

БАКТЕРИИ РОДА *PSEUDOMONAS*: ПОТЕЦИАЛ В НИВЕЛИРОВАНИИ ГЕРБИЦИДНОГО СТРЕССА РАСТЕНИЙ

С.П. Четвериков

Уфимский Институт биологии Уфимского ФИЦ РАН, Уфа, Россия

При возделывании сельскохозяйственных угодий традиционно большое внимание уделяется борьбе с засоренностью посевов. Наряду с предпосевной обработкой почвы и севооборотами химические гербициды служат основным методом борьбы с нежелательной растительностью. По объемам применения они лидируют среди других средств защиты растений [Aktar et al., 2009]. Настолько широкое и интенсивное использование провоцирует распространение устойчивых к ним сорных растений, что в свою очередь побуждает сельхозпроизводителей увеличивать дозы и сочетать одновременно несколько действующих веществ для одной обработки [Zargar et al., 2019]. Повышение дозы гербицидов для подавления многолетних и стойких сорняков может также угнетать культурные растения и приводить к накоплению гербицидов в почве. Сложившееся положение, очевидно, сохранится до появления следующего поколения препаратов, ориентированных на новые мишени в растительных клетках.

Анализ механизмов взаимодействия культурных растений с почвенными микроорганизмами – одна из задач сельскохозяйственной биологии. Благоприятное влияние на растение микробных препаратов, как правило, бывает обусловлено наличием у бактерии набора полезных свойств, таких как способность к азотфиксации, растворению фосфатов, синтезу фитогормонов, антимикробных соединений [Sraepen et al., 2009; Bakaeva et al., 2017], конкуренции за питательные вещества и места колонизации с патогенами [Kloerper et al., 2004]. Интересным представляется изучение взаимодействий растений и микробиоты в условиях стресса, вызванного неблагоприятными факторами среды. По литературным данным, именно на фоне стресса обработка посевов ростстимулирующими бактериями (plant growth promoting bacteria – PGPB) оказывается наиболее эффективной [Rubin et al., 2017]. И большая часть PGPB представлена бактериями рода *Pseudomonas*.

Поэтому актуальным становится поиск средств для уменьшения гербицидного стресса у сельскохозяйственных культур. Возможность использования для этого специализированных штаммов микроорганизмов стала рассматриваться лишь недавно и отражена в немногочисленных публикациях. Сообщается об антистрессовом действии на фоне отдельных гербицидов штаммов *Rhizobium* sp. MRL3 [Ahmad, Khan, 2010], *Pseudomonas putida* [Bourahla et al., 2018], *Azotobacter salinestris* KF470807 [Chennappa et al., 2018].

Цель работы – оценка устойчивости к гербицидам разной химической структуры способствующих росту растений бактерий из коллекции УИБ УФИЦ РАН и из коммерческих биопрепаратов, скрининг новых устойчивых микроорганизмов и определение их потенциала в нивелировании гербицидного стресса растений.

Объектами исследования служили культуры микроорганизмов, выделенные из сельскохозяйственных и антропогенно нарушенных почв, а также бактерии из коллекции УИБ УФИЦ РАН, обладающие фунгицидной и ростстимулирующей активностью, в том числе запатентованные в качестве основы для биопрепаратов «Азолен», «Елена», «Азопол» (*Pseudomonas koreensis* ИБ 4, *P. chlorographis* ИБ 51, *Paenibacillus* sp. ИБ 1), а также штаммы бактерий из коммерческих биопрепаратов «Псевдобактерин-2», «Планриз», «Фитоспорин» (*P. aureofaciens* BS 1393, *P. fluorescens* AP-33, *Bacillus subtilis* 26Д).

При скрининге использовали два методических подхода: посев на микробиологические среды непосредственно из свежесобранной почвы и создание накопительных культур на основе почвенных образцов, обогащенных гербицидами, из которых через месяц инкубации при температуре 28°C проводили микробиологический посев на селективные питательные среды. В качестве основы для сред использовали минеральную среду Раймонда [Raymond, 1961] с добавлением в качестве селективных агентов гербицидов Октапон экстра (2,5 г/л), Флоракс (2,5 г/л), Дикамба (1 г/л), Наномет (1 г/л), Спецназ (1 г/л) или Чисталан (2,5 г/л).

Перечисленные препараты представляют собой используемые на посевах пшеницы селективные гербициды на основе 2,4 – дихлорфеноксиуксусной кислоты, 2-этилгексилового эфира 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, (2,6-дифторфенил)-8-фтор-5 метокси-1,2,4-триазоло [1,5-с] пиримидин-2-сульфонамида, 3,6-дихлор-2-метоксибензойной кислоты, метсульфурон-метила, трибенурон-метила. Концентрации гербицидов в среде были выбраны исходя из концентрации их рабочего раствора согласно рекомендациям производителей.

Антагонизм к фитопатогенам определяли методом совместного выращивания бактерий и грибов в чашках Петри [Chetverikov, Loginov, 2009]. Тестировали на следующих мицелиальных грибах: *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (= *Helminthosporium sativum* Pam., King et Bakke), *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc. BKM F-844, *F. gibbosum* Appel et Wollenw BKM F-848, *F. graminearum* Schwabe BKM F-1668, *F. solani* (Mart) Sacc. BKM F-142, *F. oxysporum* Schltdl BKM F-137, *F. nivale* (Fr.) Ces. Ex Sacc. BKM F-3106, *F. semitectum* BKM F – 1938, *F. avenaceum* BKM F – 132, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. BKM F-3047, *Rhizoctonia solani* J.G. Kuehn BKM F-895.

Для определения нитрогеназной активности применялся ацетиленовый метод, как описано [Коршунова et al., 2013]. Способность штамма к синтезу ИУК определяли с применением метода иммуноферментного анализа [Bakaeva et al, 2020]. Солюбилизацию фосфатов оценивали по образованию прозрачных зон вокруг бактериальных колоний на среде Пиковской [Pikovskaya, 1948].

Большой интерес представляет поиск деструкторов гербицидов и устойчивых бактерий среди уже используемых в сельскохозяйственной практике биопестицидов и биоудобрений и запатентованных микроорганизмов.

Среди коллекционных штаммов устойчивость к присутствию гербицидов была распространена не очень широко. К Октапону экстра были устойчивы 32 протестированные культуры, к Флораксу – 31. В растворе Чисталана сохраняли жизнеспособность лишь 8 штаммов бактерий. Гербицид Наномет почти не проявлял токсичности по отношению к бактериям, что, возможно, обусловлено гораздо более низкой концентрацией его рабочего раствора по сравнению с рабочими растворами гербицидов на основе 2,4 – Д.

Результаты тестирования бактерий на устойчивость к гербицидам показали некоторую родовую специфичность по данному признаку. Большая доля устойчивых штаммов была характерна для представителей рода *Pseudomonas* (рисунок).

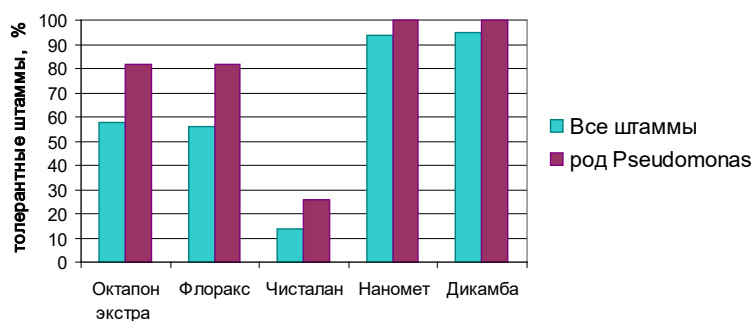


Рис. Родоспецифичность коллекционных штаммов по устойчивости к разным классам гербицидов

В табл. 1 представлены штаммы бактерий, способных к росту на средах с гербицидами в качестве единственного источника углерода. Взятые для исследования гербициды существенно отличались по своей способности служить питательным субстратом для микроорганизмов. Из протестированных микробных штаммов одиннадцать росли на минимальной среде с гербицидом Октапон экстра. Чуть меньше бактерий могло использовать как источник питания гербициды Флоракс (8 штаммов) и Дикамба (9 штаммов). На средах с Октапоном, Флораксом и Дикамбой визуальное наиболее активное развитие показали штаммы *P. plecoglossicida* 2,4 – Д, *P. putida* ИБ 53а, *P. koreensis* ИБ 4. Способность данных микроорганизмов к использованию как Флоракса, так и Октапона экстра, очевидно, является следствием присутствия в составе обоих гербицидов 2,4 – дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4 – Д). Штамм *P. plecoglossicida* 2,4 – Д уже был ранее описан в качестве эффективного деструктора хлор- и фторорганических соединений [Chetverikov et al., 2017]. Общие черты в структуре молекул 2,4 – Д и 3,6 – дихлор-2-метоксибензойной кислоты (Дикамба) объясняют наличие бактериальных культур, растущих на микробиологических средах с обоими веществами.

В табл. 1 представлены штаммы бактерий, способных к росту на средах с гербицидами в качестве единственного источника углерода. Взятые для исследования гербициды существенно отличались по своей способности служить питательным субстратом для микроорганизмов. Из протестированных микробных штаммов одиннадцать росли на минимальной среде с гербицидом Октапон экстра. Чуть меньше

На среде с гербицидом Наномет, значительно отличающимся по химической структуре от 2,4 – Д и Дикамбы, активно формировали колонии только 2 штамма бактерий *P. koreensis* ИБ 4 и *Paenibacillus* sp. ИБ 1. Способностью к росту на среде с Чисталаном отличался только штамм *P. koreensis* ИБ 4.

Таким образом, устойчивостью ко всем группам исследуемых гербицидов отличался только штамм *P. koreensis* ИБ 4 – основа коммерческого биоудобрения «Азолен».

При скрининге новых штаммов микроорганизмов предпочтение было отдано деструкторам гербицидов как имеющим большую практическую значимость. Поскольку желательным является сокращение периода персистенции гербицидов в почве и ускорение их естественного разрушения, способность биопрепаратов к использованию гербицидов как источника питания может сделать их более ценными и конкурентоспособными.

Штаммы бактерий, устойчивых к воздействию гербицидов выделяли из 178 образцов почвы, отобранных на территории сельскохозяйственных угодий и промышленных предприятий Республики Башкортостан (Россия), промышленных площадок в Республике Коми (Россия), культивируемых почв Турецкой Республики. Были выделены 14 новых штаммов микроорганизмов, способных расти на минеральной среде с гербицидами как питательным веществом. После изучения их свойств из них были отобраны 11 штаммов (табл. 2). Критериями отбора служило наличие агрономически ценных характеристик, устойчивость к гербицидам и способность расти, используя разные гербициды как источник питания. Все отобранные штаммы были способны использовать для роста гербициды Октапон экстра, Спецназ и Дикамба. Способность к разложению гербицидов Наномет и Флоракс была распространена меньше. На среде с Нанометом росли 9 из отобранных штаммов, на среде с Флораксом – 10. К использованию Чисталана как источника питания были способны лишь 7 штаммов. При тестировании новых штаммов на устойчивость в баковых смесях было установлено, что наиболее токсичным из испытанных для бактерий являлся гербицид Чисталан (табл. 2). В его присутствии в рабочей концентрации выживали только 9 штаммов бактерий. По-видимому, токсичностью Чисталана обусловлена и меньшая вероятность выделения его деструкторов. В присутствии других гербицидов все отобранные штаммы сохраняли свою жизнеспособность.

Наиболее перспективными в рамках исследуемой проблемы по совокупности способностей представлялись изоляты **DA1.2, 6CH2, CH5 % 2**, которые были идентифицированы как *Pseudomonas protegens*, *P. avallanae* и *P. plecoglossicida*, соответственно. Их агрономически ценные характеристики RGPB представлены в таблицах 3 и 4.

Все три новых штамма обладали способностью к синтезу ауксинов, также были способны к фиксации атмосферного азота и солюбилизации фосфатов. Как известно, синтез фитогормонов, в частности, ауксинов, не только способствует стимуляции развития корневой системы растений и позволяет ускоренно проходить чувствительные к патогенам стадии своего развития, но и помогает в борьбе с дефицитом воды и другими стрессами растений.

Таблица 1. – Способность бактерий к росту в среде с гербицидами в качестве единственного источника углерода и энергии

Культура микроорганизмов	Гербициды					
	Октапон экстра	Флоракс	Наномет	Спецназ	Дикамба	Чисталан
<i>Bacillus subtilis</i> 26Д	–	–	–	–	+	–
<i>Paenibacillus</i> sp. IB 1	++	++	++	+	–	–
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> IB 6	+	+	–	–	+	–
<i>P. aureofaciens</i> BS 1393	+	–	–	–	+	–
<i>P. chlororaphis</i> IB 51	++	–	–	–	–	–
<i>P. fluorescens</i> AP-33	+	–	–	–	++	–
<i>P. japonica</i> IB 17	+	+	–	–	++	–
<i>P. koreensis</i> IB 4	++	++	++	+	++	+
<i>P. plecoglossicida</i> 2,4 – D	++	++	+	+	++	–
<i>P. putida</i> IB 53a	++	++	–	–	++	–
<i>P. rhizosphaerae</i> IB 56	+	+	++	+	++	–
<i>Pseudomonas</i> sp. IB 182	+	++	–	–	+	–
Примечание: «++» – активный рост; «+» – слабый рост; «–» – нет роста						

Таблица 2. – Способность новых изолятов к росту в среде с гербицидами в качестве единственного источника углерода и энергии

Изолят	Гербициды					
	Дикамба	Октапон экстра	Наномет	Флоракс	Чисталан	Спецназ
CH.3.1	-	++	-	+	-	+
12N1	++	++	++	++	-	+
CH5 % 1	+	++	+	++	+	+
CH5 % 2	++	++	++	+	+	+
6CH1	++	++	-	++	+	+
6CH2	++	+	++	+	++	+
5N1	++	++	++	++	-	+
ДД4	+	+	+	-	+	+
DA1.2	++	++	++	++	++	+
Н.ж.	++	++	++	++	++	+
Некр.5	++	++	+	++	-	++

Примечание: ++ активный рост, + слабый рост, – отсутствие роста

Таблица 3. – Свойства потенциальных бактериальных антистрессантов

Штамм	Нитрогеназная активность, нмоль C ₂ H ₄ •ч ⁻¹ •мл ⁻¹	Синтез ауксинов, нг/мл	Солюбилизация фосфатов
P. plecoglossicida CH5 % 2	20,7	323±16	+
P. avallanae 6CH2	19,8	169±8	+
P. protegens DA1.2	20,8	870±44	+

Таблица 4. – Спектр антагонистической активности потенциальных бактериальных антистрессантов

Фитопатогенные микромицеты	Диаметр зоны ингибирования роста гриба, мм		
	P. plecoglossicida CH5 % 2	P. avallanae 6CH2	P. protegens DA1.2
F. culmorum BKM F – 844	12,0±1,5	12,0±1,5	39,8±2,2
F. gibbosum BKM F – 848	10,8±1,0	16,8±2,0	32,0±2,5
F. graminearum BKM F – 1668	15,2±1,2	14,6±1,4	30,2±2,2
F. nivale BKM F – 3106	10,6±0,5	10,4±0,5	22,4±2,0
F. semitectum BKM F – 1938	14,8±1,3	14,2±1,2	32,5±3,2
F. solani BKM F – 142	≤5,0	16,2±1,5	36,0±3,5
F. avenaceum BKM F – 132	18,2±1,6	20,6±2,2	35,5±3,2
F. oxysporum BKM F-137	14,4±1,3	14,4±1,3	33,4±3,5
Bipolaris sorokiniana (Sacc.) Shoemaker	19,8±1,3	≤5,0	40,0±2,4
Alternaria alternate BKM F-3047	12,0±1,3	≤5,0	34,9±3,0
Rhizoctonia solani BKM F-895	≤5,0	≤5,0	37,5±3,8

Изучение фунгицидных свойств штаммов показало их способность к антагонизму фитопатогенов. По величине активности они находятся на уровне штаммов псевдомонад, изученных нами ранее (Asabina et al., 2009), но в отличие от них устойчивы и способны расти в средах в присутствии гербицидов на основе малолетучих эфиров 2,4 – Д и сульфонилмочевины.

Таким образом, по совокупности представленных выше характеристик штаммы P. protegens DA1.2, P. avallanae 6CH2 и P. plecoglossicida CH5 % 2 наряду со штаммом P. koreensis ИБ 4 – основой коммерческого биоудобрения «Азолен», можно рекомендовать для создания биопрепаратов со свойствами биофунгицида и биоудобрения, и использования в качестве бактериальных антистрессантов по нивелированию гербицидного стресса в классических баковых смесях с гербицидами.

*Исследование выполнено в рамках Гос. задания Минобрнауки России
№ 075–00326–19–00 по теме № АААА-А19–119021390081–1.*

ЛИТЕРАТУРА

- Коршунова Т.Ю., Четвериков С.П., Мухаматдырова С.Р., Логинов О.Н. Окислительная и нитрогеназная активность бактерии *Ohrbactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 // Известия Самарского научного центра РАН. 2013. Т.15, № 3(5). 1637–1640.
- Ahemad M., Khan M.S. Growth promotion and protection of lentil (*Lens esculenta*) against herbicide stress by *Rhizobium* species // Ann. Microbiol. 2010. V. 60. P. 735–745.
- Aktar W., Sengupta, D., Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards // Interdisc. Toxicol. 2009. V. 2. № 1. P. 1–12.
- Asabina E.A., Chetverikov S.P., Loginov O.N. Optimization of biosynthesis of phytopathogen growth inhibitors by bacteria of *Pseudomonas* genus // Biotechnology in Russia. 2009. № 3. С. 81–89.
- Bakaeva M., Chetverikov S., Korshunova T., Loginov O. The new bacterial strain *Paenibacillus* sp. IB-1: A producer of exopolysaccharide and biologically active substances with phytohormonal and antifungal activities // Applied Biochemistry and Microbiology. 2017. V. 53. № 2. P. 201–208.
- Bakaeva M., Kuzina E., Vysotskaya L., Kudoyarova G., Arkhipova T., Rafikova G., Chetverikov S., Korshunova T., Chetverikova D., Loginov O. Capacity of *Pseudomonas* strains to degrade hydrocarbons, produce auxins and maintain plant growth under normal conditions and in the presence of petroleum contaminants // Plants. 2020. V. 9. № 3. Article 379.
- Bourahla M., Djebbar R., Kaci Y., Abrous-Belbachir O. Alleviation of bleaching herbicide toxicity by PGPR strain isolated from wheat rhizosphere Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie Tom. XXV, Issue: 2, 2018, pp. 74–83.
- Chennappa G., Sreenivasa M.Y., Nagaraja H. *Azotobacter salinestris*: A Novel Pesticide-Degrading and Prominent Biocontrol PGPR Bacteria. In: Panpatte D., Jhala Y., Shelat H., Vyas R. (eds) Microorganisms for Green Revolution. Microorganisms for Sustainability, 2018. V. 7. Springer, Singapore/
- Chetverikov S.P., Loginov O.N. New metabolites of *Azotobacter vinelandii* exhibiting antifungal activity // Microbiology. 2009. V. 78. № 4. P. 428–432.
- Chetverikov S.P., Sharipov D.A., Korshunova T.Y., Loginov O.N. Degradation of perfluorooctanyl sulfonate by strain *Pseudomonas plecoglossicida* 2.4-D // Applied Biochemistry and Microbiology. 2017. V. 53. P. 533–538.
- Kloepper J.W., Ryu M., Zhang S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* sp. // Phytopathology. 2004. V. 94. P. 1259–1266.
- Pikovskaya R.I. Mobilization of phosphorous in soil connection with the vital activity of some microbial species. // Microbiologiya. 1948. V. 17. P. 362–370.
- Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // Develop. Industr. Microbiol. 1961. V. 2. № 1. P. 23–32.
- Rubin R.L., van Groenigen K.J., Hungate B.A. Plant growth promoting rhizobacteria are more effective under drought: a meta-analysis // Plant and Soil. 2017. V. 416. P. 309–323.
- Spaepen S., Vanderleyden J., Okon Y. Plant growth promoting actions of rhizobacteria // Advances in Botanical Research. 2009. V. 51. P. 283–320.
- Zargar M., Bayat M., Lyashko M., Chauhan B. Postemergence Herbicide Applications Impact Canada Thistle Control and Spring Wheat Yields // Agronomy journal. 2019. V. 111. P. 2874–2880.