

## ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ К ПРОДУКЦИИ ИУК И ВЛИЯНИЮ НА РОСТ РАСТЕНИЙ

**Д.М. Юсупова**, магистрант

**Б.Ш. Бареева**, аспирант

**А.Р. Гальперина**, кандидат биологических наук, доцент

**О.Б. Сопрунова**, доктор биологических наук, профессор  
*Астраханский государственный технический университет*

E-mail: di.yusupova0119@mail.ru

**Ключевые слова:** ризосферные микроорганизмы, фитогормоны, индолилуксусная кислота, фитотоксичность, тест-растения, биопрепарат.

**Реферат.** Проведен первичный скрининг способности ризосферных микроорганизмов культурных и дикорастущих растений аридных экосистем Астраханской области к продукции индолилуксусной кислоты (ИУК) и проявлению фитотоксических свойств. Количество синтезированной ИУК определяли фотометрическим методом, фитотоксичность культуральной жидкости микроорганизмов оценивали на семенах редиса красного круглого *Raphanus sativus L. convar. radicula*. Выявлено, что все изоляты обладают способностью к триптофаниндуцируемому синтезу ИУК. При этом из 50 исследуемых изолятов 19 синтезируют ИУК на уровне промышленно применяемых продуцентов – от 80 мкг/мл и выше. Оценка влияния культуральной жидкости микроорганизмов на рост и развитие семян редиса выявила полное ингибирование развития корневой системы и проростков для всех изолятов. Среди исследуемых изолятов 16 полностью подавляли развитие семян тест-растения. Всхожесть семян при использовании суспензии остальных изолятов колебалась от 7,1 до 63,3 %. В эксперименте установлено, что с увеличением количества синтезируемой изолятами ИУК возрастали и проявления фитотоксичности. Влияние экзогенного ауксина на развитие растений может давать как положительные, так и отрицательные эффекты. Оптимальный диапазон концентраций ИУК для конкретного растения может быть чрезвычайно узким, и сдвиг концентрации в любую сторону может привести к угнетающим эффектам. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования возможности биотехнологического применения выделенных изолятов с повышенной продукцией ИУК как промышленных продуцентов этого вещества или как основы биологического препарата по стимуляции роста растений.

## STUDY OF THE ABILITY OF RHIZOSPHERE MICROORGANISMS TO PRODUCE IAA AND THEIR INFLUENCE ON PLANT GROWTH

**D.M. Yusupova**, Master's Student

**B.Sh. Bareeva**, PhD Student

**A.R. Galperina**, PhD in Biological Sciences, Associate Professor

**O.B. Soprunova**, Doctor of Biological Sciences, Professor

*Astrakhan State Technical University*

**Keywords:** rhizosphere microorganisms, phytohormones, indoleacetic acid, phytotoxicity, test plants, bio-preparation.

**Abstract.** A primary screening was conducted to assess the ability of rhizosphere microorganisms from cultivated and wild plants of arid ecosystems in the Astrakhan region to produce indoleacetic acid (IAA) and exhibit phytotoxic properties. The amount of synthesised IAA was determined using a photometric method, and

*the phytotoxicity of microbial culture liquid was evaluated on seeds of red round radish *Raphanus sativus* L. convar. radicula. It was found that all isolates had the ability for tryptophan-induced IAA synthesis. Out of the 50 examined isolates, 19 synthesised IAA at levels comparable to industrial producers - 80 µg/ml and higher. The evaluation of the influence of microbial culture liquid on the growth and development of radish seeds revealed complete inhibition of the root system and seedling effect for all isolates. Among the examined isolates, 16 completely suppressed the growth of test plant seeds. Seed germination using the suspension of other isolates ranged from 7.1% to 63.3%. The experiment established that phytotoxic effects also increased with an increase in the amount of IAA synthesised by isolates. The influence of exogenous auxin on plant development can have positive and negative effects. The optimal concentration range of IAA for a specific plant can be extremely narrow, and any deviation from this concentration can lead to inhibitory effects. Therefore, further research is needed to explore the biotechnological potential of isolated strains with increased IAA production as industrial producers of this substance or as the basis for a biological preparation for plant growth stimulation.*

Растения, будучи частью экосистемы, находятся в тесном и постоянном контакте с микрофлорой, населяющей поверхность их корней и размножающейся в прикорневом слое почвы [1]. Влияние ризосферных микроорганизмов на рост и развитие технических, древесных и овощных культур изучено в многочисленных работах [2]. Микроорганизмы, колонизирующие ризосферу, обеспечивают доступ питательных веществ растениям, защищают их от фитопатогенов, а также продуцируют физиологически активные и ростостимулирующие вещества.

Кроме того, бактерии плотно заселяют поверхность корней, формируя сообщество ризопланы. Показано, что они находятся на расстоянии 0,03 мм от поверхности корней. Чтобы взаимодействовать с корнем, микроорганизмы должны располагаться на расстоянии диффузии экссудатов [3].

Способность бактерий синтезировать фитогормоны (ауксины, гиббереллины, цитокинины и др.) описывается в литературе как одна из форм взаимодействия между микрофлорой и растением-хозяином, благодаря чему стимулируется рост и развитие растений [4].

Фитогормоны способны в очень малых дозах исполнять роль регуляторов основных физиологических процессов у растений (деления и роста клеток, состояния покоя, регуляции работы устьиц и др.), а также играют важную роль в увеличении площади поверхности корня и количестве корневых волосков [5]. Несмотря на то, что фитогормоны синтезируются самими растениями, в случае их недостаточного количества добавочное снабжение этими веществами улучшает их рост и развитие [6]. Стимулирующий эффект ризобактерий выражается в том, что экзогенные фитогормоны вызывают усиленный рост корневой системы растения и приводят к улучшению минерального питания, что выражается в приросте биомассы, в частности, корневой системы [4].

Способность синтезировать фитогормоны выявлена у представителей родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Pantoea*, *Proteus*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*. Им присуща высокая динамичность роста, способность колонизировать ризосферу и ризоплану сельскохозяйственных культур, вытесняя тем самым микроорганизмы, негативно влияющие на рост растений [4, 6, 7].

Для большинства почвенных бактерий характерен синтез фитогормона из группы ауксинов – индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). Способность синтезировать ИУК была обнаружена у фототрофных и гетеротрофных бактерий, среди которых встречаются патогенные, симбиотические и свободноживущие микроорганизмы родов *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Acmetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aminobacter*, *Arthrobacter*, *Azospmllum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Cellulomonas*, *Corynebactermm*, *Enterobacler*, *Flavobactenum*, *Herbaspmllum*, *Klebsiella*, *Methylobactermm*, *Methylovoms*, *Microbactermm*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pantoeaagglomemns*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Xanlhomonas* [8].

Использование фитогормональных средств, в частности ауксинов, позволяет укрепить растения и сделать их более устойчивыми к воздействию факторов окружающей среды. В результате снижаются расходы на другую агрохимию, повышается урожайность культур, а в плодах не накапливаются токсины, нитраты и другие вредные вещества [9, 7].

Целью исследований являлось изучение способности ризосферных микроорганизмов к продукции ИУК и выявлению фитотоксических свойств по отношению к семенам редиса красного круглого *Raphanus sativus* L. convar. radicula.

Объектами исследований явились 50 изолятов, выделенных из ризосферы и ризопланы культурных и дикорастущих растений аридных экосистем Астраханской области в 2019 – 2020 гг.

Для изучения способности изолятов выделять ИУК исследуемые микроорганизмы выращивали на жидкой среде NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) следующего состава (г/л): глюкоза – 10,0; трикальцийфосфат – 5,0; магния хлорид шестиводный – 5,0; магния сульфат семиводный – 0,25; калия хлорид – 2,0; аммония сульфат – 0,1; агар – 15,0, pH среды 6,8 – 7,0 [10].

Поскольку многие ризосферные микроорганизмы способны синтезировать ИУК только при наличии в питательной среде L-триптофана, то в питательную среду вносили 0,025 г этой аминокислоты. Микроорганизмы культивировали в колбах Эрленмейера при 28 °С в течение 5 суток [11]. Полученную культуральную жидкость освобождали от клеток путем центрифугирования 10 мин при 8 тыс. об/мин. Полученный супернатант в равных долях смешивали с реактивом Сальковского [12] и выдерживали в течение 30 мин до изменения окраски. Концентрацию ИУК определяли фотоэлектроколориметрическим методом. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре (ПромЭкоЛаб ПЭ–5300В) в сравнении с плотностью холостого опыта (неинокулированная микроорганизмами стерильная питательная среда, смешанная с реактивом Сальковского) при  $\lambda = 530$  нм. Для сравнения оптической плотности стандартного раствора и исследуемых штаммов микроорганизмов готовили контрольные растворы ИУК известной концентрации (от 10 до 1390 мкг/мл) [11].

Влияние культуральной жидкости, освобожденной от клеток микроорганизмов, на всхожесть семян и развитие проростков определяли методом биотестов. В качестве тест-объектов использовали семена редиса красного круглого с белым кончиком (*Raphanus sativus*). Проращивание семян проводили во влажных камерах в чашках Петри (по 20 семян в каждой) при температуре 25 °С и непрерывном освещении. В каждую чашку вносили по 5 мл культуральной жидкости. В качестве контроля использовали стерильную дистиллированную воду. Оценивали всхожесть семян, длину корня и стебля по отношению к контролю. опыты проводили в трехкратной повторности [11].

В ходе экспериментальных исследований отмечено, что все исследуемые изоляты способны к выделению ИУК при индукции триптофаном в пределах от 2,5 до 620 мкг/мл (таблица).

Выделение ИУК исследуемыми изолятами  
Isolation of IAA by Studied Isolates

Изолят	Показатель оптической плотности	Содержание ИУК, мкг/мл
1	2	3
18/2020	2,640±0,003	620,0±2,0
19/2020	2,353±0,004	530,0±2,1
20/2020	2,190±0,003	425,0±2,0
22/2020	1,855±0,005	330,0±2,1
24/2020	1,451±0,005	260,0±2,1
23/2020	1,415±0,001	250,0±0,5
25/2020	1,411±0,002	247,0±1,0

Окончание табл.

1	2	3
32/2020	1,401±0,003	230,0±2,0
27/2019	1,364±0,004	228,0±2,1
1/2019	1,319±0,005	224,0±2,1
5/2019	0,880±0,004	150,0±2,1
26/2020	0,853±0,003	149,0±2,0
8/2019	0,789±0,003	145,0±2,0
17/2020	0,785±0,002	144,0±1,0
27/2020	0,744±0,004	125,0±2,1
28/2020	0,682±0,004	120,0±2,1
2/2019	0,675±0,002	118,0±1,0
32/2020	0,512±0,003	98,0±2,0
36/2020	0,511±0,003	97,0±2,0
12/2019	0,362±0,003	66,0±2,0
3/2019	0,357±0,003	64,0±2,0
29/2020	0,275±0,002	55,0±1,0
30/2020	0,234±0,002	52,0±1,0
13/2019	0,232±0,004	51,0±2,1
4/2019	0,163±0,003	37,0±2,0
15/2019	0,137±0,002	31,0±1,0
34/2020	0,124±0,003	30,0±2,0
31/2020	0,111±0,004	25,0±2,1
17/2019	0,098±0,001	23,0±0,5
6/2019	0,093±0,002	22,0±1,0
7/2019	0,065±0,003	19,0±2,0
18/2019	0,057±0,003	18,5±2,0
20/2019	0,055±0,002	18,0±1,0
19/2019	0,054±0,002	17,5±1,0
9/2019	0,052±0,003	16,0±2,0
10/2019	0,049±0,003	15,0±2,0
38/2020	0,036±0,002	14,5±1,0
11/2019	0,034±0,004	14,3±2,1
21/2020	0,031±0,002	14,0±1,0
21/2019	0,030±0,002	13,5±1,0
22/2019	0,029±0,002	13,0±1,0
24/2019	0,028±0,002	12,0±1,0
23/2019	0,028±0,002	12,0±1,0
14/2019	0,026±0,001	11,0±0,5
25/2019	0,025±0,002	10,0±1,0
16/2019	0,023±0,002	9,0±1,0
26/2019	0,023±0,001	9,0±1,0
33/2020	0,022±0,001	6,0±0,5
34/2020	0,017±0,001	4,5±0,5
35/2020	0,014±0,001	2,5±0,5

Образование гормонов – одно из важнейших свойств бактерий, составляющих ризосферу, ризоплану и филлосферу растений. При этом триптофан, как прекурсор ИУК, активно выделяется корнями. Штамм считается активным продуцентом, если выход фитогормона составляет 80 мкг/мл и более [13, 14].

Таким образом, 19 из исследуемых изолятов обладают повышенной индуцированной продукцией ИУК и могут рекомендоваться для промышленного применения.

Отбор микроорганизмов для использования в сельском хозяйстве идет на основе сочетания множества свойств, среди которых первое место занимает отсутствие фитотоксичности [8, 13, 14].

Оценку фитотоксичности суспензий исследуемых изолятов проводили на семенах редиса. В ходе экспериментальных исследований отмечено, что все исследуемые изоляты способны ингибировать развитие семян, как показано на рис. 1.

Влияние изолятов на развитие проростков тест-растений оценивали по длине корня и стебля. При этом считается, что снижение длины более чем на 30 % по отношению к контролю свидетельствует об угнетающем эффекте.

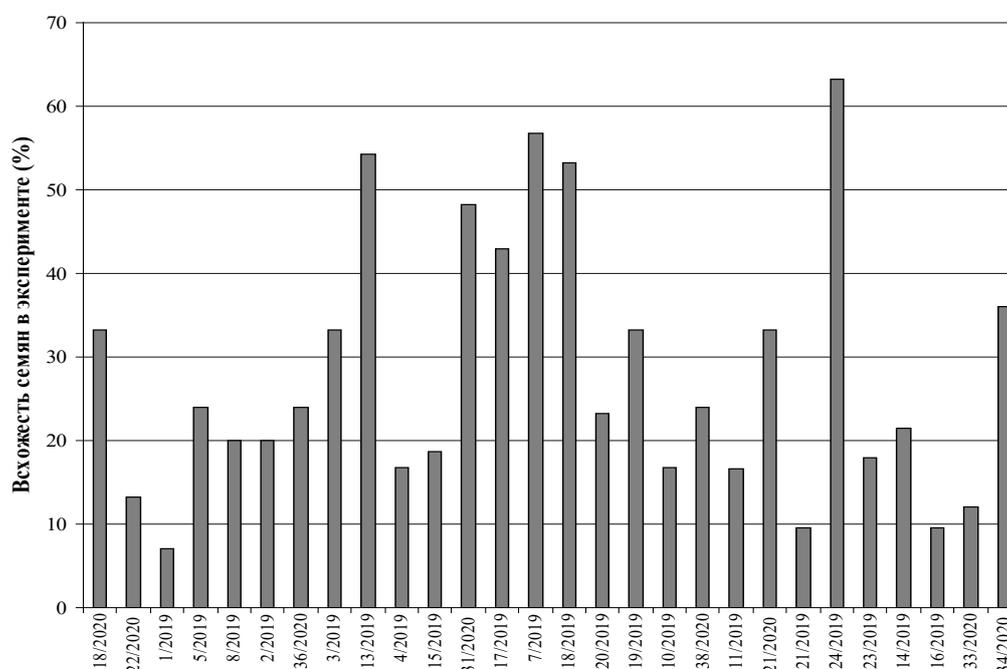


Рис. 1. Показатель всхожести семян редиса под действием культуральной жидкости изолятов

Fig. 1. Seed Germination Rate Indicator under the Influence of Culture Liquid from Isolates

Среди исследуемых изолятов 16 полностью подавляли развитие семян тест-растения. Всхожесть семян при использовании суспензии остальных изолятов колебалась от 7,1 до 63,3 %.

По результатам эксперимента отмечено, что все исследуемые изоляты активно угнетают развитие корня проростков. Длина корня тест-растения не превышала 20 % от контроля, как показано на рис. 2.

Исследуемые изоляты также ингибировали развитие стебля проростков. Согласно полученным данным длина стебля не превышала 50 % от контроля (рис. 3)

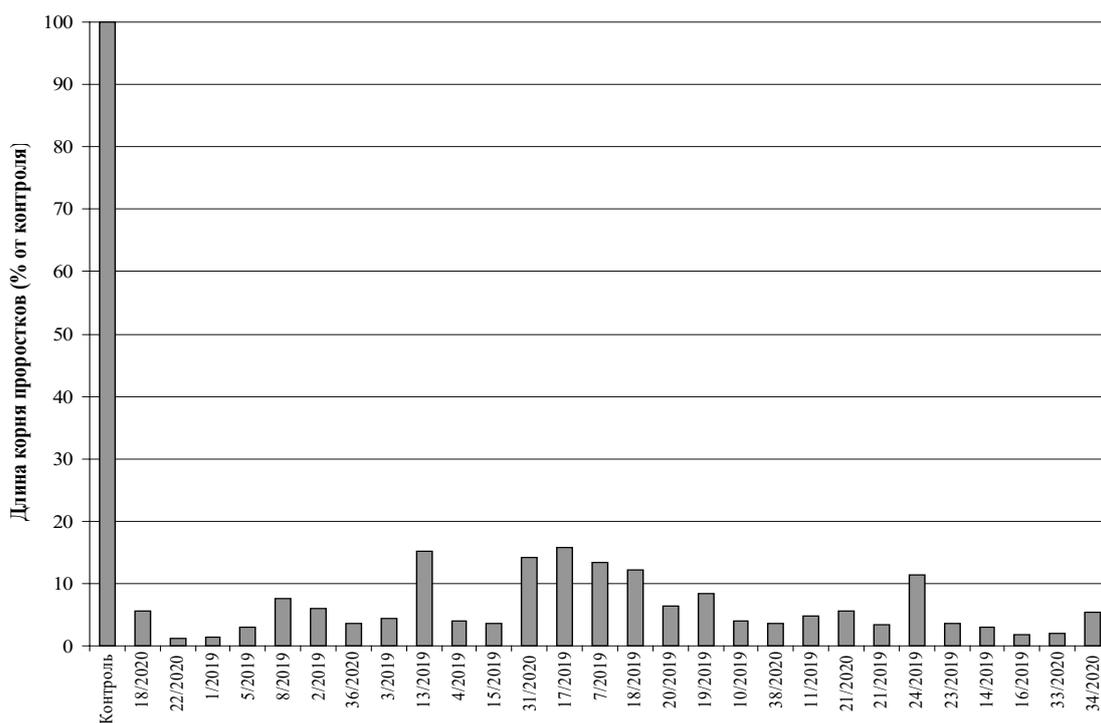


Рис. 2. Длина корней проростков

Fig. 2. Length of Radicle Roots

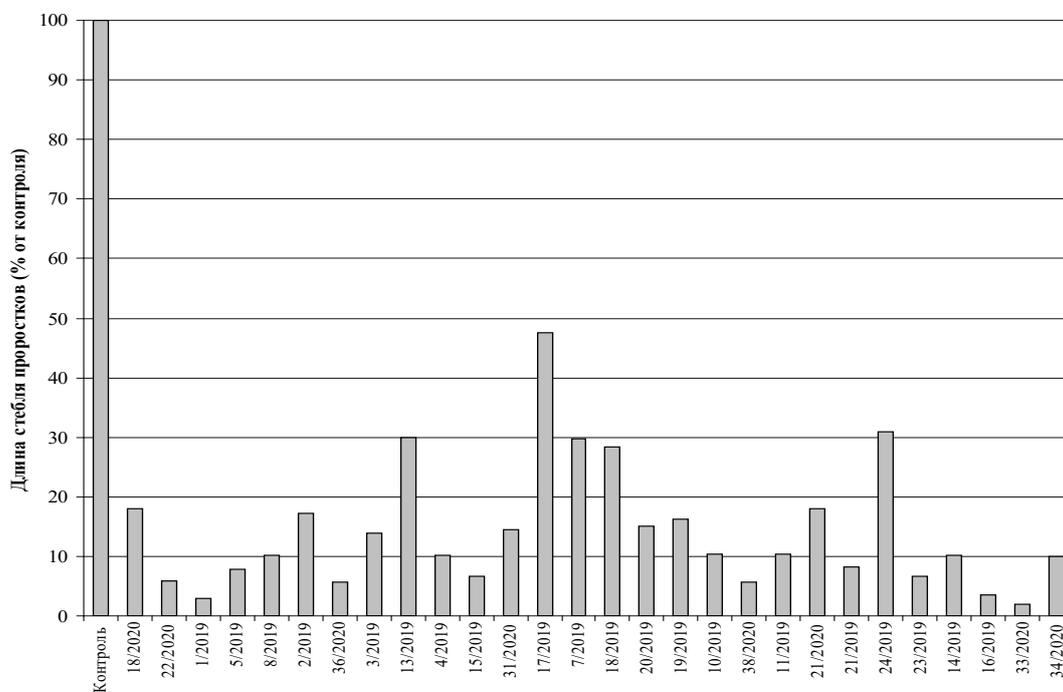


Рис. 3. Длина стеблей проростков

Fig. 3. Length of Seedling Stems

Бактериальные продуценты ИУК, взаимодействуя с растением, вмешиваются в такие физиологические процессы, как деление и рост клеток, дифференцировка тканей, реакция на свет и гравитацию, и могут помешать их нормальному развитию. Влияние экзогенного ауксина на развитие растений колеблется от положительных до отрицательных эффектов. Оптимальный диапазон концентраций ИУК для конкретного растения может быть чрезвычайно узким, и сдвиг концентрации в любую сторону может привести к угнетающим эффектам [15–17].

Таким образом, проведен первичный скрининг ризосферных микроорганизмов, выделенных из ризосферы и ризопланы культурных и дикорастущих растений аридных экосистем Астраханской области. Выявлено, что все изоляты обладают способностью к продукции ИУК. Из 50 изолятов 19 способны к синтезу повышенных концентраций ИУК (от 80 мкг/л и выше), что позволяет рассматривать их как перспективные агенты для производства ИУК. При этом отмечено, что культуральная жидкость большинства изолятов проявляет фитотоксические свойства по отношению к семенам редиса. В этой связи необходимы дальнейшие исследования возможности биотехнологического применения выделенных изолятов с повышенной продукцией ИУК как промышленных продуцентов этого вещества или как основы биологического препарата по стимуляции роста растений.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-26-00227 «Генетическая паспортизация ризосферных микроорганизмов аридных экосистем с биотехнологически значимыми свойствами».

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Курдыш И.К., Чуйко Н.В., Бега З.Т. Хемотаксисные и адгезивные свойства *Azotobacter vinelandii* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46. – С. 58–63.
2. Феоктистова Н.В. Ризосферные бактерии // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2016. – № 2. – С. 207–224.
3. Бегжанова З.С. Особенности ризосферной микрофлоры пустынных растений-фитомелиорантов в Южном Приаралье // Актуальные проблемы современной науки. – 2013. – № 2. – С. 215.
4. Lugtenberg B. Plant – growth-promoting rhizobacteria // Annu. Rev. Microbiol. – 2009. – N 63. – P. 541–555.
5. Соколова, М.Г. Влияние на растения фитогормонов, синтезируемых ризосферными бактериями // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47. – С. 302–307.
6. Исаева К.Х. Образование гиббереллина и гиббереллиноподобных веществ углеводородокисляющими бактериями // Вестник МГОУ. – 2009. – № 4. – С. 96–101.
7. Кравченко Л.В. Выделение и фенотипическая характеристика ростстимулирующих ризобактерий (PGPR), сочетающих высокую активность колонизации корней и ингибирования фитопатогенных грибов // Микробиология. – 2002. – Т. 71. – С. 521–525.
8. Мордухова Е.А., Скворцова Н.П., Кочеткова В.В. Синтез фитогормона индолил-3-уксусной кислоты ризосферными бактериями рода *Pseudomonas* // Микробиология. – 1991. – Т. 60, № 4. – С. 506–513.
9. Дмитричева Д.С. Ризосферные аборигенные микроорганизмы, способствующие росту и развитию растений // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2011. – № 207. – С. 186–190.
10. Nautiyal C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms // FEMS Microbiology Letters. – 1999. – Vol. 170. – P. 265–270. – DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x.
11. Щербаков А.В. Эндوفитные бактерии, населяющие семена пшеницы, перспективные продуценты микробных препаратов для сельского хозяйства // Достижения науки и техники АПК. – 2013. – № 7. – С. 35–38.
12. Salkowski E. Ueber das Verhalten der Skatolcarbonsaureim Organismus // Z. Physiol. Chem. – 1885. – N 9. – P. 23–33.
13. Шеховцова Н.В. Образование ауксинов эндوفитными бактериями подземных органов *Dactyloctenium aegyptium* (L.) Scop. // Вестник ОГУ. – 2012. – № 12. – С. 366–368.

14. Драгвоз И.В. Экзометаболиты штамма *Bacillus amyloliquefaciens* ИМВ В-7100, определяющие его фитостимулирующую активность // Физиология растений и генетика. – 2014. – Т. 46. – С. 516–524.
15. Церковняк Л.С. Фосфатмобилизирующие бактерии *Bacillus subtilis* – продуценты соединений фенольной природы // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45. – С. 311–317.
16. Woodward A.W., Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction // *Annals of botany*. – 2005. – Vol. 95, N 5. – P. 707–735. – DOI:10.1093/aob/mci083.
17. Teale W.D., Paponov I.A., Palme K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development // *Natures reviews. Molecular cell Biology*. – 2006. – Vol. 7, N 11. – P. 847–859. – DOI:10.1038/nrm2020.

## REFERENCES

1. Kurdysh I.K., Chuyko N.V., Bega Z.T., *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2010, Vol. 46, pp. 58–63. (In Russ.)
2. Feoktistova N.V. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya: Estestvennye nauki*, 2016, No. 2, pp. 207–224. (In Russ.)
3. Begzhanova Z.S. *Aktualnye problemy sovremennoy nauki*, 2013, No. 2, pp. 215–215. (In Russ.)
4. Lugtenberg B. *Annu. Rev. Microbiol*, 2009, No. 63, P. 541–555.
5. Sokolova M.G. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2011, Vol. 47, pp. 302–307. (In Russ.)
6. Isaeva K.Kh. *Vestnik MGOU*, 2009, No. 4, pp. 96–101. (In Russ.)
7. Kravchenko L.V. *Mikrobiologiya*, 2002, Vol. 71, pp. 521–525. (In Russ.)
8. Mordukhova E.A., Skvortsova N.P., Kochetkova V.V., *Mikrobiologiya*, 1991, Vol. 60, No. 4, pp. 506–513. (In Russ.)
9. Dmitricheva D.S. *Uchenye zapiski KGAVM im. N.E. Bauman*, 2011, No. 207, pp. 186–190. (In Russ.)
10. Nautiyal C.S. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, Vol. 170, P. 265–270, DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x.
11. Shcherbakov A.V. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2013, No. 7, pp. 35–38. (In Russ.)
12. Salkowski E. Z. *Physiol. Chem*, 1885, No. 9, P. 23–33.
13. Shekhovtsova N.V. *Vestnik OGU*, 2012, No. 12, pp. 366–368. (In Russ.)
14. Dragovoz I.V. *Fiziologiya rasteniy i genetika*, 2014, Vol. 46, pp. 516–524. (In Russ.)
15. Tserkovnyak L.S. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2009, Vol. 45, pp. 311–317. (In Russ.)
16. Woodward A.W., Bartel B., *Annals of botany*, 2005, Vol. 95, No. 5, P. 707–735, DOI:10.1093/aob/mci083.
17. Teale W.D., Paponov I.A., Palme K., *Natures reviews. Molecular cell Biology*, 2006, Vol. 7, No. 11, P. 847–859, DOI:10.1038/nrm2020.