

УДК 631.46:579.64:574.34:574.38

ОСОБЕННОСТИ КОЛОНИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ ИНТРОДУЦИРОВАННОЙ ПОПУЛЯЦИЕЙ *KLEBSIELLA PLANTICOLA* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ

О.В. СЕЛИЦКАЯ, В.Т. ЕМЦЕВ, А.Я. СОКОЛОВА, О.В. КОЛЕСНИКОВ

(РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева)

Klebsiella planticola штамм ТСХА-91 — эндофитная бактерия, являющаяся основой биопрепарата биоплант. В условиях полевых, вегетационных и лабораторных экспериментов установлено, что при различных способах инокуляции *Klebsiella planticola* колонизирует не только ризоплану, но и филлосферу и сохраняется на высоком уровне численности в течение всего вегетационного периода. Исследованы некоторые аспекты изменения численности *Klebsiella planticola* и их миграции в ткани растения в условиях засоления почвы и в присутствии солей тяжелых металлов.

Ключевые слова: бактеризация, колонизация, ризоплана, филлосфера, засоление почвы, тяжелые металлы.

В результате многолетних исследований на кафедре микробиологии и иммунологии и в лаборатории микробиологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева был получен ряд перспективных штаммов ризобактерий, среди которых наибольшую эффективность показал штамм ТСХА-91 *Klebsiella planticola*. На основе этого штамма был создан биопрепарат биоплант, который показал высокую эффективность в различных эколого-географических условиях как в нашей стране, так и за рубежом и дал гарантированную прибавку урожая сельскохозяйственных культур на 20-25% [1, 4]. Однако широкое применение микробных земледобрильных препаратов в практике сельского хозяйства сдерживается нестабильностью положительного эффекта во времени. Известно, что численность популяции микроорганизмов является важнейшим критерием их активности и статуса в биоценозе. Эффективность инокуляции определяется способностью бактерий к колонизации растений. Исследование динамики численности интродуцированной популяции бактерий после инокуляции растений позволяет раскрыть особенности взаимодействия растения и микроорганизма [2, 13].

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлись бактерии рода *Klebsiella* (*Raonltella*) семейства *Enterobacteriaceae*. *Klebsiella planticola* штамм ТСХА-91 Amp²¹¹¹¹ и *Klebsiella planticola* штамм ТСХА-91 Rif¹¹¹ получены из коллекции кафедры микробиологии и иммунологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Для изучения колонизирующей способности и инвазивности *K. planticola* штамм ТСХА-91 Rif²⁰⁰ в качестве тест-культур использовали ячмень сорта Зазерский-85 и овес посевной. Для исследования особенностей колонизации *Klebsiella* газонных трав по фону засоления почвы были использованы райграс пастбищный сорта Дуэт и овсяница красная сорта Татьяна; а по фону загрязнения почвы тяжелыми металлами — травосмесь из овсяницы красной и овсяницы овечьей.

Исследования проводили в условиях полевых, вегетационных и лабораторных опытов. Для культивирования *K. planticola* использовали жидкие среды LB [10], Федорова — Калининской и К₂ [1]. Отбор образцов почвенного и растительного материала для изучения выживаемости *K. planticola* проводили путем выборки растений с корневой системой и прилегающей к корням почвой методом рендомизации с каждой повторности варианта [3]. Для анализа ризосферы и ризопланы использовали метод последовательных отмываний корней [11]. Для анализа филлосферы листья срезали стерильными ножницами, разрезали и размалывали в стерильной ступке, готовили ряд разведений, одновременно определяли содержание сухой массы листьев. Для устранения эпифитной микрофлоры (только в опыте с тяжелыми металлами) листья обрабатывали 25%-м раствором гипохлорита натрия (моющее средство «Белизна»), разведенного с водой в соотношении 1:3, в течение 3 мин, затем тщательно промывали под проточной водой.

Численность бактерий определяли методом посева на среду LB с добавлением 200 мкг/мл рифампицина и амипициллина для выделения соответственно *Klebsiella planticola* штамм ТСХА-91 Rif²⁰⁰ и *Klebsiella planticola* штамм ТСХА-91 Amp²⁰⁰. Выделенные бактерии были идентифицированы с помощью экспресс-метода выделения плазмидной ДНК клебсиелл с последующим электрофорезом и методом ПЦР с помощью праймера PAR-C1 на базе Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева.

Результаты и их обсуждение

Для изучения приживаемости корневого ассоциативного диазотрофа *K. planticola* штамм ТСХА-91 Rif²⁰⁰ на листьях и стеблях после нанесения бактериальной культуры на поверхность растений в условиях полевой станции РГАУ-МСХА был заложен мелкоделяночный опыт с ячменем сорта Зазерский 85. Почва участка — дерново-подзолистая среднесуглинистая. Растения в фазе цветения — начала плодоношения были опрысканы суточной культурой бактерий с титром 10⁹ КОЕ/мл, разведенной водой в 50 раз. Установлено, что в течение первых суток численность внесенных бактерий на листьях и стеблях значительно снижается по сравнению с титром внесения почти на два порядка, но через трое суток было отмечено постепенное возрастание численности *K. planticola*.

Необходимо отметить, что на протяжении этого периода наблюдений вначале стояла жаркая, засушливая погода, а затем выпали обильные осадки, т. е. было выявлено, что бактерии не только не смывались с листьев, но и размножались в данных условиях. Это позволило предположить, что бактерии *K. planticola* штамм ТСХА-91 Rif²⁰⁰ способны проникать во внутренние ткани листьев.

Для подтверждения того, что внесенная в филлосферу растений популяция микроорганизмов сохраняется и приживается, а также для более подробного изучения стратегии поведения инокулянта в филлоплане, в полевом опыте были проведены наблюдения за динамикой численности интродуцированной популяции при разных

способах инокуляции растений ячменя (табл. 1). Опыт был заложен на станции защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева. Для инокуляции семян их замачивали в суспензии клеток суточной культуры с титром 10^8 — 10^9 КОЕ/мл, в разведении 1:50 в течение часа. Инокуляция филлосферы осуществлялась путем опрыскивания ячменя вручную в фазе всходов суточной культурой с титром 10^8 — 10^9 КОЕ/мл, разведенной водой в соотношении 1:5.

Таблица 1

Динамика численности *K. planticola* штамм ТСХА-91 Rif²⁰⁰ в филлосфере и ризоплане ячменя в зависимости от способа инокуляции, КОЕ/г сухой массы

Вариант инокуляции	Время после инокуляции филлосферы, сут.	Численность в филлосфере	Численность в ризоплане
Инокуляция семян	1	Не обнаружено	...
	5	Не обнаружено	$4,0 \cdot 10^0$
	17	$3,0 \cdot 10^2$	Не обнаружено
	37	$5,0 \cdot 10^3$	Не обнаружено
	57	Не обнаружено	Не обнаружено
Инокуляция филлосферы	1	$5,0 \cdot 10^4$...
	5	$1,0 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^2$
	17	$4,0 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^3$
	37	$7,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^2$
	57	Не обнаружено	$2,0 \cdot 10^3$
Совместная инокуляция (инокуляция семян + инокуляция филлосферы)	1	$5,6 \cdot 10^4$...
	5	$1,2 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^3$
	17	$4,0 \cdot 10^2$	$5,0 \cdot 10^3$
	37	$6,0 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^3$
	57	Не обнаружено	$1,0 \cdot 10^3$

Установлено, что *K. planticola* хорошо приживалась на корнях и листьях ячменя, причем можно говорить о связи между способом инокуляции и численностью микроорганизмов (см. табл. 1). Так, совместная обработка обеспечила численность клеток в ризоплане на стабильном уровне ($5,0 \cdot 10^3$ КОЕ/г) в течение вегетации растений, которая несколько понизилась ко времени уборки ($1,0 \cdot 10^3$ КОЕ/г). Было также выявлено, что при поверхностной бактеризации филлосферы интродуцируемые микроорганизмы способны мигрировать на поверхность корней растений, колонизировать их и приживаться на уровне численности $2,0 \cdot 10^0$ — $2,0 \cdot 10^3$ КОЕ/г в течение всей последующей вегетации. На следующий год был заложен опыт с аналогичной

схемой, однако для обработки семян также использовали суточную культуру бактерий с тем же титром, но сократили время замачивания семян до 30 мин, а для обработки филлосферы использовали разведение 1:50. Экспериментальные данные подтвердили результаты, полученные ранее, о способности бактерий *K. planticola* приживаться не только в ризосфере, но и в филлосфере растений и сохраняться там в течение всей вегетации, вплоть до уборки, на достаточно высоком (для эпифитных микроорганизмов) уровне численности — 10^3 — 10^4 КОЕ/г сухих листьев. В то же время отмечена способность *K. planticola*, нанесенных на филлосферу, быстро колонизировать корни (в течение суток) также на высоком уровне численности — 10^4 КОЕ/г сухих корней. Интересно то, что колебания численности *K. planticola* по вариантам в филлосфере практически не зависят от способа инокуляции растений.

При изучении колонизирующей способности штамма было выявлено присутствие бактерий *K. planticola* штамм ТСХА-91 на корнях и в почве ризосферы как растений, опрысканных культурой по всходам, так и на листьях тех растений, у которых были обработаны семена перед посевом. Одним из возможных объяснений этого факта может являться способность *Klebsiella* проникать во внутренние ткани растений и колонизировать растение изнутри. В литературе последних лет встречается много данных об обнаружении diazотрофных бактерий-эндифитов в тканях различных органов растений и даже в семенах [2, 13]. Эти факты позволили нам предположить, что и бактерии *K. planticola* можно также отнести к эндифитам [12].

Для доказательства проникновения *K. planticola* штамм ТСХА-91 в ткани растений через неповрежденную корневую систему и возможности миграции этих бактерий внутри растения был проведен лабораторный опыт в стерильных условиях на базе Института эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи. Стерилизованные семена овса проращивали в пробирках на стерильной среде, приготовленной из почвенной вытяжки. На 7-й день выращивания растений в питательную среду шприцем вносили суспензию суточной культуры бактерий *K. planticola* штамм ТСХА-91 Rif²⁰⁰, избегая контакта с корнями. Затем на 1, 3, 5 и 7-е сут. после инфицирования субстрата растения срезали стерильными ножницами, растирали в стерильных ступках, заливали стерильной водой 1:10 и высевали на плотную питательную среду с рифампицином 200 мкг/мл. Выделенные из растительного материала бактерии были идентифицированы не только по признаку рифампицинустойчивости и по фенотипическим характеристикам, но и с помощью экспресс-метода выделения плазмидной ДНК клебсиелл с последующим электрофорезом.

Выявлена инвазионная способность *K. planticola* штамм ТСХА-91 Rif²⁰⁰ по отношению к молодым растениям овса и установлен факт его проникновения в ткани растения через корневую систему и миграции в надземные органы растения — листья и стебли (табл. 2).

По-видимому, можно считать, что изучаемые бактерии проявляют свойства эндифитов. Это позволяет предположить, что взаимоотношения растений с вносимым при инокуляции штаммом не ограничиваются ассоциативным взаимодействием, но являются более специфичными и тесными. Таким образом, установлено, что ассоциативные diaзотрофные бактерии *K. planticola* штамм ТСХА-91 обладают свойством инвазивности и проникают во внутренние ткани растений, а также способны к миграции в двух направлениях: от корней к листьям и от листьев к корням.

Как известно, стрессовые факторы негативно влияют как на растения, так и на бактерии. В то же время инокуляция ризосферными бактериями может снижать отрицательное воздействие на растения таких неблагоприятных условий, как засо-

**Выделение ДНК плазмид *K. planticola* штамма ТСХА-91 Rif²⁰⁰ в органах овса
(стерильный опыт в лабораторных условиях)**

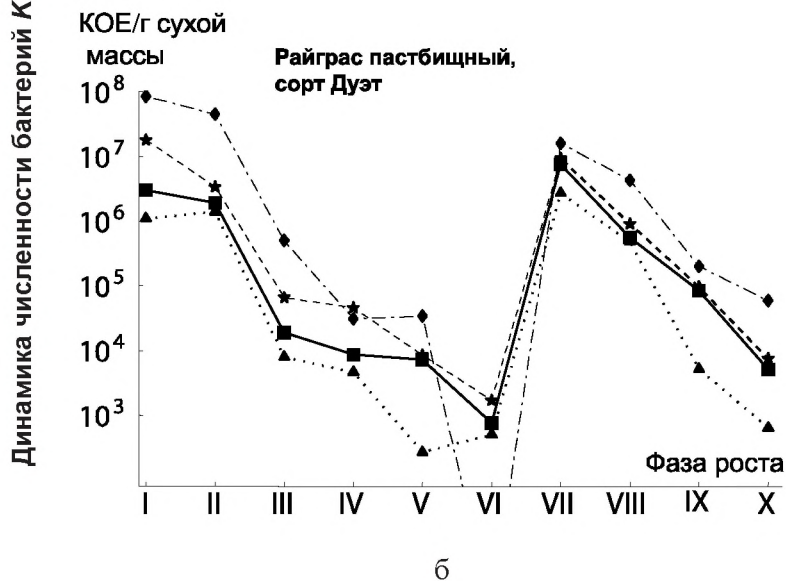
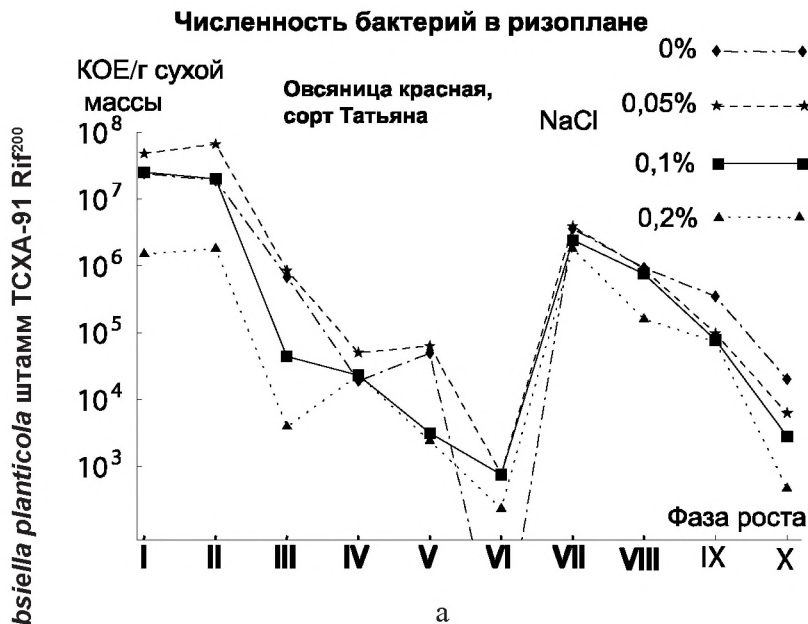
Органы растений	Обнаружение ДНК плазмид <i>Klebsiella planticola</i>			
	сроки наблюдений, сут.			
	1	3	5	7
Листья и стебли	Не обнаружено	Не обнаружено	Обнаружено	Обнаружено
Корни	Обнаружено	Обнаружено	Обнаружено	Обнаружено

ление почвы и загрязнение ее тяжелыми металлами [2, 6, 7, 8, 9, 13]. Небезинтересно определить, как засоление почвы и загрязнение ее тяжелыми металлами влияют на поведение эндофитов при колонизации растений. Для изучения влияния засоления был поставлен вегетационный опыт и проведено искусственное засоление почвы (чернозем обыкновенный, Курская обл.) различными концентрациями хлорида натрия. Хлорид натрия вносили в почву в концентрации 0,05-0, 1-0,2% к массе почвы. Через 14 дней после набивки сосудов проводили посев газонных трав. Перед посевом в вариантах опыта с инокуляцией семена в течение 30 мин замачивали в суточной культуре *K. planticola* штамм ТСХА-91 Rif²⁰⁰, выращенной на жидкой питательной среде LB и разведенной водой 1:50. Титр исходной культуры 10⁹ КОЕ/мл. Для вариантов без инокуляции бактериями семена на 30 мин помещали в воду. Опыт продолжался в течение двух сезонов. Пробы почвы и растений отбирали на 14-е сут. после инокуляции, а затем по фазам развития растений. Для прохождения зимнего периода в полевых условиях сосуды с газонными травами были установлены в траншею на уровне земли, чтобы температура почвы в сосудах и слой снежного покрова были одинаковыми с полевыми условиями [5].

Установлено, что приживаемость *K. planticola* в ризоплане овсяницы красной и райграса пастбищного была высокой, независимо от концентрации хлорида натрия (см. рисунок).

Так, численность *K. planticola* в ризоплане растений хотя и уменьшилась в течение вегетации с 10⁶-10⁷ КОЕ/г корней (фаза первого листа) до 10²-10⁴ КОЕ/г корней (конец сезона) в вариантах с дозами хлорида натрия 0,05-0,1% к массе почвы, но оставалась достаточно высокой. Однако внесение хлорида натрия 0,2% к массе почвы оказывало подавляющий эффект на размножение данных бактерий в ризоплане газонных трав. Так, численность *K. planticola* в этих вариантах в 10-100 раз ниже, чем в контроле.

Интересным представляется тот факт, что после прохождения зимнего периода хранения сосудов в полевых условиях *K. planticola* сохранила свою жизнеспособность в ризоплане газонных трав только в вариантах с засолением. Численность данного микроорганизма после прохождения зимнего периода в ризоплане газонных трав на засоленной почве составила 10²-10³ КОЕ/г корней. Явление сохранения популяции *K. planticola* после прохождения зимнего периода при отрицательных температурах почвы в условиях засоления наблюдается впервые. Этот факт можно объяснить тем, что *K. planticola* является эндофитной ризобактерией и, возможно, что при действии отрицательных температур хлорид натрия в почве оказывал на бактери-



Динамика численности бактерий *K. planticola* штамм ТСХА-91 Rif²⁰⁰ в ризоплане газонных трав по фону засоления почвы различными концентрациями NaCl (вегетационный опыт): а — овсяница красная, сорт Татьяна; б — райграс пастбищный, сорт Дуэт. Сроки наблюдений: первый лист (I), второй лист (II), третий лист (III), кушение (IV), окончание периода вегетации (V), после прохождения зимнего периода (VI), инокуляция растений *K. planticola* (VII), колошение (VIII), цветение (IX), созревание (X). Концентрация NaCl указана в процентах по отношению к массе почвы

альную клетку *K. planticola* определенный протекторный эффект, препятствующей кристаллизации воды.

Для изучения воздействия загрязнения грунта тяжелыми металлами на колонизацию растений бактериями *K. planticola* была проведена серия вегетационных опытов с газонными травами. В качестве субстрата использовали низинный торф, который был загрязнен смесью солей тяжелых металлов CoCl_2 , CuSO_4 , PbCO_3 из расчета превышения ПДК в 100 раз для каждого.

Инокуляцию проводили путем замачивания семян непосредственно перед высевом в суспензии суточной культуры *K. planticola* на среде K_2 , разведенной стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:50 в течение 30 мин. Для точного определения наличия *K. planticola* в корнях растений в третьем опыте был использован метод ПЦР. При этом разведения растертых корней овсяницы красной высевались на среду LB с ампициллином, после чего колонии, имеющие признаки, характерные для *K. planticola*, исследовались методом ПЦР с помощью праймера PAR-C1. В результате было подтверждено, что данные колонии образованы бактериями *K. planticola*.

Известно, что тяжелые металлы негативно влияют на рост и развитие растений и микроорганизмов. Однако в нашем эксперименте исследование образцов, отобранных на 20-й день, показало, что в варианте с инокуляцией и загрязнением тяжелыми металлами в ризоплане овсяницы были обнаружены бактерии *K. planticola*, численность которых составила $1,5 \cdot 10^4$ КОЕ/г сухого вещества, что незначительно ниже, чем в варианте с инокуляцией без загрязнения (табл. 3).

Таблица 3

Влияние загрязнения почвы CoCl_2 , CuSO_4 , PbCO_3 на распределение интродуцированной популяции *K. planticola* штамм ТСХА-91 Amp^R в корнях и листьях растений овсяницы, КОЕ/г сухого вещества

Вариант	20 дней		40 дней	
	ризоплана	филлосфера	ризоплана	филлосфера
Контроль	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
Бактеризация	$2,2 \cdot 10^4$	Не обнаружено	Не обнаружено	$5,5 \cdot 10^3$
Тяжелые металлы	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
Бактеризация + ТМ	$1,5 \cdot 10^4$	Не обнаружено	Не обнаружено	$1,0 \cdot 10^3$

Полученные результаты свидетельствуют об устойчивости данного штамма бактерий к содержанию солей Co , Cu , Pb в почве в количестве, превышающем ПДК в 100 раз. В филлосфере овсяницы на 20-й день после инокуляции семян *K. planticola* не была выявлена. Однако посев, который был проведен на 40-й день, показал, что интродуцированные микроорганизмы мигрировали в филлосферу (стебли и листья),

а в ризоплане *K. planticola* в этот срок не была обнаружена. Таким образом, в процессе онтогенеза растений наблюдается миграция бактерий *K. planticola* из прикорневой зоны в филлосферу овсяницы. При содержании в почве свинца, меди и кобальта в размерах, превышающих ПДК в 100 раз, миграция также имеет место, но в меньшей степени.

Заключение

Полученный фактический экспериментальный материал выявил, что бактерии способны колонизировать как поверхность растений, так и проникать внутрь корней, стеблей и листьев. Представленные данные показывают, что растения и микроорганизмы являются единым целым, обеспечивающим жизнедеятельность партнеров благодаря симбиотическим взаимоотношениям, что дает им возможность более эффективно противостоять стрессовым факторам окружающей среды, повышая способность видов к выживанию.

Библиографический список

1. Ассоциативный симбиоз и его роль в продуктивности сельскохозяйственных растений / В.Т. Емцев [и др.] // Тимирязев и биологическая наука: сб. науч. тр. (к 150-летию со дня рождения К.А. Тимирязева). М., 1994. С.106-119.
2. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов/ А.И. Шапошников [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2001. №3. С. 16-22.
3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
4. Емцев В. Т. Ассоциативный симбиоз почвенных diazotrophic бактерий и овощных культур//Почвоведение. 1994. №4. С.74-84.
5. Журбицкий З.П. Теория и практика вегетационного метода. М.: Наука, 1968. 244 с.
6. Использование ассоциативных бактерий для инокуляции ячменя в условиях загрязнения почвы свинцом и кадмием / А.А. Белимов [и др.] // Микробиология. 2004. Т. 73. №1. С. 118-125.
7. Колесников О.В., Тимохина Т.П. Влияние бактериализации на устойчивость растений к тяжелым металлам//Известия ТСХА. 2011. Вып. 4. С. 24-29.
8. Лапыгина Е.В., Лысак Л.В. Изменение структуры бактериального комплекса почвы под влиянием насыщенных растворов минеральных солей. Перспективы развития почвенной биологии: тр. Всерос. конф. М.: МАКСПресс, 2001. С. 273-278.
9. Лапыгина Е.В., Лысак Л.В., Звягинцев Д.Г. Устойчивость комплекса почвенных бактерий к солевому шоку // Микробиология. 2002. Т.71. №2. С. 171-175.
10. Миллер Д.Х. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 436 с.
11. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями. М.: Наука, 2005. 262 с.
12. Селицкая О.В., Самохин Л. В., Блинков Е.А. Влияние засухи и низких положительных температур на взаимодействие ассоциативных бактерий с растением огурца // Известия ТСХА. 2009. Вып. 4. С. 129-132.
13. Тихонович П.Л., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего. СПб.: изд-во Санкт-Петербургского ун-та, 2009. 210 с.
14. Isolation and partial characterization of endophytic diazotrophs associated with japanese sugarcane cultivar/ C.A. Jr. Asis [et al.] // Soil Sci. Nutr. 2000. Vol. 46. № 3. P. 759-765.

THE FEATURES OF COLONIZATION OF PLANTS BY INTRODUCED
POPULATION OF *KLEBSIELLA PLANTICOLA* WHEN SUBJECTED TO
STRESS FACTORS

O.V. SELITSKAYA, V.T. EMTSEV, A.Y. SOKOLOVA, O.V. KOLESNIKOV

(Russian State Agrarian University — K.A. Timiryazev MAA)

Klebsiella planticola TSHA-91 is a strain of endophytic bacterium which is used as the basis of a biological product — bioplant. During the field, pot and laboratory experiments having been inoculated in different ways *Klebsiella planticola* was revealed to colonize not only the rhizoplane, but also the phyllosphere and, moreover, the bacterial abundance remained at a high level throughout the growing season. Some aspects concerning the fluctuations of *Klebsiella planticola* number and its migration into plant tissues under the conditions of soil salinization and the presence of salts containing heavy metals were investigated.

Key words: colonization, rhizoplane, bacterization of rhizoplane, phyllosphere, soil salinization, heavy metals.

Селицкая Ольга Валентиновна — к. б. н., заведующая кафедрой микробиологии и иммунологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-09-66; e-mail: selitskayaolga@gmail.com).

Емцев Всеволод Тихонович — д. б. н., проф. кафедры микробиологии и иммунологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: (499) 976-09-66; e-mail: mbiol@timacsl.ru.

Соколова Анна Ярославна — аспирант кафедры микробиологии и иммунологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: (499) 976-09-66; e-mail: mbiolf@timacsl.ru.

Колесников Олег Васильевич — к. б. н., ассистент кафедры микробиологии и иммунологии РГАУ-МСХА имени К. А.Тимирязева. Тел.: (499) 976-09-66; e-mail: compl313@mail.ru.