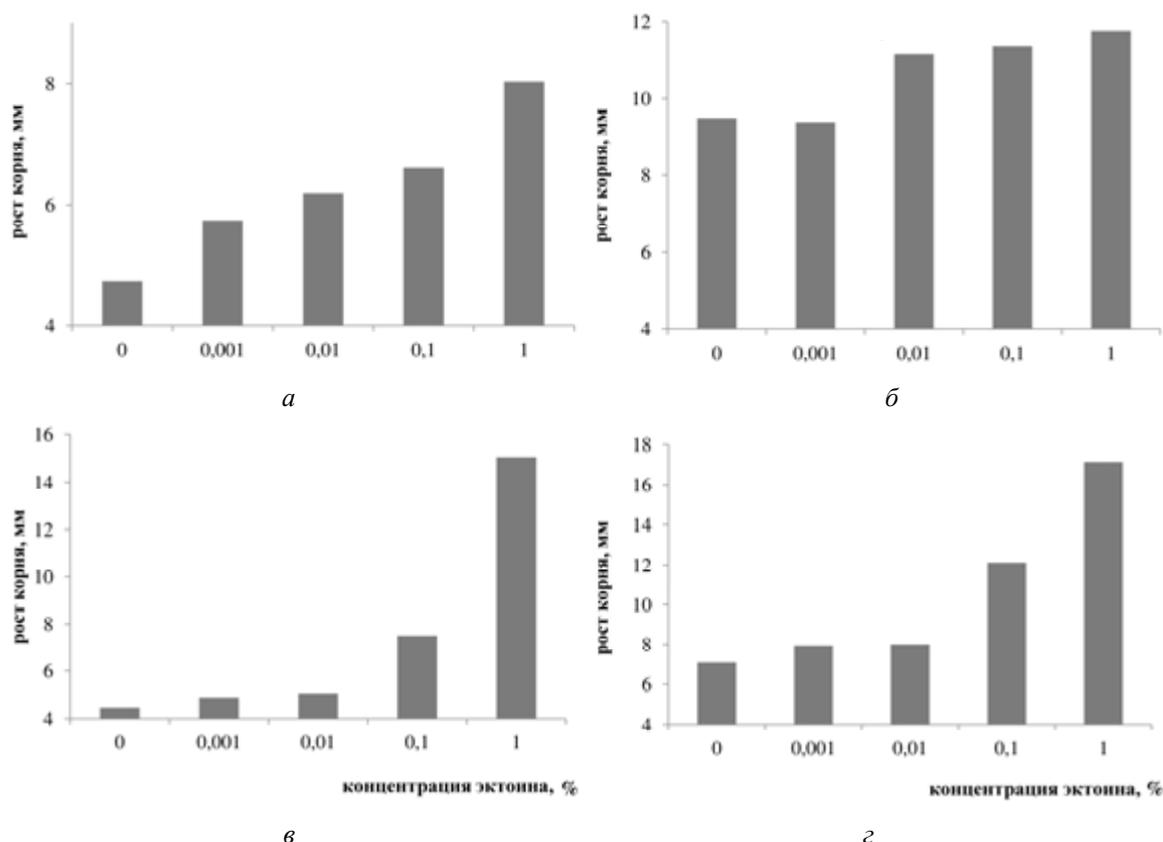


Рис. 3. Влияние эктоина на солеустойчивость (а), засухоустойчивость (б), холодостойкость (в) и морозоустойчивость (г) растений

фильных и галотолерантных бактерий. Данные бактерии могут быть использованы для создания биопрепаратов, улучшающих рост растений в стрессовых условиях. Полученные данные указывают на наличие не изученного ранее механизма положительного влияния ризосферной микрофлоры на растения в условиях засоления вследствие продукции бактериями осмопротекторного соединения – эктоина.

Библиографический список

1. *Лопатовская О.Г., Сугаченко А.А.* Мелиорация почв. Засоленные почвы. – Иркутск: Иркутский гос. ун-т, 2010. – 101 с.
2. *Bharathkumar S., Kumar R., Paul D., Prabavathy V.R., Nair S.* Characterization of the predominant bacterial population of different mangrove rhizosphere soils using 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism (SSCP) // *World Journal Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 24. – P. 387–394.
3. *Castellanos T., Dohrmann A.B., Imfeld G., Baumgarte S., Tebbe C.C.* Search of environmental descriptors to explain the variability of the bacterial diversity from maize rhizospheres across a regional scale // *European Journal of Soil Biology.* – 2009. – Vol. 45. – P. 383–393.
4. *Mapelli F., Marasco R., Rolli E., Barbato M., Cherif H., Guesmi A., Ouzari I., Daffonchio D., Borin S.* Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with *Salicornia* growing in Tunisian hypersaline soils // *Biomed Res Int.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 1–13.
5. *Borruso L., Bacci G., Mengoni A., De Philippis R., Brusetti L.* Rhizosphere effect and salinity competing to shape microbial communities in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud // *FEMS Microbiol Lett.* – 2014. – Vol. 359. – P. 193–200.
6. *Borsodi A.K., Bárány Á., Krett G., Márialigeti K., Szili-Kovács T.* Diversity and ecological tolerance of bacteria isolated from the rhizosphere of halophyton plants living nearby Kiskunság soda ponds, Hungary // *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* – 2015. – Vol. 62. – P. 183–197.
7. *Dimkpa C., Weinand T., Asch F.* Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions // *Plant Cell Environ.* – 2009. – Vol. 32. – P. 1682–1694.
8. *Roberts M.F.* Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms // *Saline Systems.* – 2005. – Vol. 1. – P. 1–30.
9. *Penrose D.M., Glick B.R.* Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria // *Physiol. Plantarum.* – 2003. – Vol. 118. – P. 10–15.
10. *Практикум по физиологии растений / под ред. Н.Н. Третьякова.* – М.: Агропромиздат, 1990. – 271 с.

**STUDY OF MECHANISMS OF MICROBIAL-PLANT SYSTEM
FUNCTIONING UNDER SOIL SALINITY**

A.V. Nazarov, A.A. Pyankova, E.S. Korsakova, E.A. Shestakova, L.N. Anan'ina

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS

Unique halophilic and halotolerant bacteria were found in the rhizosphere of plants growing near the salt dumps in Perm region. These bacteria can be used to create bio preparations that enhance the growth of plants under stressful conditions. The data obtained indicate the presence of not previously studied mechanism of the positive influence of rhizosphere microflora on plants under saline conditions due to the production by bacteria of an osmoprotective substance – ectoine.

Keywords: bacterial communities, rhizosphere, technogenic salinization, osmoprotectant, ectoine.

Сведения об авторах

Назаров Алексей Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: nazarov@iegm.ru

Корсакова Екатерина Сергеевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: camomille-08@mail.ru

Пьянкова Анна Александровна, инженер, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: annpjankva@mail.ru

Шестакова Елена Анатольевна, инженер, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: sheanton@mail.ru

Ананьина Людмила Николаевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: ludaananyina@mail.ru

Материал поступил в редакцию 21.10.2016 г.