

УДК 579.64:631.531.027:631.418.8

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЗАЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ

О.В. КОЛЕСНИКОВ, Т.П. ТИМОХИНА

(Кафедра микробиологии и иммунологии РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева)

Установлено, что бактерии *Klebsiella planticola* могут колонизировать растения, причем на загрязненной ксенобиотиками почве данный процесс идет активнее. Отмечено, что инокуляция растений ослабляет негативное воздействие, вызванное загрязнением почвы тяжелыми металлами, что выражается в увеличении проективного покрытия, а также массы корней и листьев. Показано, что инокуляция замачиванием семян в бактериальной суспензии менее эффективна, нежели инокуляция путем полива всходов.

Ключевые слова: *Klebsiella planticola*, биопрепарат биоплант-К, инокуляция, газонные травы, ксенобиотики, тяжелые металлы, протекторное действие.

Тяжелые металлы являются одним из приоритетных загрязнителей окружающей среды. Биохимическая активность тяжелых металлов, как правило, велика. Некоторые из них играют значительную роль в метаболизме, являясь важными микроэлементами для животных и растений (Fe, Cu, Co, Mo и т.д.). Однако потребность организма в большинстве из них весьма невелика и выражается, как правило, микрограммами, а в количестве больше необходимого они становятся токсичны [3]. Их опасность также усугубляется способностью накапливаться в организмах и концентрироваться в цепях питания [7].

Особенно интенсивно тяжелые металлы выбрасываются в окружающую среду в районах с развитой промышленностью и в крупных городах. Это делает весьма актуальной тему защиты от их токсического действия городских зеленых насаждений, принимающих на себя первый удар загрязнения от автотранспорта и в определенной мере защищающих людей от многих негативных факторов. Решением данной задачи может стать как выведение сортов, устойчивых к загрязнению, так и использование микробных биопрепаратов.

Некоторые ассоциативные бактерии способны заметно улучшать состояние растений на почвах, подвергшихся загрязнению тяжелыми металлами. За счет выделяемых ими ростовых веществ они ускоряют развитие растений [8] и усиливают поглощение ими нутриентов (N, P, K и т.д.). Кроме того, бактерии могут иммобилизовать ионы тяжелых металлов и препятствовать их накоплению в клетках растений [2, 9]. В частности, подобный эффект был описан для бактерии *Klebsiella planticola*, использованной впоследствии для создания биопрепарата биоплант-К.

В связи с этим для изучения развития растений на фоне загрязнения ксенобиотиками и влияния на него инокуляции микроорганизмами в 2008–2010 г. было проведено два вегетационных опыта с различными видами овсяницы (*Festuca*).

Методика

В первом вегетационном опыте использовался новый сорт овсяницы овечьей (*Festuca ovina*) Золушка, а также смесь трех видов овсяницы: овсяницы красной (*F. rubra*) — 33%, овсяницы красной жесткой (*F. rubra commutata*) — 33% и овсяницы овечьей (*F. ovina*) — 34%. Во втором опыте использовалась только овсяница овечья сорта Золушка.

В обоих опытах инокуляцию проводили штаммом *Klebsiella planticola* ТСХА 91, являющимся основой микробного биопрепарата биоплант-К.

Для загрязнения субстрата в первом опыте использовали смесь солей тяжелых металлов ($ZnSO_4$, $CuSO_4$, $PbCO_3$) соответственно в количествах, на 1 кг грунта 2300 мг Zn, 300 мг Cu и 3200 мг Pb, что в 100 раз превосходит предельно допустимую концентрацию этих металлов в почве. Во втором опыте использовали смесь солей тех же тяжелых металлов ($PbCO_3$ был заменен на $Pb(CH_3COOH)_2$) и фосфорорганический инсектицид фуфанон (карбофос, малатион) в количестве 200 мг/кг грунта, что также в 100 раз превосходит его ПДК.

В первом опыте использовали 3 типа грунта: речной песок, дерново-подзолистая почва и низинный торф. Исследуемые растения высевали на каждый тип субстрата по следующей схеме (повторность шестикратная): 1 — почва без ксенобиотиков + растения без инокуляции; 2 — почва без ксенобиотиков + инокулированные растения; 3 — загрязненная почва + растения без инокуляции; 4 — загрязненная почва + инокулированные растения.

Инокуляцию производили путем замачивания семян непосредственно перед высевом в суспензии суточной культуры *K. planticola* на среде K_2 , разведенной стерильным физраствором в соотношении 1:50 в течение 30 мин.

Через 20 и 40 дней и 9 мес. после закладки опыта проводили биометрическое и микробиологическое исследования: измеряли длину листьев и проективное покрытие [1], после чего растения извлекали из грунта и их корни и листья исследовали на содержание в них микроорганизмов.

Для этого корни и листья тщательно промывали, а их поверхность дезинфицировали раствором гипохлорита натрия для уничтожения эпифитных микроорганизмов. После этого их растирали в ступке и разбавляли стерильным физраствором. Разведения полученного материала высевали на среду LB с ампициллином (200 мкг/мл) и полужидкую среду Федорова-Калининской с сахарозой для определения численности ассоциированных с корнями микроорганизмов [5].

Во втором опыте использовали только дерново-подзолистую почву, два типа ксенобиотиков и 2 способа инокуляции: инокуляцию замачиванием семян, как и в первом опыте, и инокуляцию путем полива после появления первых проростков. Таким образом, всего было 9 вариантов (каждый в шести повторностях).

Через 40 дней после закладки опыта проведено микробиологическое и биометрическое исследование: измерены проективное покрытие и длина листьев. После

Т а б л и ц а 1

Схема опыта 2

Ксенобиотик	Без инокуляции (БИ)	Инокуляция семян (ИС)	Инокуляция поливом (ИП)
Без ксенобиотика (БК)	БИ+БК	ИС+БК	ИП+БК
Тяжелые металлы (ТМ)	БИ+ТМ	ИС+ТМ	ИП+ТМ
Инсектицид (И)	БИ+И	ИС+И	ИП+И

этого растения были извлечены из почвы, листья и корни тщательно отмыты, отделены, взвешены и исследованы на содержание микроорганизмов по той же методике, что и в первом опыте.

Результаты и их обсуждение

Микробиологическое исследование корней и листьев растений в первом опыте показало, что клебсиеллы способны мигрировать из ризосферы в ткани корней и листьев. На 20-й день они выселяются из корней, но отсутствуют в листьях. На 40-й день микроорганизмы начинают обнаруживаться и в листьях, однако их численность в корнях несколько уменьшается. Этот процесс активнее происходит на грунтах, загрязненных ксенобиотиками или неблагоприятных для развития микроорганизмов субстратах (песок) (рис. 1).

Во втором опыте были получены сходные данные (табл. 2). Загрязнение почвы также усиливало миграцию микроорганизмов в ткани растений. При этом в случае с загрязнением тяжелым металлом данный эффект оказался более выражен.

Инокуляция также оказала заметное воздействие на развитие растений, что подтвердили биометрические исследования как в первом, так и во втором опыте. На рисунке 2 представлены данные, полученные во втором опыте на 9-й месяц культивирования. У инокулированных растений заметно увеличилось проективное покрытие за счет большего количества листьев у одного растения и выживших растений. При этом данный эффект проявляется в основном на загрязненных грунтах, на незагрязненных субстратах инокуляция микроорганизмами может в некоторых случаях

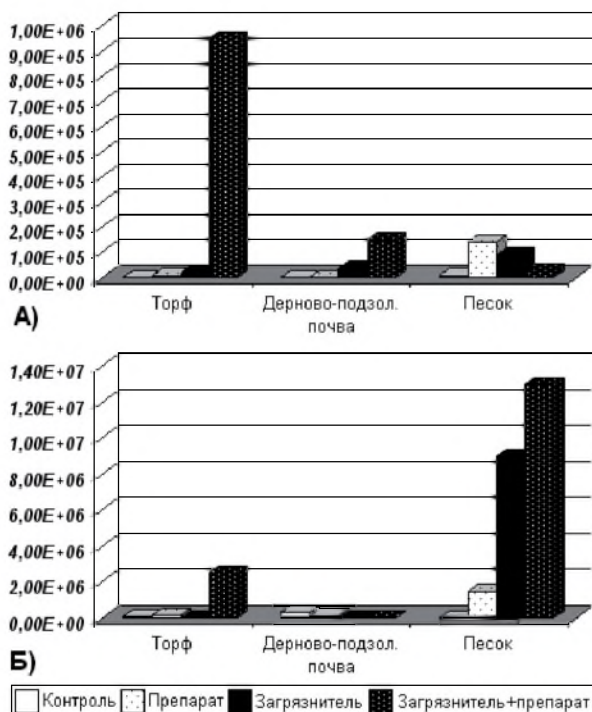


Рис. 1. Влияние ксенобиотиков и различных типов грунта на распределение интродуцированной популяции *K. planticola* в вегетативных органах овсяницы (КОЕ/грамм): А — листья, Б — корни

Таблица 2
Влияние загрязнения на количество интродуцированных микроорганизмов в корнях и листьях (опыт 2), КОЕ/г биомассы

Способ инокуляции	Без ксенобиотика		Тяж. металлы		Инсектицид	
	листья	корни	листья	корни	листья	корни
Без инокуляции	$7,3 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$9,5 \times 10^6$
Замачиванием семян	$5,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$3,8 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$8,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^7$
Поливом	$1,2 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$1,4 \times 10^6$	$7,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^3$	$2,5 \times 10^7$

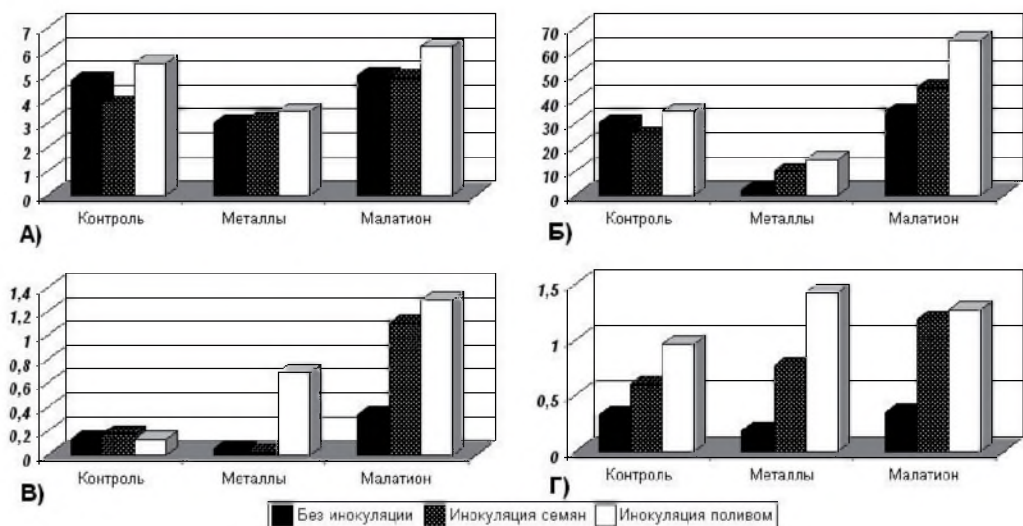


Рис. 2. Воздействие различных методов инокуляции и загрязнения ксенобиотиками на биометрические показатели овсяницы сорта Золушка (опыт 2): А — средняя длина листьев (см); Б — проективное покрытие (%); В — биомасса листьев; Г — биомасса корней

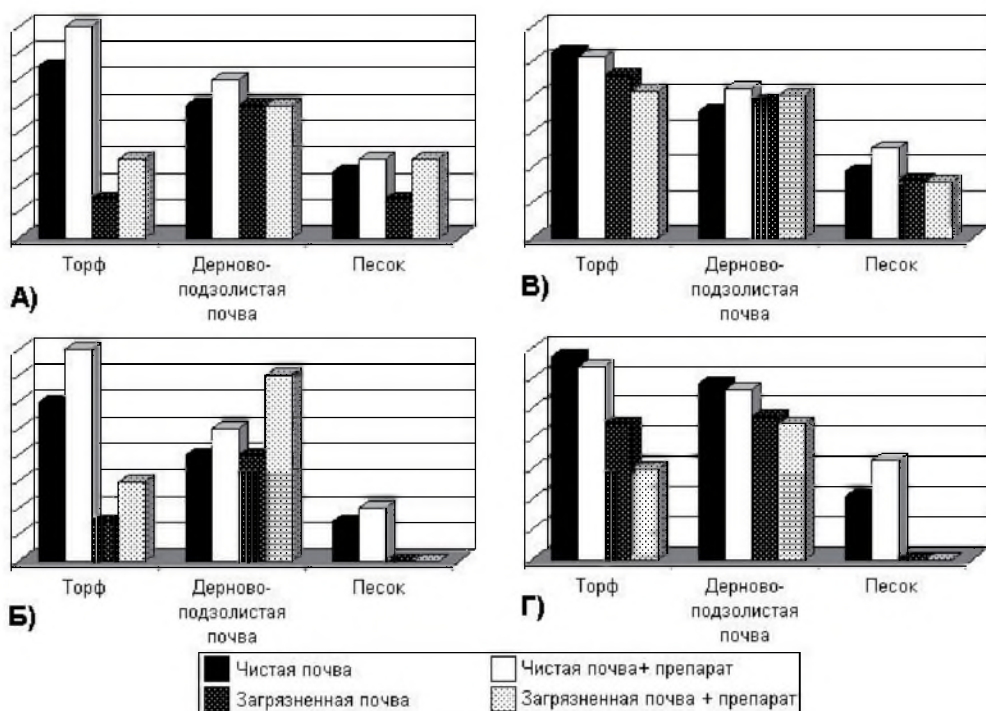


Рис. 3. Влияние типа грунта, наличия ксенобиотика и инокуляции *K. planticola* на развитие растений овсяницы: А — длина листьев, травосмесь (см); Б — проективное покрытие, травосмесь (%); В — длина листьев, сорт Золушка (см); Г — проективное покрытие, сорт Золушка (%)

даже уменьшать проективное покрытие. Она также незначительно влияет на длину листьев, иногда в сторону ее снижения.

Результаты второго опыта согласуются с приведенными выше данными (рис. 3). Инокуляция оказывает заметное положительное воздействие на биометрические параметры растений, во всяком случае, на загрязненной почве. Заметно увеличивается проективное покрытие и биомасса листьев, несколько увеличивается длина. Кроме того, существенно возрастает длина и биомасса корней, особенно в вариантах с ксенобиотиком. Стоит также отметить, что результаты, полученные при инокуляции поливом, оказались заметно лучше, чем при инокуляции замачиванием семян.

Выявлено, что растения, выросшие на почве, загрязненной фуфаномом, развиты даже лучше, чем контрольные, на незагрязненной почве. Вероятно, это объясняется тем, что фосфорорганические соединения оказывают стимулирующее воздействие на рост злаков [4]. Бактеризация также положительно влияет на биометрические показатели растений, растущих на почве, загрязненной фуфаномом.

Выводы

1. Бактерии *K. planticola*, внесенные в почву, загрязненную смесью солей Cu, Zn и Pb, активно колонизируют растения. При этом на незагрязненной почве этот процесс значительно менее интенсивен (в некоторых вариантах численность ниже на два порядка). Вероятно, это связано с тем, что в условиях загрязнения основной среды обитания (ризопланы) бактерии меняют экологическую нишу и начинают активно заселять ткани растений.

2. Бактерии *K. planticola*, мигрирующие в растения, заселяют как корни, так и листья. При этом на 20-й день они обнаруживаются только в корнях, на 40-й — и в корнях, и в листьях.

3. Инокуляция растений овсяницы бактериями *K. planticola* снижает негативные эффекты, вызванные загрязнением почвы тяжелыми металлами, увеличивает биомассу листьев, особенно корней (более чем в 5 раз), а также проективное покрытие (с 2 до 15%). Более ярко этот эффект проявляется при бактеризации поливом: проективное покрытие по сравнению с инокуляцией семян увеличивается с 10 до 15% (в 1,5 раза), длина листьев — на 13%, биомасса корней — в 2 раза.

Библиографический список

1. Воронов А.Г. Геоботаника. М.: Высшая школа, 1969.
2. Емцев В.Т., Голубкина Н.А., Соколова А.Я., Донцов Н.В., Богданова А.И. Способ снижения накопления кадмия растениями. Патент на изобретение № 2295241.
3. Каплин В.Г. Основы экотоксикологии. М.: КолосС, 2006.
4. Матвеева Н.Ю. Эколого-физиологические аспекты воздействия фосфорорганических ксенобиотиков на яровую пшеницу и кукурузу: Автореф. канд. дис. Саратов, 2006.
5. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976.
6. Селицкая О.В., Самохин Л.В., Блинков Е.А. Влияние засухи и низких положительных температур на взаимодействие ассоциативных бактерий с растениями огурца // Известия ТСХА. Вып. 4. С. 129–132.
7. Юрин В.М. Основы ксенобиологии: учебное пособие. Минск, БГУ, 2001.
8. Dodd I.C., Belimov A.A. Rhizobacterial impacts on plant water use efficiency // Aspects of Applied Biology. 105 (2010).
9. Safronova V.I., Stepanok V.V., Engqvist G.L., Alekseyev Yu.V., Belimov A.A. Root-associated bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase improve growth and nutrient uptake by pea genotypes cultivated in cadmium supplemented soil // Biology and Fertility of Soils, 42 (2006). P. 267–272.

Рецензент — д. б. н. И.И. Васенёв

SUMMARY

It has been discovered that the bacteria *Klebsiella planticola* can colonize plants, and on contaminated soil by xenobiotics the process is more active. It has been established that inoculation of plants reduces the negative impact, caused by soil contamination with heavy metals, resulting in projective cover increase, as well as the mass of roots and leaves. It's been stressed that inoculation of seed soaking in bacterial suspensions is less efficient than inoculation by watering seedlings.

Key words: *Klebsiella planticola*, biopreparation Bioplant K, inoculation, lawn grasses, xenobiotics, heavy metals, protective effect.

Колесников Олег Васильевич — асп. кафедры микробиологии и иммунологии РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. (499) 976-09-66. Эл. почта: comp1313@mail.ru

Тимохина Татьяна Петровна — Эл. почта: tatiana-timohina@mail.ru