

На правах рукописи

Колесников Олег Васильевич

ВЛИЯНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА СИСТЕМУ
МИКРООРГАНИЗМ-РАСТЕНИЕ

Специальность 03.02.03 микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва – 2012

Диссертация выполнена на кафедре микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВПО Российского государственного аграрного университета-МСХА имени К.А.Тимирязева

Научный руководитель:	Доктор биологических наук, профессор Емцев Всеволод Тихонович
Официальные оппоненты:	доктор биологических наук Васильева Лина Васильевна кандидат биологических наук Благовещенская Генриетта Германовна
Ведущая организация:	ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт кормов имени В.Р.Вильямса Россельхозакадемии

Защита диссертации состоится «15» февраля 2012 г. В 16 час 30 мин на заседании диссертационного совета Д 220.043.03 при Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А. Тимирязева.

Адрес: 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 49. Ученый совет РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева

Автореферат разослан «13» января 2011 г.,
размещён на сайте университета www.timacad.ru и направлен по адресу referat_vak@mon.gov.ru

Отзывы на автореферат (в 2-х экземплярах заверенных печатью), просим направлять по адресу: 127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. факс: 8(499) 976-24-92

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

О.В. Селицкая

Актуальность исследования. В настоящее время, в связи с развитием цивилизации, значительно увеличивается антропогенная нагрузка на экосистемы. В частности, растет количество тяжелых металлов (ТМ), выбрасываемых в окружающую среду. В частности, одним из источников ТМ является автотранспорт, причем это не только свинец, содержащийся в бензине, но и множество других металлов и соединений. Этот источник загрязнения отличается еще и тем, что действует в непосредственной близости к человеческому жилью, в отличие от различных промышленных объектов, таких как заводы, электростанции, свалки и другие поставщики ТМ в биосферу. При этом количество автомобилей в последние годы только увеличивается, технологий же, позволяющих радикально снизить их негативное воздействие на окружающую среду не предвидится. Первыми под удар попадают зеленые насаждения вдоль дорог, поглощающие значительную часть вредных веществ из дорожных стоков, задерживающих аэрозоли, снижающих шумовое воздействие транспортного потока и вообще играющих важную гигиеническую роль в городских условиях. Таким образом, важной задачей становится повышение устойчивости зеленых насаждений к неблагоприятным факторам.

В последние десятилетия наблюдается рост интереса к различным биологическим технологиям защиты растений и восстановления загрязненных почв. В частности, известно, что обработка растений некоторыми микроорганизмами-симбионтами способна значительно увеличить их устойчивость к самым различным неблагоприятным факторам, начиная от засухи или пониженной температуры до засоления почвы или загрязнения ее ТМ. При этом значительный интерес представляет более глубокое понимание механизмов работы этого симбиоза и поиск путей для повышения его эффективности.

Еще одним способом использования растений в защите окружающей среды является так называемая фиторемедиация — очистка различных сред от загрязнителей с помощью растений. Фактически при этом работают симбиотические микробно-растительные комплексы. Увеличение их устойчивости к ТМ и другим неблагоприятным факторам — важная задача, способная повысить эффективность их работы. Еще одним важным для фиторемедиации свойством симбиотических микроорганизмов является усиления способность растений накапливать тяжелые металлы. В данный момент данные о подобном воздействии микроорганизмов достаточно противоречивы, однако более подробное изучение механизма, вызывающего подобный эффект, может значительно повысить эффективность работы растений-гипераккумуляторов или позволит использовать для фиторемедиации обычные декоративные виды, не имеющие в норме выраженных гипераккумуляторных свойств.

Цель работы: изучить влияние токсикантов на систему микроорганизм-растение.

Задачи исследования. Для достижения вышеозначенной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние солей тяжелых металлов на численность симбиотических микроорганизмов в эндосфере корней и листьев растений, а так же динамику ее изменения.
2. Исследовать влияние загрязнения почвы ТМ на интродуцированную популяцию *R. planticola* в системе почва-растение
3. Изучить влияние бактерии *Klebsiella (Raoultella) planticola* на рост и развитие различных видов газонных трав в условиях загрязнения почвы смесями солей тяжелых металлов.
4. Исследовать протекторное действие *R. planticola* в условиях загрязнения несколькими тяжелыми металлами и сформулировать рекомендации по ее применению в составе биопрепаратов.

Научная новизна исследования. В работе впервые исследовано протекторное действие *R. planticola* на растения при загрязнении почвы смесью нескольких тяжелых металлов, характерных для выбросов автотранспорта. Выявлено, что инокуляция в данных условиях оказывает заметное положительное воздействие на различные параметры растительных организмов. Так же отмечены различия в воздействии микроорганизмов на разные виды растений. Исследованы некоторые аспекты изменения численности микроорганизмов и динамики их миграции в ткани растения в зависимости от условий внешней среды (наличия или отсутствия ксенобиотика). Обнаружены различия в эффективности различных методов инокуляции. Отмечено увеличение накопления меди и цинка в тканях растений, инокулированных *R. planticola*.

Практическая значимость. Результаты данного исследования свидетельствуют, что инокуляция *R. planticola* может в значительной степени нейтрализовывать негативный эффект, оказываемый различными тяжелыми металлами на газонные травы. Таким образом, биопрепараты на основе *R. planticola* могут быть использованы для защиты растений от действия ТМ. Так же было показано, что инокуляция методом полива взвесью микроорганизмов эффективнее, чем инокуляция замачиванием семян. Это позволяет рекомендовать данный метод инокуляции для практического использования. Кроме того было обнаружено, что инокуляция овсяницы красной сорта “Золушка” *R. planticola* заметно усилила накопление ТМ в тканях растения. С одной стороны, это накладывает определенные ограничения на использование *R. planticola* для защиты растений, используемых в пищу животных или человеку. С другой — открывает широкие перспективы использования в фиторемедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами.

Апробация.

Результаты исследований были представлены на международной научной конференции молодых ученых РГАУ-МСХА (Москва, 2010), на II международной заочной научно-практической конференции “Информационное пространство современной науки” (Чебоксары, 2010), а так же молодежном научном экологическом форуме “Экологические последствия засухи и пожаров 2010 года” (Москва, 2011).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 3 работы, в том числе одна статья в рецензируемом издании, рекомендованном ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы; описания объектов, методов и условий экспериментов; результатов экспериментов и их обсуждения; выводов. Объем диссертационной работы составляет 110 с., из них 10 с. приложений. Работа включает 13 таблиц, 12 рисунков, список литературы из 200 наименований (в том числе 171 на иностранных языках).

Объекты и методы исследований

Микроорганизмы

В работе использовался ассоциативный азотфиксатор *Raoultella planticola*, штамм ТСХА-91 Amp^R, входящий в состав биопрепарата “Биоплант – К”. Штамм *Raoultella planticola* ТСХА-91 Amp^R был выделен в лаборатории микробиологии РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева из ризопланы огурца (Емцев и др., 1995).

Растения

В качестве модельных растений были использованы несколько видов овсяницы (*Festuca rubra*, *F. rubra commutata*, *F. ovina*), райграс пастбищный (*Lolium perenne*) и полевица собачья (*Agróstis canina*).

Загрязнители

Смесь №1 — ZnSO₄, CuSO₄ и PbCO₃ в количествах, соответствующих 2300 мг Zn на килограмм грунта, 300 мг/кг Cu и 3200 мг/кг Pb, что в 100 раз превосходит предельно допустимую концентрацию этих металлов в почве.

Смесь №2 — ZnSO₄, CuSO₄ и Pb(CH₃COO)₂ в количествах, соответствующих 2300 мг Zn на килограмм грунта, 300 мг/кг Cu и 3200 мг/кг Pb, что в 100 раз превосходит предельно допустимую концентрацию этих металлов в почве.

Смесь №3 — Zn(CH₃COO)₂, Cu(CH₃COO)₂ и Pb(CH₃COO)₂ в количествах, соответствующих 2300 мг Zn на килограмм грунта, 300 мг/кг Cu и 3200 мг/кг Pb, что в 100 раз превосходит предельно допустимую концентрацию этих металлов в почве.

Смесь №4 — NiSO₄, Cd(CH₃COO)₂, CoCl₂ в количествах, соответствующих 400 мг Ni на килограмм грунта, 500 мг/кг Cd и 500 мг/кг Co, что в 100 раз превосходит предельно допустимую концентрацию этих металлов в почве.

Инсектицид “Фуфанон” — коммерческое название для О,О-Диметил-S-(1,2-дикарбэтоксиэтил)дитиофосфата, он же малатион, карбофос. Достаточно эффективный и популярный фосфорорганический инсектицид, в настоящее время несколько устаревший. Вносился в количестве 200 мг/кг грунта, что так же в 100 раз превосходит его ПДК.

Субстраты

Для культивирования растений в опытах использовалось 3 типа субстратов: дерново-подзолистая почва, речной песок и низинный торф.

Дерново-подзолистая тяжелосуглинистая почва, характерная для средней полосы России, отбиралась на опытном поле ГНУ ВИК имени В.Р. Вильямса. Некоторые характеристики данной почвы приведены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристики дерново-подзолистой почвы, использованной в опытах

Содержание гумуса по Тюрину, %	pH _{KCl}	Hг, мг-экв. на 100 г почвы	N общ., %	Подвижного Р, мг на кг почвы	Калий мг/кг почвы
1,68	4,88	2,68	0,156	427,4	148,5

Речной песок

В данный тип грунта для улучшения питания растений была добавлена доломитовая мука, а так же смесь Прянишникова.

Таблица 2. Характеристики речного песка, использованного в опытах

Общий углерод, %	pH _{KCl}	Hг (мг-экв. на 100 г почвы)	N общ., %	Фосфор мг/100 г почвы	Калий Мг/100 г почвы
0,37	7,93	0,23	0,114	27,40	9,03

Низинный торф — часто применяется при создании газонов и озеленении территории.

Таблица 3. Характеристики низинного торфа, использованного в опытах

Общий углерод, %	pH _{KCl}	Hг (мг-экв. на 100 г почвы)	N общ., %	Фосфор мг/100 г почвы	Калий Мг/100 г почвы
11,14	6,05	3,82	0,495	2,34	6,21

Методика проведения вегетационных опытов

Использованные методики и технологии

Обработка растений бактериями *R. planticola* осуществлялась двумя способами. При инокуляции первым способом (инокуляция замачиванием семян) семена растений замачивались непосредственно перед высевом в суспензии суточной культуры *R. planticola* на среде К₂, разведенной стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:50 в течение 30 минут (как показали исследования, это оптимальный режим инокуляции замачиванием).

При инокуляции вторым способом (инокуляция поливом) семена высевались в почву, а сразу после их прорастания производился полив растений суспензией суточной культуры *R. planticola* на среде К₂, разведенной стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:50 (60 мл на сосуд емкостью 0,5 л).

Для оценки состояния растений производился учет их основных биометрических параметров. В частности определялась средняя длина листьев, проективное покрытие (визуально, с шагом 10%) (Методические указания по проведению полевых опытов с кормовыми культурами). Так же определялась сырая масса листьев и корней — для этого растения извлекались из почвы, листья и корни отделялись, отмывались, высушивались и взвешивались.

Для осуществления микробиологического исследования корни и листья извлеченные из почвы, тщательно промывались, их поверхность дезинфицировалась раствором гипохлорита натрия в течение 3 минут для уничтожения эпифитных микроорганизмов. После этого они растирались в ступке, а полученная суспензия разбавлялась стерильным физиологическим раствором. Разведения полученного материала высевались в трех повторностях до 12-го разведения на полужидкую среду Федорова-Калинской (Калининская и др., 1981) с сахарозой для определения общей численности азотфиксирующих микроорганизмов в тканях растений. Точная численность определялась методом предельных разведений по таблицам Мак-Креди. Численность ампициллинрезистентной *R. planticola*, штамм ТСХА-91 определялась путем посева на плотную питательную среду LB (Миллер, 1976) с ампициллином (200 мкг/мл).

Для исследования растительной массы на содержание тяжелых металлов листья и корни тщательно промывались, высушивались до воздушно-сухого состояния и озолялись по методу мокрого озоления в серной кислоте. После этого в полученных вытяжках атомно-адсорбционным методом при помощи спектрофотометра Спектр 5 определялась концентрация тяжелых металлов (меди и цинка).

С целью изучения воздействия ТМ на почвенную микрофлору определялась интенсивность базального и субстратиндуцированного дыхания. Для этого из каждого сосуда отбиралось по 200 граммов почвы, проводилось ее увлажнение и прединкубация в течение 5–7 суток при температуре 22°C.

При определении СИД навеска в 2 грамма почвы помещалась во флаконы известного объема в 4-х кратной повторности и вносили раствор глюкозы из расчета 10 мг на 1 г. почвы. После этого флаконы герметизировали и, после 3,5 часов инкубации при 22°C измеряли на хроматографе Кристалл 5000 количество выделившегося CO₂.

При определении базального дыхания во флаконы вносилось 2 грамма почвы и 0,1 мл воды, после чего они герметизировались и инкубировались при 22°C в течение суток. После инкубации производилось измерение концентрации CO₂ во флаконе при помощи хроматографа.

Схемы опытов

Опыт № 1. Первый вегетационный опыт был поставлен в 2008 году и завершен в 2010. Его целью было установить влияние инокуляции растений овсяницы различных видов культурой *R. planticola* штамм ТСХА 91, а так же выяснить, как влияют на взаимодействие растения и микроорганизма различные дополнительные условия. В опыте использовались 2 типа растений — травосмесь и овсяница сорта “Золушка”. Использовались три разных суб-

страта — торф, речной песок и дерново-подзолистая почва. В качестве загрязнителя использовалась смесь солей тяжелых металлов №1. Инокуляция производилась методом замачивания семян.

Исследуемые растения высевались 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.

Через 20 дней, 40 дней и 9 месяцев после прорастания семян проводились биометрическое и микробиологическое исследования — определялась длина листьев и проективное покрытие, а так же численность *R. planticiola* (на 20-й и 40-й день) и общая численность азотфиксаторов (на 9-й месяц).

Через 10 месяцев после прорастания семян было так же исследовано состояние почвенной микрофлоры. Для этого была определена интенсивность базального и субстратиндуцированного дыхания почвы, после чего на основании этих данных так же была рассчитана общая микробная биомасса и микробный коэффициент.

Опыт № 2. Данный опыт был поставлен в 2009 году. Его целью было подтвердить данные, полученные в первом опыте, выяснить, как влияют на растения различные методы инокуляции микроорганизмами, а также исследовать влияние на систему микроорганизм — растение органического ксенобиотика. Кроме того, было изучено влияние инокуляции на накопление тяжелых металлов в ткани растения. В опыте использовался только один тип субстрата (дерново-подзолистая почва), для ее загрязнения применялась смесь солей тяжелых металлов №2 и инсектицид фуфанон в количестве, в 100 раз превосходящем ПДК. Так же использовалось 2 способа инокуляции: замачиванием семян и поливом. Схема опыта приведена в таблице 4.

Таблица 4. Схема опыта 2

Ксенобиотик	Способ обработки		
	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

Через 40 дней после прорастания семян проводилось микробиологическое и биометрическое исследование. Измерялось проективное покрытие, длина листьев, а так же масса листьев и корней. Кроме того, проводилось ис-

следование растительной массы на содержание в ней тяжелых металлов атомно-адсорбционным методом.

Опыт № 3 был поставлен в 2011 году. Его целью было подтвердить полученные ранее данные, а так же выяснить, как влияет инокуляция на устойчивость различных видов растений к тяжелым металлам. Так же планировалось использовать различные типы смесей ТМ. В опыте использовалась дерново-подзолистая почва и 3 вида растений: райграс пастбищный, овсяница красная (сорт “Сигма”) и полевица собачья. Для загрязнения почвы использовалось 2 смеси солей тяжелых металлов — смеси № 3 и № 4. Использовалось 2 метода инокуляции – инокуляция замачиванием семян и инокуляция поливом всходов. Схема загрязнения почвы и инокуляции, применявшаяся для каждого растения, приведена в таблице 5. Каждый вариант применялся в шестикратной повторности для райграса и овсяницы и в трехкратной для полевицы собачьей (в связи с нехваткой посевного материала)

Таблица 5. Схема опыта 3

Ксенобиотик	Способ обработки		
	Без инокуляции (БИ)	Инокуляция семян (ИС)	Инокуляция поливом (ИП)
Без ксенобиотика (БК)	БИ+БК	ИС+БК	ИП+БК
Тяжелые металлы, смесь № 3 (ТМ3)	БИ+ ТМ3	ИС+ ТМ3	ИП+ ТМ3
Тяжелые металлы, смесь № 4 (ТМ4)	БИ+ ТМ4	ИС+ ТМ4	ИП+ ТМ4

Отмечалось время прорастания семян в различных вариантах опыта и динамика развития растений. На 60-й день после прорастания выжившие растения были извлечены из почвы, листья и корни отделены и взвешены, после чего тщательно вымыты. Большая часть биомассы была подготовлена для озоления и исследования с помощью атомно-абсорбционного анализа, меньшая отделена и отобрана для выделения ДНК и выполнения ПЦР-анализа с целью подтвердить наличие *R. planticola*.

Результаты и обсуждение

1 Изучение воздействия различных факторов на колонизацию растений бактериями *Raoultella planticola* и почвенную микрофлору

Целью наших исследований являлось изучение влияния тяжелых металлов на взаимодействие растений и интродуцированных микроорганизмов. Для решения поставленной задачи мы исследовали динамику и интенсивность колонизации корней и листьев растений бактериями *R. planticola* и

влияния на нее различных факторов, таких как разные типы субстратов, загрязнение тяжелыми металлами и ксенобиотиками.

1.1 Воздействие загрязнения грунта тяжелыми металлами на колонизацию растений бактериями

Данные о численности *R. planticola*, полученные в первом вегетационном опыте, приведены в таблицах 6, 7 и 8.

Таблица 6. Динамика численности бактерий *R. planticola* штамм ТСХА-91 Am^R в корнях и листьях растений травосмеси на речном песке (КОЕ/г сырой биомассы)

Вариант	20 дней		40 дней	
	ризоплана	филлосфера	ризоплана	Филлосфера
Контроль	0	0	0	0
бактеризация	$1,8 \cdot 10^5$	0	$1 \cdot 10^4$	$5,5 \cdot 10^2$
тяжелые металлы	0	0	0	0
бактеризация + ТМ	$2 \cdot 10^4$	0	0	$2,5 \cdot 10^2$

Таблица 7. Динамика численности бактерий *R. planticola* штамм ТСХА-91 Am^R в корнях и листьях растений травосмеси на дерново-подзолистой почве (КОЕ/г сырой биомассы)

Вариант	20 дней		40 дней	
	ризоплана	Филлосфера	ризоплана	филлосфера
Контроль	0	0	0	0
бактеризация	$6 \cdot 10^4$	0	$1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^2$
тяжелые металлы	0	0	0	0
бактеризация + ТМ	$5,5 \cdot 10^4$	0	0	0

Таблица 8. Динамика численности бактерий *R. planticola* штамм ТСХА-91 Am^R в корнях и листьях растений травосмеси на низинном торфе (КОЕ/г сырой биомассы)

Вариант	20 дней		40 дней	
	ризоплана	филлосфера	ризоплана	филлосфера
контроль	0	0	0	0
бактеризация	$1,9 \cdot 10^5$	0	$2 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^2$
тяжелые металлы	0	0	0	0
бактеризация + ТМ	$7 \cdot 10^4$	0	$1,5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^2$

Были исследованы пробы, взятые на 20-й и 40-й день после прорастания семян. Исследования образцов, отобранных на 20-й день, показали наличие бактерий в корнях инокулированных растений во всех вариантах опыта. Однако в листьях *R. planticola* при этом обнаружена не была. Аналогичное исследование, выполненное через 40 дней после прорастания семян, показало, что бактерии начинают обнаруживаться как в корнях, так и в листьях. При этом их количество в корнях заметно снизилось (в некоторых вариантах почти на порядок), на низинном торфе и речном песке в вариантах с внесением тяжелых металлов они совсем перестали обнаруживаться.

Таким образом, можно сделать вывод, что скорость распространения бактерий в растительном организме достаточно невелика. Кроме того, достаточно невелико количество клеток микроорганизмов, переносимых из корней в листья. При этом на загрязненных ТМ грунтах миграция микроорганизмов в эндосферу корней заметно замедляется.

Полученные во втором опыте данные по численности микроорганизмов представлены на рис. 1. Как видно, численность азотфиксаторов в листьях (рис. 1, А), как и в первом опыте, значительно (на 1 - 2 порядка) меньше, чем в корнях (рис. 1, Б). В тканях растений, культивировавшихся на почве, в

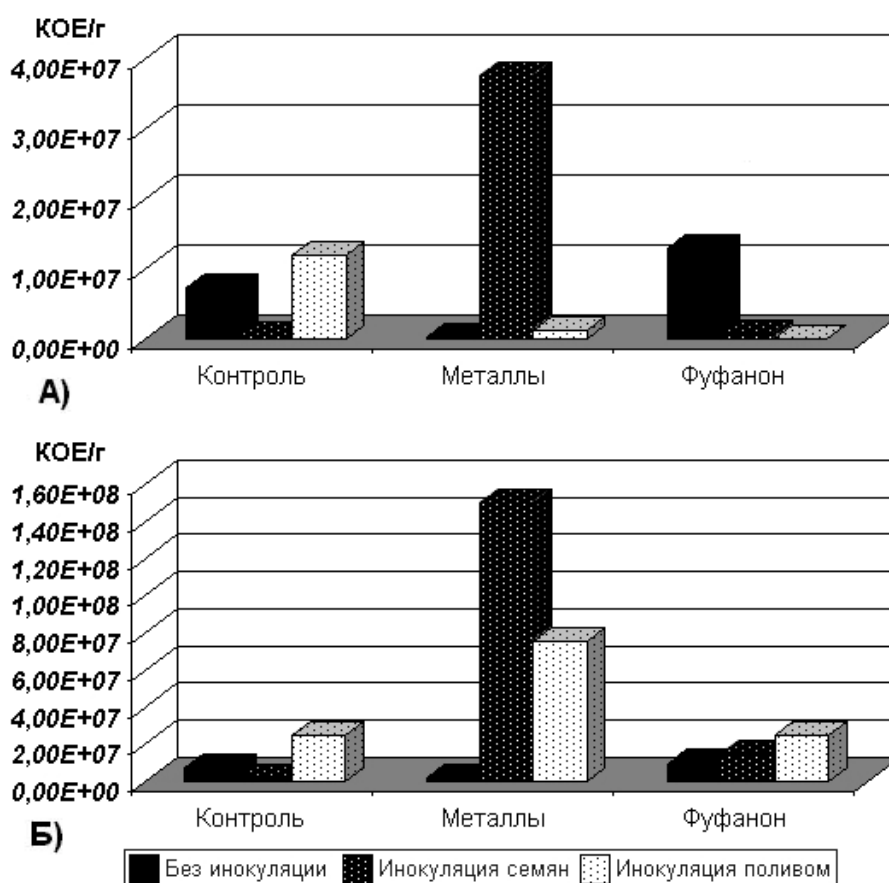


Рисунок 1. Влияние различных ксенобиотиков и разных методов инокуляции на обсемененность тканей корней и листьев овсяницы сорта “Золушка” ассоциативными азотфиксирующими микроорганизмами. Дерново-подзолистая почва. А – листья; Б – корни (КОЕ/г сырой биомассы).

которую были внесены соли ТМ, количество микроорганизмов было заметно большим, чем в контрольных вариантах без загрязнения. Несколько менее ярко это проявилось на почве, загрязненной пестицидом (обсемененность корней инокулированных растений относительно контроля при загрязнении тяжелыми металлами была в 100 раз больше, чем без загрязнения).

После девяти месяцев культивирования в первом вегетационном опыте было выполнено повторное исследование растений, с целью определить общее содержание ассоциативных азотфиксаторов в тканях. Полученные данные показали, что различия в микробной обсемененности тканей растений между вариантами с различной обработкой грунта и растений в значительной степени сгладились, однако основные тенденции, выявленные при первых измерениях, сохранились. Так же сохранился значительный разрыв в численности азотфиксирующих микроорганизмов между корнями и листьями растений (в некоторых случаях более чем на два порядка).

Таким образом, загрязнение почвы тяжелыми металлами привело к заметному увеличению численности ассоциативных diaзотрофов в тканях растений по сравнению с контрольными вариантами без загрязнения.

Возможно, это объясняется тем, что загрязнение грунта ТМ или органическими ксенобиотиками делает его менее благоприятным для развития почвенных микроорганизмов, что, в свою очередь, стимулирует их миграцию из почвы в растения. Значительно большая численность diaзотрофов в тканях инокулированных растений на загрязненной почве, вероятно, объясняется тем, что инокуляция оказывает значительный ростостимулирующий эффект, особенно на корневую систему, что в свою очередь стимулирует развитие микрофлоры корней и почвы.

Для точного определения наличия *R. planticola* в корнях растений в третьем опыте был использован метод ПЦР. При этом разведения растертых корней райграса и овсяницы красной высевались на среду LB с ампициллином, после чего колонии, имеющие признаки, характерные для *R. planticola*, исследовались методом ПЦР с помощью праймера PAR-C1. В результате было подтверждено, что данные колонии образованы бактериями *R. planticola*.

1.2 Влияние типа грунта, метода инокуляции и органических ксенобиотиков на колонизацию растений микроорганизмами

Кроме загрязнения ТМ в поставленных опытах имелись и другие факторы, которые могли оказать некоторое влияние на интенсивность колонизации тканей растений микроорганизмами. Это, в частности, разные типы грунта, на которых в первом опыте выращивались растения, использованные во втором опыте разные методы инокуляции, а так же дополнительный загрязнитель — фосфорорганический пестицид (фуфанон).

Тип грунта

Результаты, полученные в первом опыте, позволяют сделать вывод, что количество микроорганизмов в эндосфере корней растений культивировавшихся на разных типах грунтов, может заметно различаться. Как видно из

табл. 6 и 8, численность *R. planticola* в корнях растений овсяницы, культивируемых на торфе и речном песке, изменяется сходным образом — внесение ТМ вызывает значительное падение численности микроорганизмов в корнях.

Данные об общей численности диазотрофов в эндосфере корней после 9 месяцев культивирования, демонстрируют иную закономерность. На речном песке и торфе количество симбиотических азотфиксаторов в корнях растений, выращенных на загрязненной почве выше, чем в незагрязненной. В то же время, в корнях растений, выращенных на загрязненной ТМ дерново-подзолистой почве, численность диазотрофов оказалась в 7 раз ниже, чем на незагрязненной.

Возможно, это связано с тем, что дерново-подзолистая почва богата глинистыми частицами и имеет в связи с этим большую обменную емкость, что смазывает эффект, оказываемый ТМ.

Органический ксенобиотик.

Совокупная численность азотфиксирующих микроорганизмов в корнях растений, выросших на дерново-подзолистой почве, в которую был внесен фуфанон, возросла в 10 раз относительно незагрязненного контроля при инокуляции замачиванием семян, однако осталась неизменной при инокуляции поливом. Эти результаты заметно отличаются от полученных на почве с ТМ, хотя основные закономерности и сохраняются. Прирост численности азотфиксаторов при инокуляции замачиванием. При этом, однако, численность микроорганизмов в тканях листьев при инокуляции замачиванием отличается от контроля сравнительно слабо, а при инокуляции поливом резко уменьшается.

Разные методы инокуляции.

Во втором опыте были применены разные методы инокуляции (при помощи замачивания семян в бактериальной суспензии перед посевом и полива этой суспензией всходов сразу после прорастания семян). Последующие исследования показали, что влияние этих методов на микробную обсемененность тканей растений заметно различалось.

Как видно из графика (рис. 1), при выращивании на незагрязненной почве численность азотфиксаторов в тканях растений, инокулированных поливом, была значительно больше, чем в тканях растений, инокулированных замачиванием.

Достаточно примечательными оказались результаты на почве, загрязненной смесью солей ТМ. Так, численность микроорганизмов в растениях, инокулированных путем полива всходов бактериальной суспензией была заметно меньше, чем путем замачивания семян. Это особенно интересно, если учесть, что, судя по характеру роста и развития растений, инокуляция поливом значительно эффективнее.

Таким образом, исследования показали, что интенсивность колонизации растений бактериями зависит в том числе от способа их внесения.

1.3. Исследование воздействия бактеризации растений на микрофлору загрязненной ТМ дерново-подзолистой почвы

Изучение состояния почвенной микрофлоры при загрязнении и инокуляции весьма важно для более полного понимания функционирования системы почва-микроорганизмы-растение в условиях загрязнения и при внесении ксенобиотиков.

В первом опыте, на 10-м месяце культивирования были исследованы некоторые показатели, характеризующие состояние микробного сообщества почвы, такие как базальное и субстратиндуцированное дыхание (БД и СИД). Кроме того, на основании этих данных были рассчитаны общая биомасса микроорганизмов ($C_{\text{мик}}$) и микробный коэффициент. Исследовались только варианты, в которых применялась дерново-подзолистая почва.

Полученные при исследовании БД и СИД данные приведены в табл. 9. Интенсивность дыхания почвы, в которую были внесены соли ТМ, оказалась заметно ниже контрольной. При этом интенсивность БД упала гораздо сильнее, чем СИД. Инокуляция растений, высаживаемых в загрязненную почву, заметно улучшила оба этих показателя. При этом, однако, бактеризация растений на незагрязненной почве привела к некоторому снижению показателей микробной активности, хотя и значительно меньшему, чем вызванное ТМ.

Таким образом, внесение ТМ в почву значительно снижает интенсивность дыхания почвенной микрофлоры, а инокуляция культивируемых растений *R. planticola* — увеличивает.

Данные, полученные при измерении общей микробной биомассы представлены в таблице 10.

Таблица 9.

Влияние внесения тяжелых металлов и инокуляции растений травосмеси на базальное и субстратиндуцированное дыхание дерново-подзолистой почвы

Вариант обработки	БД, $\text{мкгСО}_2/\text{г}\cdot\text{час}$	СИД, $\text{мкгСО}_2/\text{г}\cdot\text{час}$
Контроль	$0,242 \pm 0,023$	$4,215 \pm 0,575$
незагрязненная почва + бактерии	$0,140 \pm 0,037$	$3,884 \pm 0,382$
загрязненная почва	$0,003 \pm 0,0001$	$2,081 \pm 0,698$
загрязненная почва + бактерии	$0,153 \pm 0,002$	$2,672 \pm 0,208$

Как видно, загрязнение почвы солями тяжелых металлов привело к значительному снижению микробной биомассы, а выращивание инокулированных растений при этом несколько увеличило общую биомассу микроорганизмов.

Таким образом, загрязнение почвы ТМ приводит к снижению общей микробной биомассы, а выращивание на ней растений, инокулированных *R. planticola* позволяет в некоторой степени компенсировать это снижение.

Таблица 10.

Влияние внесения тяжелых металлов и инокуляции растений травосмеси на общую микробную биомассу ($C_{\text{мик}}$) в дерново-подзолистой почве.

Вариант	$C_{\text{мик}}$, мкг/г почвы
контроль	$380,22 \pm 37,41$
почва + тяжелые металлы	$153,11 \pm 51,26$
почва + биопрепарат	$285,47 \pm 28,01$
почва + тяжелые металлы + биопрепарат	$196,53 \pm 15,30$

На основании приведенных выше данных был рассчитан микробный метаболический коэффициент. Высокие значения микробного метаболического коэффициента характерны для молодых или сильно нарушенных экосистем, более низкие — для старых или стабильных. Его значения приведены в таблице 11. Как видно из таблицы, максимальное значение микробного метаболического коэффициента наблюдается в варианте с загрязнением почвы, но без инокуляции растений, несколько меньшие — в варианте с тяжелыми металлами и инокуляцией, еще меньше — в контрольном варианте без загрязнения и инокуляции. Наконец, самое маленькое значение микробного метаболического коэффициента наблюдается в варианте, в котором на незагрязненной почве культивировались инокулированные растения.

Таблица 11. Влияние загрязнения ТМ и инокулированных растений травосмеси на микробный метаболический коэффициент дерново-подзолистой почвы.

Вариант	$q\text{CO}_2$, мкг/мгС*час	Q_R
контроль без биопрепарата и загрязнения	$0,628 \pm 0,190$	$0,058 \pm 0,015$
почва + тяжелые металлы	$0,841 \pm 0,069$	$0,002 \pm$
почва + биопрепарат	$0,491 \pm 0,106$	$0,038 \pm 0,009$
почва + тяжелые металлы + биопрепарат	$0,780 \pm 0,062$	$0,061 \pm 0,022$

Таким образом, можно сделать вывод, что выращивание инокулированных растений позволяет несколько увеличить биомассу микроорганизмов в почве и интенсифицировать их метаболизм. Вероятно, инокуляция при этом действует опосредованно, через растения. Бактерии *R. planticola* стимулируют развитие растений, в особенности корневой системы, что, в свою

очередь, оказывает положительное воздействие на ассоциированных с растениями микроорганизмов.

2 Изучение влияния инокуляции на рост и развитие растений овсяницы различных видов на разных субстратах в условиях загрязнения почвы ТМ

С целью изучения результатов взаимодействия микроорганизмов и растений в различных условиях нами был поставлен ряд опытов. В их ходе было изучено воздействие инокуляции на развитие растений на почвах, загрязненных тяжелыми металлами и органическими ксенобиотиками. Для этого измерялись такие параметры, как длина, проективное покрытие и биомасса листьев и биомасса корней. Влияние на эти параметры инокуляции разными методами на фоне загрязнения разных типов почв различными ксенобиотиками рассмотрено ниже.

2.1 Изучение развития растений при инокуляции *R. planticola* и загрязнении грунтов тяжелыми металлами

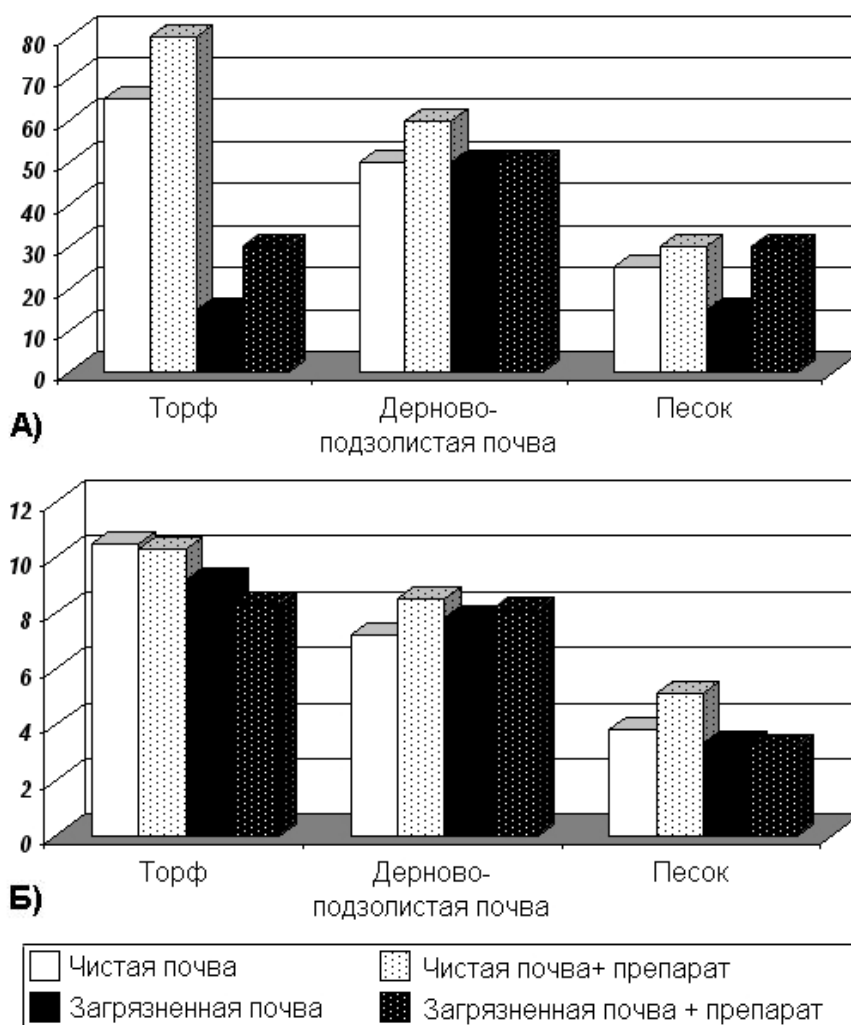


Рисунок 2. Влияние типа грунта, наличия ксенобиотика (смесь солей ТМ №1) и инокуляции *R. Planticola* на развитие смеси растений овсяницы трех сортов (травосмесь). А – проективное покрытие (%); Б – длина листьев (см).

На рис. 2 показаны результаты измерения основных параметров растений травосмеси в первом опыте, после 9 месяцев культивирования. Как видно из графиков, инокуляция растений, высаженных в загрязненную почву, в большинстве случаев оказала на них заметное положительное воздействие. В большинстве вариантов на загрязненной ТМ почве увеличилось проективное покрытие (рис. 2, Б). Несколько меньшее влияние оказала инокуляция на длину растений (рис. 2, А). Следует так же отметить значительное положительное влияние инокуляции на развитие корневой системы.

Во втором опыте были проведены аналогичные замеры после 40 дней культивирования. При этом в опыте использовалась только дерново-подзолистая почва и овсяница сорта “Золушка”. Полученные данные в целом аналогичны приведенным выше результатам первого опыта.

Как видно из рис. 3, на загрязненной ТМ почве инокуляция сравнительно слабо повлияла на длину листьев (рис. 3, А). Значительно большее влияние она оказала на проективное покрытие (рис. 3, Б). Биомасса листьев (рис. 4, А) практически не изменилась и даже несколько уменьшилась. Отдельно следует отметить влияние инокуляции на биомассу корней (рис. 4, Б) — на загрязненной почве при инокуляции замачиванием ее рост относительно неинокулированного контрольного растения составил более 300 процентов.

Таким образом, инокуляция бактериями *R. planticola* положительно сказывается на росте и развитии растений, культивируемых на субстратах, загрязненных солями тяжелых металлов. У инокулированных растений по сравнению с неинокулированными увеличивается биомасса корней, проективное покрытие и, в отдельных случаях, длина листьев. При этом максимальное положительное воздействие инокуляция оказывает именно на корневую систему (ее масса может увеличиваться в разы), и именно в грунтах с внесенными ТМ (прирост биомассы превосходит таковой при инокуляции растений в незагрязненном грунте).

2.2 Сравнение эффективности различных методов инокуляции

Очевидно, что методы инокуляции замачиванием семян и поливом всходов отличаются друг от друга коренным образом. В первом случае сравнительно небольшое количество бактерий попадает в почву непосредственно с семенами растений. При этом взаимодействие растений и микроорганизмов начинается фактически еще до прорастания семян. Во втором же значительно большее количество микроорганизмов вносится в почву, в которой уже находятся сформировавшиеся растения, причем они достаточно равномерно распределяются по всему объему корнеобитаемого слоя.

Не удивительно, что такие разные методы инокуляции продемонстрировали достаточно большие различия в воздействии на растения. Наблюдения, проведенные нами во втором опыте, показали, что влияние различных методов инокуляции на рост и развитие растений существенно отличается.

По полученным нами данным, инокуляция поливом всходов дала заметно лучшие результаты. На почве, загрязненной

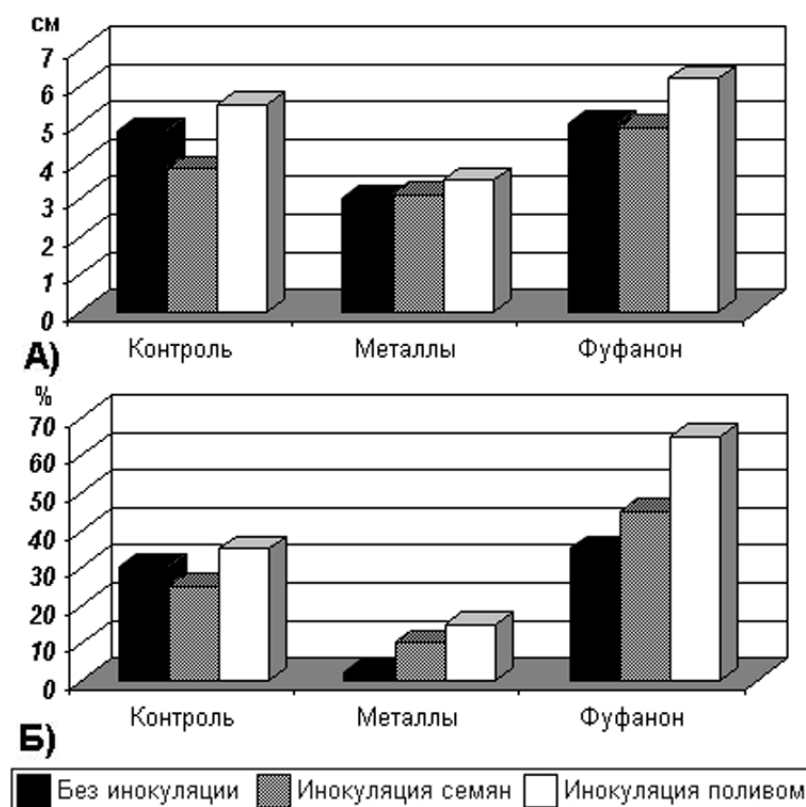


Рисунок 3. Воздействие различных методов инокуляции и загрязнителей на длину листьев и проективное покрытие растений овсяницы сорта “Золушка”. А - средняя длина листьев (см); Б - проективное покрытие (%).

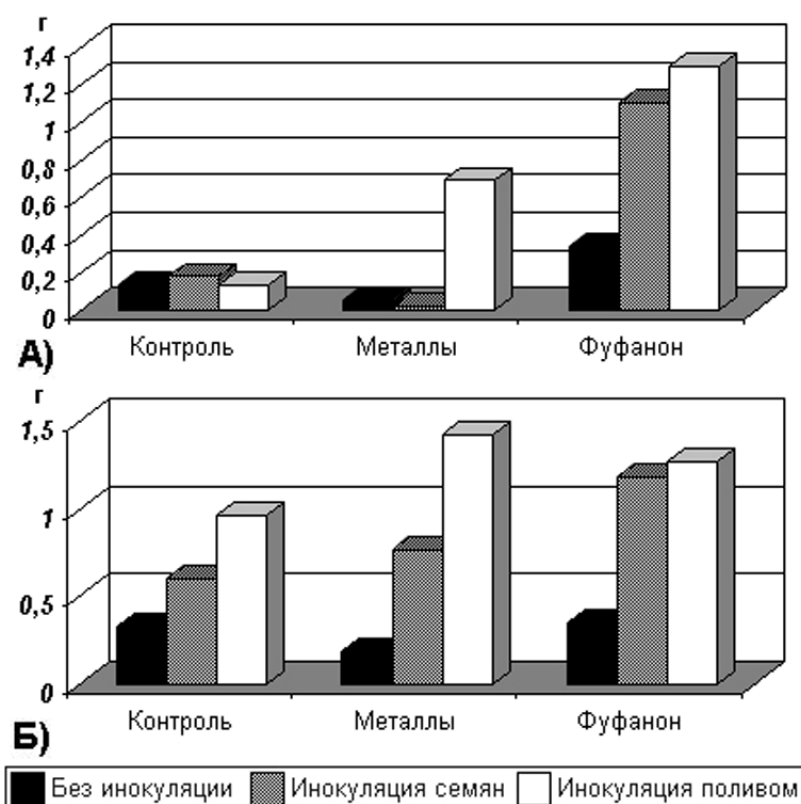


Рисунок 4. Воздействие различных методов инокуляции и загрязнителей на биомассу листьев и корней растений овсяницы сорта “Золушка”. А - биомасса листьев (г); Б - биомасса корней (г).

как тяжелыми металлами, так и органическим ксенобиотиком, обработанные таким образом растения демонстрируют заметное увеличение всех измеренных параметров как по сравнению с контрольными неинокулированными растениями, так и по сравнению с растениями, инокулированными замачиванием семян. В частности, на грунте, в который были внесены ТМ, прирост длины по сравнению с растениями, инокулированными замачиванием, составил 13%, проективного покрытия — 50%, а биомассы корней почти 200% (что в абсолютных цифрах является максимальным значением среди всех вариантов, в том числе и на почве без ТМ). Стоит так же отметить, что инокуляция поливом, в отличие от инокуляции замачиванием, не приводит к ухудшению развития листьев у растений на незагрязненной почве. Так, в варианте без загрязнителя, при инокуляции замачиванием длина листьев овсяницы упала на 21% относительно неинокулированного контроля, а проективное покрытие снизилось на 17%. В то же время, при инокуляции замачиванием на том же субстрате длина листьев растений увеличилась на 15% относительно контроля, а их проективное покрытие — на 17%.

Заметно отличалось так же влияние разных методов внесения микроорганизмов на соотношение массы листьев и корней. Как уже отмечалось выше, инокуляция замачиванием семян, стимулируя развитие корневой системы, практически не затрагивала листья. Более того, биомасса листьев в результате инокуляции даже несколько уменьшилась. За счет этого отношение массы листьев к массе корней в данном случае равнялось 0,03. Для сравнения, то же соотношение для неинокулированных растений на загрязненной почве составляло 0,26.

Гораздо лучшие результаты были получены при внесении бактерий методом полива всходов. Обработанные таким образом растения развивались значительно лучше как по абсолютным показателям, так и по соотношению листья/корни — в данном случае оно составило 0,49, в первую очередь за счет значительно лучшего развития листьев.

2.3 Изучение воздействия инокуляции *R. planticola* на развитие растений разных видов

Взаимодействие растений и микроорганизмов — достаточно сложный процесс, особенности которого зависят от множества факторов, в том числе и от видовой принадлежности участвующих в нем организмов. Вероятно, именно с этим были связаны некоторые различия в результатах, полученных при инокуляции разных видов растений в одинаковых условиях.

Так, в наших опытах, в результате инокуляции длина листьев при культивировании на дерново-подзолистой почве падала вне зависимости от наличия ТМ. Единственный вариант, в котором длина листьев “Золушки” при инокуляции увеличилась — незагрязненный речной песок. В то же время, при инокуляции травосмеси на песке и дерново-подзолистой почве наблюдалось увеличение длины листьев, падение отмечалось только на торфе. При этом оно было заметно меньше, чем у “Золушки”.

С проективным покрытием ситуация была иной. На торфе оба исследованных типа растений показали практически одинаковые результаты. Однако на дерново-подзолистой почве изменения, вызванные бактеризацией в развитии растений “Золушки” и травосмеси, весьма различались.

Таким образом, можно заключить, что инокуляция несколько по-разному влияет на различные виды растений, однако основные закономерности, такие как стимулирующее действие при загрязнении грунтов тяжелыми металлами, сохраняются.

2.4 Изменение реакции растений на инокуляцию в зависимости от типа субстрата

На различных субстратах (почва, торф и песок), как загрязненных, так и нет, влияние инокуляции на растения заметно отличается. В частности, длина листьев инокулированных растений, выросших на низинном торфе, была меньше, чем у неинокулированных, как в вариантах с тяжелыми металлами, так и без них. Для торфа так же было характерно очень сильное падение проективного покрытия при загрязнении ТМ, как для травосмеси, так и для “Золушки”.

Речной песок был единственным типом грунта, на котором инокуляция привела к росту длины листьев и увеличению проективного покрытия на субстрате без ТМ у всех растений, однако в целом он оказался самым неблагоприятным, растения на нем имели минимальную длину листьев и проективное покрытие, а так же наименее развитую корневую систему. Вероятно, причиной этого было малое количество нутриентов в песчаной почве, а так же низкая обменная емкость песка.

Данные по дерново-подзолистой почве оказались весьма неоднозначными. С одной стороны, “Золушка” на данной почве отреагировала на инокуляцию некоторым падением длины листьев и увеличила проективное покрытие. С другой — травосмесь на той же почве в результате инокуляции несколько увеличила длину листьев, тогда как увеличение проективного покрытия отмечалось только в варианте без ТМ, причем весьма незначительное.

Таким образом, можно сделать вывод, что различные типы грунта, в которых выращиваются растения, так же влияют на последствия инокуляции. При этом, однако, наблюдавшиеся ранее закономерности, как связанные с видовыми особенностями растений (например, падение длины листьев на торфе у травосмеси было меньше, чем у “Золушки”), так и с реакцией растений на внесение тяжелых металлов сохраняются.

3 Изучение влияния бактеризации на распределение ТМ в системе почва-растение

Изучение влияния симбиотических микроорганизмов на поглощение и накопление тяжелых металлов растением весьма важно для практического применения микробных биопрепаратов. Имеющиеся в литературе данные достаточно противоречивы. Разные исследователи наблюдали в результате

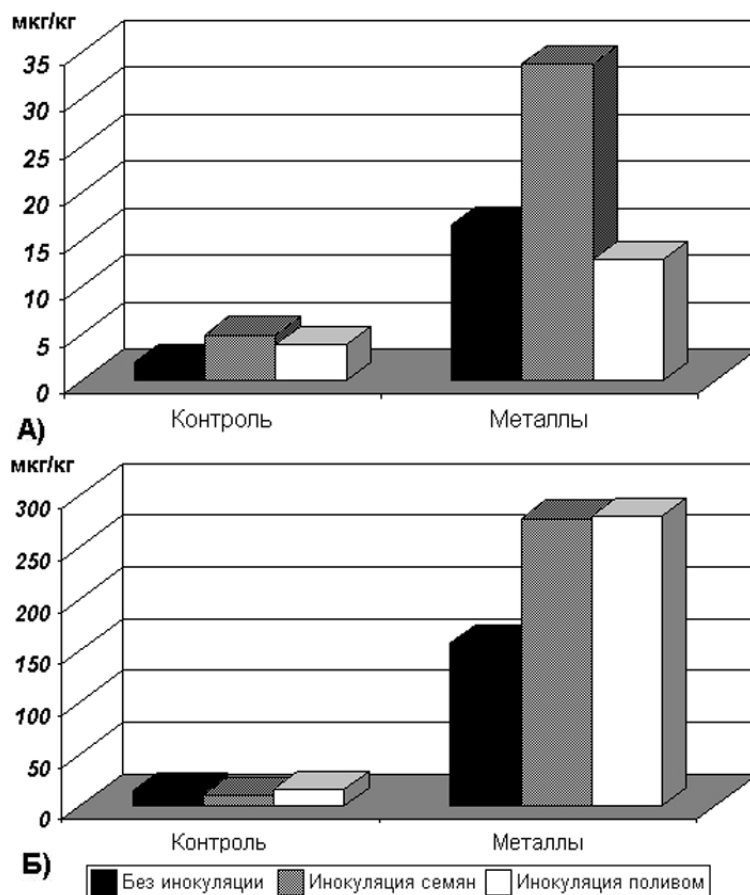


Рисунок 5. Влияние загрязнения почвы солями тяжелых металлов и инокуляции различными методами на содержание меди в растениях овсяницы красной сорта “Золушка”. А – концентрация меди в листьях (мкг/кг сухой массы); Б – концентрация меди в корнях (мкг/кг сухой массы).

инокуляции симбиотическими микроорганизмами как увеличение (Weinstein, 1995), так и снижение накопления растениями ТМ (Malcova et al., 2003; Al-Garni, 2005). Относительно *R. planticola* имеются данные, свидетельствующие, что она способна значительно снижать поступление кадмия в ткани растений (Емцев и др, патент; Соколова, 2006). Для того, чтобы уточнить, как *R. planticola* влияет на поступление других тяжелых металлов в растениях, нами было изучено влияние инокуляции на накопление меди и цинка в растениях овсяницы сорта “Золушка” на дерново-подзолистой почве.

На рис. 5 показано, как инокуляция влияет на концентрацию меди в корнях и листьях овсяницы, определенную при помощи атомно-абсорбционного анализа. Как видно из рисунка, концентрация Си в растениях на загрязненной почве оказалась более чем на порядок большей, чем на незагрязненной. Концентрация Си в корнях, как на загрязненной, так и на незагрязненной почве так же оказалась выше, чем в листьях почти в 10 раз.

Однако при этом как в корнях, так и в листьях инокуляция в большинстве случаев привела не к уменьшению, а к увеличению количества накопленной в тканях растения меди. Как видно из графика (рис. 7, Б), как инокуляция замачиванием, так и инокуляция поливом привели к весьма заметному увеличению концентрации меди в корнях. При этом и в том и в другом случае прирост был практически одинаков (+76,9% при инокуляции замачивани-

ем, +78,5% при инокуляции поливом). В то же время, динамика накопления Cu в листьях (рис. 7, А) оказалась не столь однозначной: инокуляция замачиванием вызвала рост более чем на 100% относительно неинокулированного контрольного варианта, тогда как инокуляция замачиванием — снижение на 22%.

Аналогичные данные были получены и по концентрации цинка. Инокуляция растений привела к росту концентрации цинка в корнях, составившему при инокуляции поливом 73 %.

Таким образом, инокуляция стабильно увеличивала концентрацию Cu и Zn в корнях, кроме того, инокуляция замачиванием увеличивала концентрацию этих металлов в листьях, тогда как инокуляция поливом снижала.

Возможно, полученные данные объясняются тем, что *R. planticola*, стимулируя общее развитие растительного организма, так же стимулирует работу некоторых его защитных систем, функционирование которых приводит к накоплению ТМ в тканях и органах.

Выводы:

1. Установлено, что интродуцированные в ризосферу растений овсяницы различных видов, бактерии *Raoultella planticola*, штамм ТСХА-91 Amp^R могут оказывать ростостимулирующее воздействие, компенсируя негативное влияние загрязнения почвы солями тяжелых металлов (Pb, Cu, Zn) на растения. При этом максимальное стимулирующее воздействие инокуляция оказывает на корневую систему, ее масса на загрязненной почве может увеличиться более чем в 4 раза по сравнению с неинокулированной. Проективное покрытие растений в результате интродукции бактерий так же заметно увеличивается (на 30 – 100%).

2. Показано, что внесение в почву тяжелых металлов снижает интенсивность миграции бактерий *R. planticola* в корни растений. В то же время, загрязнение тяжелыми металлами и ксенобиотиками стимулирует увеличение общей численности ассоциативных diaзотрофов за исключением *R. planticola* в тканях корней и листьев растений.

3. Выявлено, что выращивание растений, инокулированных *R. planticola* на загрязненной тяжелыми металлами почве, оказывает положительное влияние на почвенную микрофлору, увеличивая интенсивность дыхания (субстратиндуцированного дыхания — на 28% относительно варианта без инокуляции, базального — в 50 раз) и микробную биомассу (+ 28%), а так же нормализуя метаболический коэффициент.

4. Выявлено, что растения овсяницы красной сорта “Золушка”, инокулированные *R. planticola*, накапливают в корнях больше меди и цинка, чем неинокулированные. Увеличение концентрации может достигать 73% при инокуляции по Zn и 78% по Cu.

5. Установлено, что основные эффекты бактеризации, такие как общее стимулирующее влияние на растения, культивируемые на загрязненной почве и значительно более сильное стимулирующее влияние на корневую систе-

му, сохраняются на разных типах грунта (песок, торф или почва), при воздействии разных типов загрязнителей (соли ТМ или фосфорорганический пестицид), а так же на растениях разных видов.

6. Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что инокуляция бактериями *Raoultella planticola*, штамм ТСХА-91 Amp^R, может обеспечить повышение жизнеспособности газонных трав в условиях загрязнения грунта ТМ и органическими ксенобиотиками, характерного для современного города. При этом инокуляция методом полива всходов более эффективна, чем инокуляция при помощи замачивания семян. Следует, однако, учесть, что инокуляция приводит к повышению концентрации тяжелых металлов в тканях обработанных растений. Это несколько ограничивает применение *R. planticola* для защиты кормовых и пищевых растений, однако делает данный метод защиты растений весьма перспективным для фиторемедиации почв.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Колесников О.В., Тимохина Т.П. Влияние бактеризации на устойчивость растений к тяжелым металлам // Известия ТСХА, N4, –2011. С. 24 – 29.
2. Колесников О.В., Тимохина Т.П. Исследование протекторных свойств биопрепарата “Биоплант-К” на почвах, загрязненных тяжелыми металлами // Информационное пространство современной науки. Материалы II международной заочной научно-практической конференции. 18 сентября 2010 года. Отв. ред. Волкова М.В. Чебоксары, НИИ педагогики и психологии, –2010 г, с. 156 – 159.
3. Колесников О.В., Тимохина Т.П. Влияние инокуляции *Klebsiella planticola* на устойчивость растений к ксенобиотикам // Сборник молодежного научного экологического форума "Анализ причин и последствий засухи и пожаров 2010 года: приоритетные проблемы и пути их решения", М. –2010, с. 10 – 12.