



### Энгельсский район

окр. г. Энгельс, сухой луг в пойме р. Волги, 7.7.1993, Legit Жидяева М. В., Determ Еленевский А. Г.

В Гербарии СГУ имеются сборы (54 листа) всех трех видов семейства *Gentianaceae*, занесенных в Красную книгу Саратовской области. Все виды подтверждены сборами последних 50 лет. Правомерность включения видов в новое

издание Красной книги Саратовской области требует подтверждения результатами экспедиционных исследований.

### Список литературы

1. Красная книга Саратовской области : Грибы. Лишайники. Растения. Животные / Комитет охраны окружающей среды и природопользования Саратов. обл. Саратов : Изд-во Торг.-пром. палаты Саратов. обл., 2006. 528 с.

УДК 504.05:579.262:58.07

## ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* НА СОДЕРЖАНИЕ ПИГМЕНТОВ У ПШЕНИЦЫ ПРИ КАДМИЕВОМ СТРЕССЕ

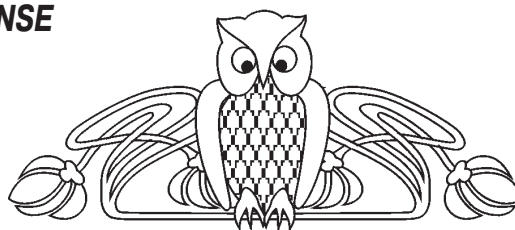
М. М. Железкова<sup>1</sup>, Е. В. Плешакова<sup>1</sup>, Е. В. Любунь<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Саратовский государственный университет

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии растений

и микроорганизмов РАН, Саратов

E-mail: plekat@yandex.ru



Важную роль при устранении токсического действия тяжелых металлов на растения играют почвенные микроорганизмы. Известно, что ризосферные ассоциативные микроорганизмы рода *Azospirillum* активно взаимодействуют с растениями и могут оказывать различные воздействия на их морфологические и биохимические параметры. Проведенными исследованиями установлено, что инокуляция растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) ассоциативными бактериями *Azospirillum brasilense* (штаммы Sp7, SpCd, Sp245, Sp245.5) нивелирует токсичное действие хлорида кадмия на морфогенез растений и приводит к увеличению корневой и надземной биомассы растений. Общее содержание основных фотосинтетических пигментов растения зависит от используемого штамма и может служить косвенным показателем уровня фитостресса, только в сравнении с контролем.

**Ключевые слова:** ростостимулирующие ризобактерии, кадмий, *Azospirillum brasilense*, ассоциативный и эндофитный симбиоз, биоремедиация.

### Effect of Bacteria *Azospirillum brasilense* on Pigment Content in Wheat under Cadmium Stress

М. М. Zhelezkova, E. V. Pleshakova, E. V. Lyubun

Soil microorganisms play an important role in eliminating the phytotoxic effect of heavy metals on plants. It is known that associative rhizospheric microorganisms of the genus *Azospirillum* actively interact with plants and may have different effects on their morphological and biochemical parameters. Our studies have found that inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants with the associative bacteria *Azospirillum brasilense* (strains Sp7, SpCd, Sp245 and Sp245.5) mitigates the toxic effects of cadmium chloride on plant morphogenesis and increases root and aboveground plant biomass. The total content of the major photosynthetic pigments in the plants depends on the strain used and

may serve as an indirect indicator of the level of phytostress only in comparison with the control.

**Key words:** growth-promoting rhizobacteria, cadmium, *Azospirillum brasilense*, associative and endophytic symbiosis, bioremediation.

Формирование симбиозов в агробиоценозах зачастую происходит в условиях различных антропогенных загрязнений. Среди загрязнителей биосферы, представляющих серьезную угрозу для человека и подлежащих контролю при загрязнении почв, тяжелые металлы (ТМ) относятся к числу опаснейших [1]. Загрязнение почвы соединениями ТМ оказывает неблагоприятное влияние как на эффективность симбиоза в целом, так и на различные аспекты жизнедеятельности макро- и микропартнера в отдельности [2]. Кадмий – один из основных загрязнителей почвы среди тяжелых металлов, главным образом, потому, что его техногенное накопление в окружающей среде идет высокими темпами. Замещение цинка кадмием в растительном организме приводит к цинковой недостаточности, что в свою очередь вызывает угнетение и даже гибель растений.

Устойчивые к тяжелым металлам ризосферные бактерии являются основой для разработки нового поколения биопрепаратов, предназначенных для стимуляции роста и защиты растений, а также для биоремедиации загрязненных почв. Почвенные микроорганизмы активно взаимодействуют с растениями и могут оказывать как



положительные, так и отрицательные эффекты на их рост и питание. В настоящее время накоплен большой материал о механизмах положительных воздействий 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 [3].

Продукция ассоциативными микроорганизмами сидерофоров, понижение ими pH и окислительно-восстановительного потенциала в прикорневой зоне интенсифицируют усвоение металлов растениями. Уменьшение выноса металлов и других химических элементов из почвы растениями происходит из-за аккумуляции этих веществ микроорганизмами, сорбции ионов на клеточной стенке, образования нерастворимых соединений. Эти процессы, тем не менее, позволяют снизить распространение загрязнителя в окружающей среде, т.е. повысить эффективность фитостабилизации [4].

Действие микроорганизмов на поступление химических веществ в растения зависит от очень многих факторов: типа загрязнителя и его концентрации в окружающей среде, вида микроорганизмов и растений, входящих в микробно-растительную систему, почвенных условий, взаимодействия микроорганизмов, входящих в симбиоз. Так, было показано, что при инокуляции аккумулялирующей кадмий бактерией *Brevibacillus* sp. растений, выращиваемых при загрязнении почвы Cd, наблюдалось незначительное уменьшение концентрации Cd, а при совместной инокуляции *Glomus mosseae* и *Brevibacillus* sp. происходило более чем четырехкратное уменьшение концентрации кадмия в растениях [5].

Необходимо отметить способность ассоциативных бактерий защищать растения от различных неблагоприятных факторов окружающей среды [6].

Азоспириллы – ризобактерии, стимулирующие рост и развитие растений благодаря своей способности к фиксации атмосферного азота, продукции фитогормонов, контролю фитопатогенов и др. [7]. Ряд представителей рода, в частности *A. brasilense* и *A. lipoferum*, входят в состав биопрепаратов для предпосевной обработки семян. Выявлено влияние динамики генома *A. brasilense* на устойчивость бактерий к ионам кобальта (II), меди (II), серебра (I) и цинка (II) [8]. Эндофитный штамм *Azospirillum brasilense* Sp245 в ассоциации с пшеницей влиял на биодоступность и поглощение мышьяка расте-

нием [9]. При инокуляции растения *Azospirillum lipoferum* частично снижалась токсичность Cd, возможно, за счет улучшения минерального поглощения. Инокуляция увеличивала длину корней и биомассу проростков ячменя, что повышало поступление питательных веществ и обеспечивало некоторую защиту против токсичности Cd [3].

Микроорганизмы *A. brasilense* являются природными симбионтами для ряда растений, а также входят в состав бактериальных препаратов, используемых в растениеводстве, поэтому знание механизмов адаптации азоспирилл к стрессу, вызванному ТМ, важно не только для понимания стратегии выживания бактерий в природных условиях, но и для практического применения.

В ходе работы мы попытались оценить фитотоксичность солей кадмия и их влияние на содержание пигментов группы хлорофилла, а также определить эффект различных штаммов ассоциативной бактерии *Azospirillum brasilense* на преодоление кадмиевого стресса у растений пшеницы.

#### Материалы и методы

В экспериментах были использованы штаммы из коллекции непатогенных микроорганизмов ИБФРМ РАН: *Azospirillum brasilense* Sp7; *Azospirillum brasilense* Sp245; *Azospirillum brasilense* Sp245.5; *Azospirillum brasilense* SpCd. Культивирование микроорганизмов *A. brasilense* осуществляли в жидкой питательной среде в течение 18 ч при температуре 30°C с частотой вращения 100 об/мин. Состав питательной среды был следующим (г/л):  $K_2HPO_4$  – 3,0;  $KH_2PO_4$  – 2,0; яблочная кислота – 1,0;  $NH_4Cl$  – 0,5;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,2; NaCl – 0,1;  $CaCl_2$  – 0,02;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 0,02;  $MnSO_4 \times H_2O$  – 0,01;  $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$  – 0,002. pH среды доводили до 7. Для инокуляции культуру стерильно отмывали от среды, бактерии осаждали центрифугированием (11000 g в течение 3–5 мин). Осадок суспендировали в среде, доводили до концентрации  $3 \times 10^7$  клеток. Трехсуточные проростки пшеницы помещали на 2 ч в суспензию клеток.

В работе использовали пшеницу (*Triticum aestivum* L.) сорта «Саратовская 29». Семена растений были получены из ГНУ НИИСХ Юго-Востока, г. Саратов. Зерновки перед посевом предварительно калибровали, удаляли дефектные, обрабатывали 70%-ным спиртом в течение 5–7 с, а затем отмывали стерильной дистиллированной водой. Далее семена распределяли по 17 штук на чашку Петри, после чего помещали в



термостат на 3 суток при температуре 25°C. Проросшие зерновки инокулировали ризосферными бактериями.

После инокуляции по 10 семян пшеницы помещали в стеклянные сосуды для культивирования растений, каждый вариант в 3-кратной повторности. В качестве питательной среды при выращивании растений пшеницы использовали среду Хохланда [9]. Растения пшеницы выращивали 14 дней в присутствии  $\text{CdCl}_2 \times 2,5\text{H}_2\text{O}$  в концентрации  $[\text{Cd}(\text{II})]$  2,5 г/л и без внесения соли. В качестве контроля использовали варианты культивирования неинокулированной пшеницы в среде Хохланда с хлоридом кадмием и без него. Культивирование растений проводили в контролируемых условиях при температуре 21–25°C, со световым периодом 14/10 ч (день/ночь), интенсивности освещения 8000 люкс.

Морфометрические измерения растений проводили с использованием штангенциркуля. Линейный размер надземной части проростков (в мм) определяли от первого узла кущения до верхушки первого листа. В случае корневой системы измеряли длину всех корешков в корневой системе (в мм), затем определяли средний размер корня для каждого растения. Для анализа сырого и сухого веса растений побеги и корни высушивали при 70°C в течение 7–9 ч до постоянного веса и определяли сухой вес.

Для определения содержания хлорофиллов 20–30 мг навески листьев растирали с кварцевым песком и  $\text{CaCO}_3$  в этиловом спирте, полученный гомогенат центрифугировали при 4000 об/мин в

течение 10 мин, супернатант отбирали, доводили объем вытяжки до 5 мл. Оптическую плотность и максимумы поглощения пигмента регистрировали на спектрофотометре Specord S300 (Carl Zeiss, Германия). Концентрацию хлорофиллов рассчитывали согласно [10].

Полученные результаты подвергали статистической обработке.

### Результаты и их обсуждение

Интегральной характеристикой роста и развития растений является накопление биомассы (и/или урожая). В ходе проведенного эксперимента мы регистрировали морфометрические показатели растений, было выявлено, что во всех вариантах с кадмием, внесенном в питательную среду для выращивания растений, вес сырой биомассы надземной части (НЧ) растения был ниже (на 15–54%), чем в соответствующих образцах без металла. Наибольшая разница наблюдалась в контроле с неинокулированными растениями и в варианте со штаммом *A. brasilense* SpCd, что свидетельствует об ингибирующем воздействии кадмия на пшеницу. В остальных вариантах инокуляция семян пшеницы бактериями уменьшала это ингибирующее влияние (таблица). При инокуляции растений микроорганизмами *A. brasilense* Sp245.5 и *A. brasilense* Sp7 в вариантах с кадмием прирост биомассы НЧ был максимальным. Причем в отсутствии загрязнителя стимулирующим влиянием микроорганизмов на рост биомассы НЧ обладали варианты: *A. brasilense* Sp245.5 и *A. brasilense* SpCd.

**Влияние  $[\text{Cd}(\text{II})]$  и инокуляции штаммами *A. brasilense* на сырой вес корней и надземной части пшеницы**

Штамм <i>A. brasilense</i>	Корни, г		Надземная часть, г	
	–	$[\text{Cd}(\text{II})]$	–	$[\text{Cd}(\text{II})]$
Sp245	1,35±0,32	1,00±0,22	0,95±0,12	0,75±0,12
Sp245.5	1,70±0,35	1,00±0,28	1,20±0,33	0,80±0,15
Sp7	1,70±0,38	1,10±0,18	1,00±0,25	0,85±0,16
SpCd	1,85±0,42	0,80±0,15	1,30±0,22	0,60±0,12
Контроль без бактерий	1,60±0,25	0,70±0,14	0,95±0,15	0,45±0,10

Примечание. Приведен средний вес частей пшеницы с одного сосуда (10 растений) и стандартное отклонение.

Для корневой системы просматриваются тенденции, аналогичные обнаруженным в отношении веса сырой биомассы НЧ. В присутствии кадмия вес сырой биомассы корней был ниже на 26–56%, чем в образцах без него. Небольшая разница в весе корней для растений,

инокулированных *A. brasilense* Sp245, с кадмием и без него, говорит о том, что данный штамм хорошо нивелирует ингибирующее действие хлорида кадмия. Интересно отметить, что в отсутствии загрязнителя стимулирующее влияние на рост корневой системы в большей степени



оказывают другие исследованные бактерии *A. brasilense*.

Известно, что рост корня растений более чувствителен к присутствию в среде тяжелых металлов, чем рост эпикотиля, так как металлы накапливаются в основном в корнях. Полученные результаты показывают, что похожая картина наблюдалась в присутствии хлорида кадмия (рис. 1). Фитотоксичность кадмия отчетливо проявлялась при развитии корневой системы растений в контрольном образце и при инокуляции тремя штаммами: *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* SpCd. Наименьшая разница в длине корня пшеницы, выращенной в присутствии и отсутствии ме-

талла, наблюдалась в варианте при инокуляции *A. brasilense* Sp245.5. У растений, инокулированных данным микроорганизмом, длина корней составляла 6,7 см, что на 41–59% выше, чем в других вариантах. Это свидетельствует о том, что *A. brasilense* Sp245.5 максимально снижает действие кадмия на рост корня. Выделение из клеток корней хелаторов тяжелых металлов, таких как, органические кислоты, аминокислоты, пептиды, фенолы и другие, приводит к связыванию тяжелых металлов и уменьшению их концентрации на наружной поверхности клеток корня, что снижает соответственно их поглощение растениями и фитотоксическое действие [11].

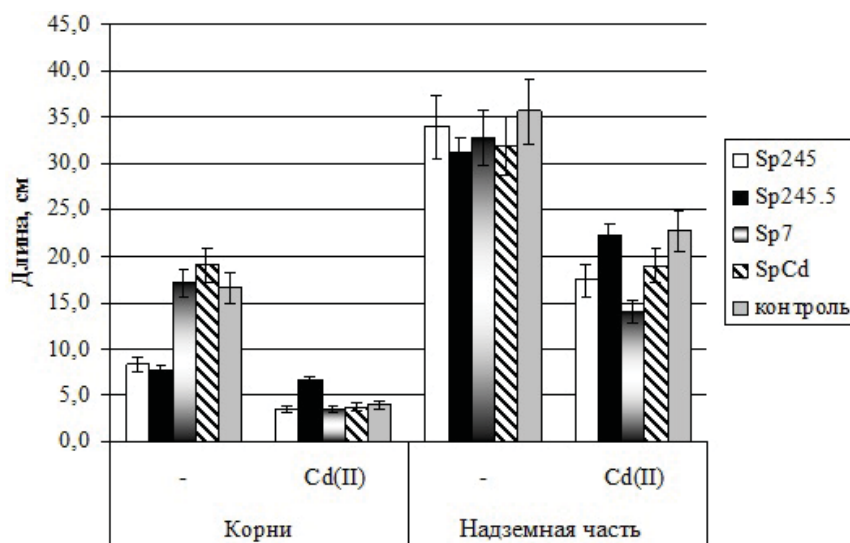


Рис. 1. Влияние [Cd(II)] и инокуляции штаммами *A. brasilense* на длину корневой системы и надземной части пшеницы

Хлорид кадмия ингибировал рост растений пшеницы – длина НЧ снижалась на 30% и более (см. рис. 1). Выявлено, что контрольные неинокулированные растения имеют большую длину НЧ, чем в вариантах с SpCd и Sp245. Сравним по длине НЧ с контролем вариант со штаммом *A. brasilense* Sp245.5, а по сравнению с остальными штаммами длина растений на 3,3–8,3 см больше. Вполне вероятно, что наблюдаемые нами различия положительного влияния на растения использованных для инокуляции штаммов обусловлены численностью обитающих на растении азоспирилл, характеристиками поверхностных полисахаридов бактерий, обладающих биологической активностью, и различными типами колонизации у разных штаммов [12].

Для понимания причин негативного влияния кадмия важно знать, какие физиолого-биохимические изменения он вызывает в различных

частях растения, и, прежде всего, в листе как основном органе фотосинтеза. Фотосинтетический аппарат растений весьма чувствителен к повышенному содержанию металлов в окружающей среде, что проявляется в изменении многих структурно-функциональных параметров фотосинтеза. Изучение влияния кадмия на фотосинтетический аппарат растений пшеницы показало наличие определенных изменений в количестве основных форм пигментов.

В норме соотношение хлорофиллов *a* и *b* находится в следующей форме: хлорофилла *a* – более 50%, хлорофилла *b* – около 30% и каротиноидов – менее 20%. Такое соотношение является оптимальным, поскольку основную работу в составе антенного (светособирающего) комплекса выполняет именно хлорофилл *a*, хлорофилл *b* и каротиноиды выполняют функцию дополнительных и защитных пигментов. Таким образом обе-



спечивается наиболее эффективная работа фотосинтетического аппарата [13, 14]. Как показали полученные нами результаты, при росте в среде без кадмия практически во всех вариантах, кроме *A. brasilense* Sp7, содержание хлорофилла и их соотношение оставалось на уровне контрольного (рис. 2). В случае с *A. brasilense* Sp7 содержание хлорофилла *a* было на 21,7, хлорофилла *b* – на 85,8% больше по сравнению с контрольными

неинкулированными растениями. Незначительное повышение концентрации хлорофиллов *a* и *b* и их соотношения наблюдалось у растений, инокулированных штаммами *A. brasilense* SpCd и *A. brasilense* Sp245. В варианте со штаммом *A. brasilense* Sp245.5 содержание хлорофиллов *a* и *b*, а также их соотношения в среднем было незначительно ниже (на 3,3%) по сравнению с контролем (см. рис. 2).

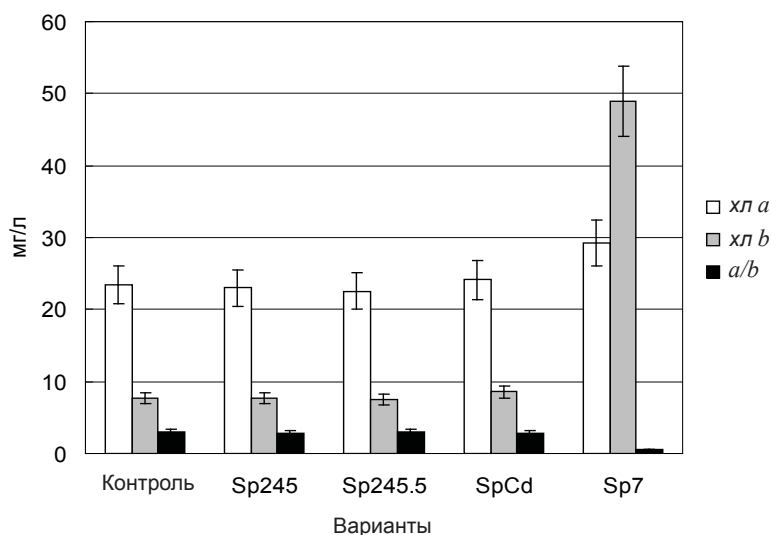


Рис. 2. Влияние инокуляции штаммами *A. brasilense* на содержание хлорофиллов *a*, *b*, соотношения хлорофиллов *a/b*

Считается, что изменение соотношения хлорофиллов *a/b* является адаптивной реакцией ассимиляционного аппарата растений на стрессовое воздействие: при снижении уровня основного фотосинтетического пигмента (хлорофилла *a*) происходит увеличение синтеза вспомогательного пигмента (хлорофилла *b*) [15].

При внесении солей кадмия в среду роста растений и при инокуляции бактериями *A. brasilense* Sp7 отмечается значительное повышение содержания хлорофилла *b* и значительное снижение соотношения *a/b* относительно безмикробного варианта – контроля (рис. 3). Такие результаты говорят о выраженном сочетанном

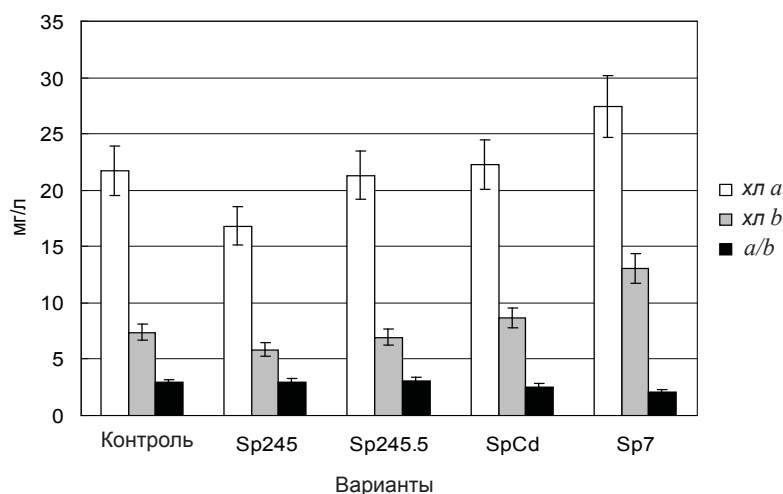


Рис. 3. Влияние [Cd(II)] и инокуляции штаммами *A. brasilense* на содержание хлорофиллов *a*, *b*, соотношения хлорофиллов *a/b*



фитострессе под действием штамма Sp7 и хлорида кадмия. Однако по сравнению с растениями, выросшими на среде без металла, в присутствии солей кадмия уровень содержания хлорофилла *b* падает на 73, а хлорофилла *a* – на 8,1%. Незначительное повышение концентрации хлорофиллов *a* и *b* и их соотношения наблюдалось у растений, инокулированных *A. brasilense* SpCd. У вариантов, инокулированных микроорганизмами *A. brasilense* Sp245, практически не наблюдалось изменений в содержании основных форм пигментов. Инокуляция штаммом *A. brasilense* Sp245.5 незначительно, в пределах погрешности, снижала содержание хлорофилла *a* – на 1,8, хлорофилла *b* – на 6,1, а их соотношения – на 3% по сравнению с контролем.

При сравнении инокулированных вариантов с кадмием и без него мы видим, что в присутствии хлорида кадмия у растений с *A. brasilense* Sp245 содержание хлорофилла *a* снижалось с 23 до 16 мг/л. Главной причиной снижения содержания зеленых пигментов в присутствии кадмия является подавление активности ферментов биосинтеза. Основными точками ингибирования при этом выступают: образование фотоактивного хлорофиллидредуктазного комплекса и синтез  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты [16].

Таким образом, при фитострессе, вызванном ионами кадмия, инокуляция растений пшеницы ассоциативными бактериями *Azospirillum brasilense* улучшает морфогенез растений и приводит к увеличению корневой и надземной биомассы растений (на 40–60% в зависимости от штамма). Общее содержание основных фотосинтетических пигментов растения сильно варьирует в зависимости от используемого штамма и может служить показателем уровня фитостресса только косвенно, в сравнении с контрольными вариантами.

#### Список литературы

1. ГОСТ 17.4.1.02-83 Охрана природы. Почвы. Классификация химических веществ для контроля загрязнения. М. : Гос. комитет СССР по стандартам, 1983.
2. Belimov A. A., Dietz K. -J. Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations // Microbiol. Research. 2000. Vol. 155. P. 113–121.
3. Белимов А. А., Кунакова А. М., Сафронова В. И., Кожемяков А. П., Степанов В. В., Юркин Л. Ю., Алексеев Ю. В. Использование ассоциативных бактерий для инокуляции ячменя в условиях загрязнения почвы свинцом и кадмием // Микробиология. 2004. Т. 73, № 1. С. 118–125.
4. Shenler M., Fan T., Crowley D. Phytosiderophores influence on Cadmium mobilization and uptake by wheat and barley plants // J. Environ. Qual. 2001. Vol. 30. P. 2091–2098.
5. Vivas A., Vörös A., Biró B., Barea J. M., Ruiz-Lozano J. M., Azcón R. Beneficial effects of indigenous Cd-tolerant and Cd-sensitive *Glomus mosseae* associated with a Cd-adapted strain of *Brevibacillus* sp. in improving plant tolerance to Cd contamination // Appl. Soil Ecol. 2003. Vol. 24, № 2. P. 177–186.
6. Burd G. J., Dixon D. G., Glink B. R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol. 64. P. 3663–3668.
7. Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 84. P. 11–18.
8. Shelud'ko A. V., Varshalomidze O. E., Petrova L. P., Katsy E. I. Effect of genomic rearrangement on heavy metal tolerance in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 // Folia Microbiol. 2012. Vol. 57, № 1. P. 5–10.
9. Lyubun Ye. V., Fritzsche A., Chernyshova M. P., Dudel E. G., Fedorov E. E. Arsenic transformation by *Azospirillum brasilense* Sp245 in association with wheat (*Triticum aestivum* L.) roots // Plant and Soil. 2006. Vol. 286. P. 219–227.
10. Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина М. М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. М. : Высш. шк., 1975. 392 с.
11. Morel J. L., Mench M., Guckert A. Measurement of Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots // Biol. Fertil. Soils. 1986. Vol. 2. P. 29–34.
12. Шелудько А. В., Широков А. А., Соколова М. К., Соколов О. И., Петрова Л. П., Матора Л. Ю., Кацы Е. И. Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 696–704.
13. Greger M., Ögren E. Direct and indirect effects of Cd<sup>2+</sup> on photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*) // Physiologia Plantarum. 1991. Vol. 83. P. 129–135.
14. Полевой В. В. Физиология растений. М. : Высш. шк., 1989. 464 с.
15. Николаевский В. С. Экологическая оценка загрязнения среды и состояния наземных экосистем методами фитоиндикации. Пушкино : Мин-во природных ресурсов РФ, 2002. С. 220–225.
16. Stobart A. K., Griffiths W. T., Bukhari I. A., Sherwood R. P. The effect of cadmium on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley // Physiol. Plant. 1985. Vol. 63. P. 293–298.