

О.М. Минаева, Е.Е. Акимова, С.Ю. Семенов

**АНТАГОНИСТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НА ФИТОПАТОГЕННЫЕ
ГРИБЫ И СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ
РАСТЕНИЙ ФОРМАЛЬДЕГИДУТИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ
Pseudomonas sp. B-6798**

Аннотация. Показаны кинетические аспекты взаимоотношений бактерий *Pseudomonas* sp. B-6798 с растением-хозяином и фитопатогенными грибами. Кинетика ингибирования роста грибов рода *Fusarium* и *Bipolaris* бактериями описывается модифицированным уравнением Н.Д. Иерусалимского. Количественно антифунгальный эффект бактериальных штаммов при проведении лабораторных тестов может быть оценен с помощью константы ингибирования (K_i). Зависимость параметров роста и развития растений от логарифма концентрации бактерий в инокуляте в лабораторных тестах принимает вид выпуклой кривой с максимумом. Лабораторные тесты и полевые испытания позволяют рекомендовать бактерии штамма *pseudomonas* sp. B-6798 к применению в качестве агента биофунгицида против возбудителей корневых гнилей зерновых культур, обладающего одновременно стимулирующими рост и развитие растений свойствами.

Ключевые слова: *Pseudomonas*, ризобактерии, антифунгальная активность, ростостимулирующая активность, кинетика ингибирования, антагонизм.

В связи с биологизацией и экологизацией сельскохозяйственного производства направление по созданию биопрепаратов для защиты растений становится все более актуальным [1–4]. Существует множество биологических функций микроорганизмов, направленных на осуществление биосинтеза метаболитов различного действия. Потенциальным объектом агробиотехнологии являются ризосферные PGPR (от Plant Growth-Promotion Rhizobacteria), широко используемые для разработки биологических средств защиты растений от фитопатогенов, а также биопрепаратов, стимулирующих рост и повышающих продуктивность растений. Механизм действия этих микроорганизмов на фитопатогены включает конкуренцию за источник питания, эффективную колонизацию ризосферы, синтез антибиотических и рострегулирующих веществ [2–4]. Над расширением ассортимента микробиологических препаратов, изысканием путей их совершенствования работают многие биотехнологические центры России [5].

Среди ризосферных бактерий особое место занимают бактерии рода *Pseudomonas*. О перспективах их практического применения можно судить по списку уже разработанных биопрепаратов («BlightBan A506», «BioSave», «Blue-Circle», «Intersept», «Victus», «Планриз», «Agat-25», «Псевдобактерин-2»), проявляющих высокую антагонистическую активность по отношению к фитопатогенным грибам и бактериям, а также способность к стимуляции роста сельскохозяйственных культур [3, 6].

Несмотря на все видимые преимущества, применение биологических средств защиты растений сдерживается их достаточно высокой стоимостью при учете нестабильности положительных эффектов, которая складывается из стоимости углеводсодержащих питательных сред и затрат на мероприятия

по обеспечению стерильности. В связи с этим возникает необходимость поиска новых микроорганизмов, которые могли бы использовать в качестве источника углерода и энергии менее дорогостоящие соединения, обеспечивающие одновременно стерильность процесса культивирования.

Таким образом, целью представленной работы являлось изучение формальдегидрезистентных бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 как агентов биоконтроля фитопатогенных грибов, а также стимуляторов роста растений.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись формальдегидрезистентные бактерии *Pseudomonas* sp. ВКПМ В-6798, выделенные из активного ила очистных сооружений Томского нефтехимического комбината и способные использовать формальдегид в составе минеральных сред в качестве единственного источника углерода и энергии в концентрации 267 М (8 г/л) [7].

Для оценки эффективности применения бактерий опытного штамма использовались бактерии *Pseudomonas fluorescens* ВКМ АР-33, которые являются активным началом биологического препарата «Планриз», официально рекомендованного к применению на территории РФ против грибных фитопатогенов [6]. При оценке антагонистической активности в качестве тест-объектов рассматривались фитопатогенные разновидности *Fusarium oxysporum* var. *lini* и *F. oxysporum* var. *gladioli*, предоставленные М.В. Штерншис (НГАУ, Новосибирск) из коллекции микроорганизмов кафедры биологических методов защиты растений Новосибирского агроуниверситета. Штамм фитопатогенного гриба *F. oxysporum* var. sp. был выделен в 1996 г. сотрудниками лаборатории биокинетики и биотехнологии НИИ ББ ТГУ с зерен пшеницы. Культура гриба *Biopolaris sorokiniana* предоставлена заведующей лабораторией микробиологии СибНИИ СХ и Торфа СО Россельхозакадемии Н.Н. Терещенко (Томск). Для оценки ростстимулирующей активности использовались семена: кукурузы сорта Молдавская-215 АМВ (средняя масса семени 0,5 г, общая всхожесть – 75%); пшеницы сорта Тулунская-12 (средняя масса зерна 0,03 г, общая всхожесть – 97%); овса сорта Нарымский-943 (средняя масса зерна 0,05 г, общая всхожесть – 93%).

Питательные среды и культивирование. Культивирование бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 проводилось на минимальной питательной среде М9 [8] с формальдегидом 2 г/л в колбе объемом 250 мл с 50 мл питательной среды. Культуры выращивались в термостате при $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ до достижения бактериальной численности $1-9 \cdot 10^9$ кл/мл. Контроль численности осуществлялся прямым подсчетом клеток в камере Горяева и посевом методом предельных разведений на плотную питательную среду с дальнейшим подсчетом КОЕ [9]. Бактерии *Pseudomonas fluorescens* АР-33 (биопрепарат «Планриз») были предоставлены лабораторией биологической защиты ФГУ «ФГТ станции защиты растений в Томской области». Для выращивания грибов использовался 20%-ный сусло-агар [9].

Изучение кинетики ингибирования бактериями роста фитопатогенных грибов. Предложенная методика исследования антифунгальной активности

позволяет проследить зависимость скорости роста грибов от титра бактерий в инокуляте [10]. Единым параметром оценки степени антифунгального влияния бактерий на грибы предложено использование константы ингибирования. В качестве измеряемого параметра, отражающего рост гифов грибов во времени, был взят диаметр колоний, образующихся на твердых агаризованных средах на чашках Петри при стандартизированной процедуре инокуляции. На чашки Петри с сусло-агаром газоном высевались бактериальные суспензии в объеме 0,1 мл. Концентрация бактерий в инокуляте составляла 10^1 – 10^9 кл/мл. После появления видимого бактериального роста для предотвращения физического контакта бактериальных и грибных колоний посеvy заливали тонким слоем среды (≈ 1 мм), затем на ее поверхность помещали агаровые блоки с мицелием гриба диаметром 1 мм равномерно по шаблону. Блоки вырезали из сплошного шестисуточного газона мицелия гриба цилиндрическим пробкорезом. Чашки инкубировали в термостате при температуре $24 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

Исследование влияния бактериальной концентрации на рост и развитие растений в вегетационных лабораторных экспериментах. В экспериментах была создана модель малых наземных искусственных систем, предложенная Л.А. Сомовой [11], состоящая из трех звеньев: стерильный песок, которым заполнялись вегетационные сосуды, – растение-хозяин – бактериальные штаммы в концентрациях 10^1 – 10^9 кл/мл. Предварительно обеззараженные и пророщенные семена помещались в пробирки, заполненные крупным стерильным речным песком ($12,5 \text{ см}^3$) и равномерно увлажнялись стерильным раствором Кнопа [12]. Инокуляция песка проводилась 0,1 мл бактериальных суспензий в концентрациях 10^1 – 10^9 кл/мл. Растения выращивали в фитокамерах при 12-часовом режиме освещения и температуре $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Проведение полевых экспериментов. В ходе экспериментов бактеризованные семена (кукурузы – путем замачивания в суспензиях с титром 10^4 , 10^6 кл/мл, овса и пшеницы – предпосевным увлажнением суспензией с титром 10^6 кл/мл) высевали на пробные площадки. Семена кукурузы высаживали на расстоянии 10–15 см друг от друга, пшеницу и овес высевали по норме 6 млн семян на 1 га. В ходе эксперимента снопиками по 10–15 растений проводили отбор равномерно по всей площади. В лабораторных условиях у отобранных растений измеряли длину, сухую биомассу и т.д. [13]. Полевые эксперименты с кукурузой и овсом были поставлены в вегетационный период 2004 г., с пшеницей – в сезоны 2003 и 2005 гг.

Статистическая обработка материала. Данные, полученные в ходе экспериментов, обрабатывались с помощью пакета STATISTICA (версия 6.0) и представлены в виде средней с доверительным интервалом с учетом критерия Стьюдента для 95% уровня значимости выборок с нормальным распределением и в виде медианы для неравномерно распределенных выборок. Сравнение данных параметров роста и развития растений в полевых экспериментах производим по непараметрическому критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$). Скорость роста грибных колоний на твердой питательной среде определяли с использованием линейного регрессионного анализа. Параметры уравнений для исследования кинетики ингибирования роста грибов бактериальными

штаммами и параметров роста растений вычислялись с использованием нелинейного регрессионного анализа [14].

Результаты и обсуждение

Кинетика ингибирования роста фитопатогенных грибов ризосферными бактериями in vitro. Фунгистатическая активность является достаточно распространенным признаком среди бактерий различных таксономических групп. Антифунгальная способность дает экологическое преимущество бактериальной популяции, которая конкурирует с микроскопическими грибами в специфической среде обитания. Практическое значение эта бактериальная черта нашла как в медицине, так и в сельском хозяйстве, где бактерии, обладающие антифунгальной активностью, широко используют в борьбе с различными почвенными фитопатогенными грибами (агенты защиты растений) [3]. Антифунгальная активность бактерий, обнаруженная *in vitro*, как правило, положительно коррелирует с их способностью ингибировать рост фитопатогенов *in vivo* [15], поэтому лабораторные эксперименты – это неотъемлемая часть и эффективный способ изучения взаимоотношений почвенных грибов с ризосферными бактериями. Однако большинство известных методик позволяет лишь оценить присутствие фунгистатического эффекта, не давая четкого представления о его степени [16].

Нами была предложена и апробирована методика, позволяющая численно оценить эффект подавления роста грибных колоний бактериями на твердых питательных средах в чашках Петри. В ходе экспериментов каждые 24 ч проводили измерение диаметра грибных колоний, образующихся на агаризованных питательных средах с различными концентрациями бактерий в инокуляте при стандартизированной процедуре инокуляции. На рис. 1 на примере гриба *Fusarium oxysporum* var. *lini* на среде с *Pseudomonas* sp. B-6798 показано увеличение диаметров колоний с течением времени.

Известно, что рост филоментозных организмов, т.е. увеличение их биомассы, не подчиняется экспоненциальному закону. Зависимость роста гифов грибов от времени линейна [11]. В наших экспериментах рост колоний грибов является линейным как в чашках с ложным высевом, так и в присутствии бактерий в различных концентрациях, причем с увеличением концентрации происходит замедление роста гриба, которое отражается в уменьшении наклона прямых.

За количественную оценку скорости роста гриба брали тангенс угла наклона прямых, отражающих изменение диаметра колоний с течением времени. Анализ полученных данных показал, что скорость роста грибных колоний с увеличением концентраций бактерий в чашках Петри стремится к предельному значению, не равному нулю, т.е. не наблюдается полного абсолютного ингибирования роста грибов бактериями изучаемых штаммов. В рассмотренных моделях взаимодействия грибов с бактериями достаточно концентрации 10^7 – 10^8 кл/мл для достижения предельного значения скорости роста грибов.

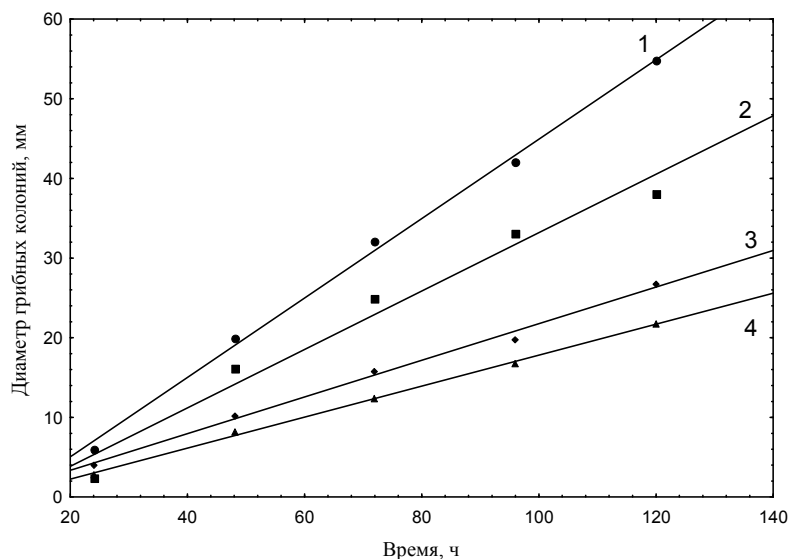


Рис. 1. Рост колоний гриба *Fusarium oxysporum* var. *lini* при различных концентрациях клеток *Pseudomonas* sp. штамм В-6798: 1 – в контроле (ложный посев); 2 – при концентрации бактерий в инокулюме 10^3 кл/мл; 3 – 10^6 кл/мл; 4 – 10^9 кл/мл

Согласно литературным данным, эффект ингибирования роста грибов бактериями рода *Pseudomonas* связан прежде всего с выделением псевдомонадами различных антибиотиков и сидерофоров (желто-зеленый пигмент, осуществляющий транспорт железа) [2, 4, 19]. Известно, что бактерии *Pseudomonas* sp. В-6798 синтезирует желто-зеленый пигмент [7], а эффект ингибирования роста грибных колоний уменьшается добавлением в среду соединений трехвалентного железа [10], поэтому нам представляется, что в эффекте ингибирования наибольшую роль занимает сидерофорный механизм.

Для описания кинетики ингибирования роста грибных колоний исследуемыми бактериями нами было использовано модифицированное уравнение Н.Д. Иерусалимского [17]:

$$V(C) = V_{\infty} + V_{\max} \frac{K_i^n}{K_i^n + C^n}, \quad (1)$$

где $V(C)$ – скорость увеличения диаметра колоний фитопатогенных грибов (мм/ч); V_{∞} – остаточная скорость роста гриба при «бесконечной» концентрации бактерий (мм/ч); $V_{\max}$ – кинетический параметр, отражающий скорость роста грибов в отсутствии бактерий и в сумме с V_{∞} , численно равный максимальной скорости роста данного гриба (мм/ч); K_i – константа ингибирования, численно равная концентрации бактерий, при которой достигается половина от максимального эффекта ингибирования (кл/мл); n – коэффициент нелинейности ингибирования; C – концентрация клеток бактерий в инокулюме (кл/мл).

Графическое отображение описанной модели представлено на рис. 2. Параметры уравнения для каждого вида грибов определялись методом нелинейного регрессионного анализа (табл. 1).

Из представленной таблицы видно, что коэффициент корреляции (R) находится на достаточно высоком уровне, что в целом говорит о значительном соответствии практически полученных данных примененной формуле для вычисления параметров ингибирования.

Об эффективности фунгистатического влияния изучаемых бактерий можно судить по константе ингибирования (K_i). Чем ниже данный параметр уравнения, тем чувствительнее гриб к данной бактерии и наоборот, чем больше значение константы, тем менее чувствителен к влиянию бактерии гриб. Наибольшей чувствительностью к присутствию бактерий обладал гриб *Bipolaris sorokiniana*. Значительный эффект ингибирования роста колоний этого вида гриба наблюдался на концентрациях порядка 10 кл/мл в инокуляте. В ряду рассмотренных разновидностей фитопатогенных грибов рода *Fusarium* наибольшей чувствительностью к бактериям *Pseudomonas* sp. B-6798 обладает фузариум, выделенный с зерен пшеницы (*F. oxysporum* var. sp.): концентрация клеток данного вида бактерий, выше которой не происходит заметного увеличения эффекта ингибирования роста колоний, составляет около ($\approx 10 \cdot K_i$) 175 кл/мл.

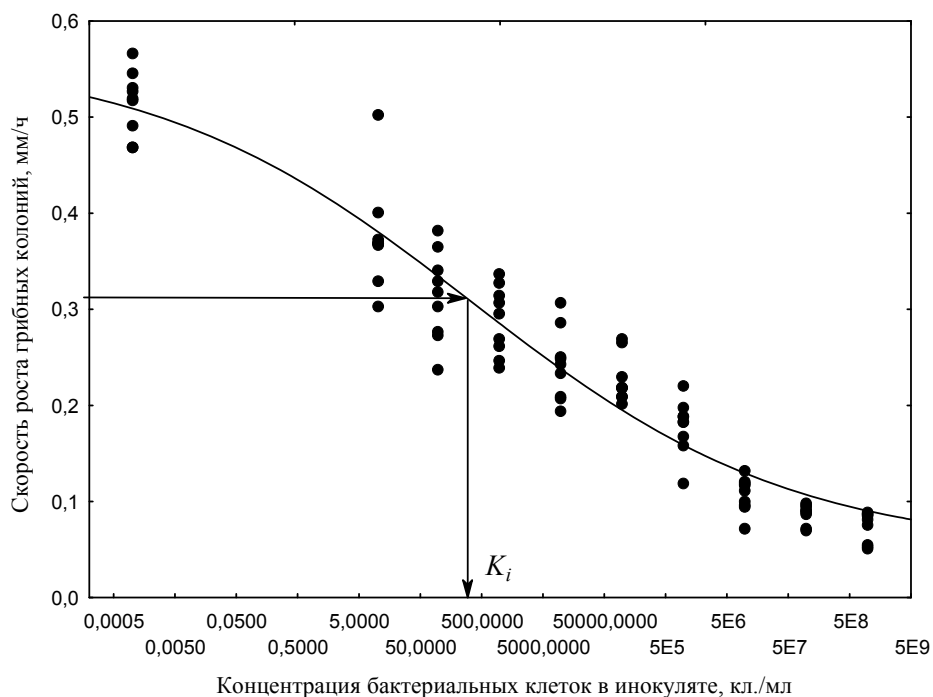


Рис. 2. Зависимость скорости роста колоний гриба *Fusarium oxysporum* var. *lini* от концентраций бактериальных клеток *Pseudomonas* sp. B-6798

Таблица 1

**Кинетические параметры ингибирования роста грибов бактериями
Pseudomonas sp. В-6798**

Вид гриба	K_{is} кл/мл	n , отн. ед.	V_{max} , мм/ч	V_{∞} , мм/ч	R , отн. ед.
<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>lini</i>	449,7±51,0	0,14±0,02	0,56±0,03	0,05±0,02	0,965
<i>Fusarium oxysporum</i> var. sp.	17,5±5,9	0,29±0,10	0,44±0,02	0,09±0,01	0,971
<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>gladioli</i>	396,3±25,4	0,14±0,02	0,51±0,05	0,02±0,01	0,953
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	5,4±1,0	0,08±0,04	0,14±0,02	0,08±0,02	0,875

О силе антифунгального действия бактерий можно также судить по остаточной скорости роста колоний гриба (V_{∞}). Анализируя этот параметр, можно судить о том, насколько полно подавляют рост гриба изучаемые виды бактерий. Наибольшее подавление роста грибных колоний бактериями опытного штамма наблюдалось в варианте с *F. oxysporum* var. *gladioli*, что иллюстрируют данные табл. 1.

Анализ представленных данных показал, что наблюдаются некоторые отличия в реакции грибов на присутствие бактериальных колоний. Наиболее явными они представляются при анализе параметров ингибирования роста колоний грибов разных родов (в нашем случае – грибы родов *Fusarium* и *Bipolaris*), хотя в менее отчетливой форме они существуют даже внутри одного вида (рассмотренные разновидности фузариума). Можно предположить, что для изучения параметров ингибирования роста колоний гриба определенного рода недостаточно эксперимента на одном из его видов, константа ингибирования варьирует, по нашим наблюдениям, даже в пределах вида. Однако для оценки присутствия антифунгального эффекта в целом эксперимент на одной разновидности достаточно показателен для всего вида.

Влияние бактерий штамма Pseudomonas sp. В-6798 на кинетические параметры роста растений в модельных экспериментах. В литературных источниках широко представлены сведения, описывающие положительное влияние на рост и развитие растений бактерий, отнесенных к ризосферным или тяготеющих к зоне ризосферы [3, 5, 11]. Нами был поставлен ряд экспериментов с использованием метода малых наземных экосистем [11], направленных на изучения влияния *Pseudomonas* sp. В-6798 на рост и развитие растений пшеницы, овса и кукурузы в лабораторных условиях. В ходе экспериментов каждые 24 часа проводились замеры длины наземной части растений. Данные о росте пшеницы представлены на рис. 3 на примере изменения длины растений вариантах с инокуляцией бактериями *Pseudomonas* sp. В-6798 с титром 10^6 кл/мл.

Как известно, рост любого органа, как и самого растения в целом, описывается в виде S-образной (сигмоидальной) кривой Сакса. Из множества количественных моделей роста растений наибольшее распространение получила логистическая функция [18]. Логистическая кривая имеет симметричный характер, т.е. скорость роста на начальном этапе увеличивается так же быстро, как и падает на заключительном этапе развития растения или органа. Если рост на начальном этапе замедлен, то кривая приобретает экспоненциальный вид.

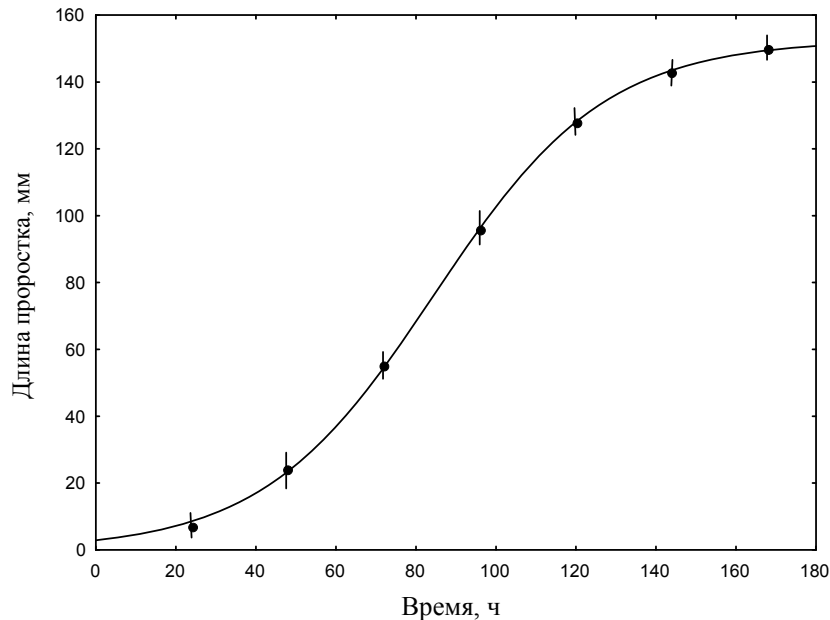


Рис. 3. Изменение длины вегетативной части пшеницы с течением времени

Рост растений пшеницы на изучаемой нами стадии (прорастание—фаза выхода третьего листа) соответствует S-образной кривой (см. рис. 3). Для описания данной кривой нами было использовано следующее логистическое уравнение [19]:

$$y(t) = \frac{Ae^{rt}}{B + x_0e^{rt}}, \quad (2)$$

где y соответствует длине проростка с течением времени (мм); t — время (ч); r — скорость удлинения проростка (мм/ч); x_0 — «минимальная» длина проростка, соответствующая длине проростка после активации зерна в течении 24 ч (мм); A — константа уравнения, численно соответствующая произведению минимальной длины проростка на максимально возможную в условиях эксперимента (мм): $A = x_0 \cdot x_{\max}$; B — константа уравнения, численно соответствующая разности минимальной длины проростка из максимальной (мм): $B = x_{\max} - x_0$. Рост проростков овса также соответствовал описанному логистическому уравнению.

Рост проростков кукурузы соответствовал экспоненциальному закону [19]:

$$L = L_0 e^{rt}, \quad (3)$$

где L — длина вегетативной части растения (мм); L_0 — длина проростка кукурузы после активации зерна в течение 24 ч, «минимальная» длина (мм); r — скорость удлинения растения (мм/ч); t — время (ч).

Кинетические параметры роста проростков кукурузы, пшеницы и овса определялись методом нелинейного регрессионного анализа. Анализ данных показал, что бактерии по-разному изменяют параметры экспоненциального и логистического роста растений.

В экспериментах с кукурузой в присутствии бактерий наблюдается значимое увеличение L_0 , поэтому растения в опытных вариантах на момент окончания эксперимента обладают большей длиной вегетативной части, несмотря на то, что скорость роста проростков незначимо отличаются от контроля (рис. 4). Зависимость начальной длины растения (L_0) от концентрации, представленной в логарифмическом виде, можно описать выпуклой кривой с экстремумом, который приходится на концентрации бактерий, значения параметра в которых максимальны.

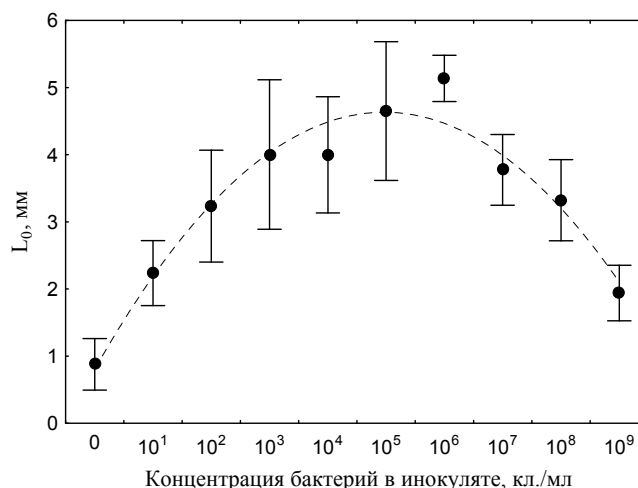


Рис. 4. Влияние концентрации бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 в инокуляте на длину проростка кукурузы после активации зерна в течение 24 ч

Рост и развитие растений проходят в конкретных условиях среды. Взаимодействие генотипа и среды определяется, с одной стороны, способностью организма реализовывать определенное значение признака в различных, как оптимальных, так и стрессовых условиях (норма реакции генотипа), а с другой – силой действия на организм фактора среды или их совокупности. Количественно реакция генотипа по величине признака на один фактор среды выражается кривой оптимума [18]. Кривые толерантности, или кривые оптимума, согласно закону толерантности, сформулированному В. Шелфордом, зависят от условий среды и оказывают влияние на скорость протекания биологических процессов. Кривая оптимума имеет колоколообразный вид. В зоне оптимума значение признака максимально, в зонах максимума или минимума – минимально.

Полученная кривая соответствует закону толерантности и может быть описана представленной кривой оптимума. В зону оптимума попадают концентрации бактериальных клеток 10^4 – 10^7 кл./мл.

Анализ кинетических параметров логистического роста овса и пшеницы показал, что параметром, на котором можно проследить отчетливое влияние бактериальной концентрации, является максимально возможная в условиях эксперимента длина проростка ($x_{\max}$). Распределение этого параметра под действием бактериальной концентрации, представленной в логарифмическом виде, также имеет вид выпуклой кривой с экстремумом.

Аналогичным образом была описана логистическая кривая роста корней кукурузы. Полученная зависимость $x_{\max}$, как и в вегетационных экспериментах, может быть описана выпуклой кривой с экстремумом, который приходится на оптимальные для роста корней бактериальные концентрации (10^4 – 10^6 кл./мл) (рис. 5).

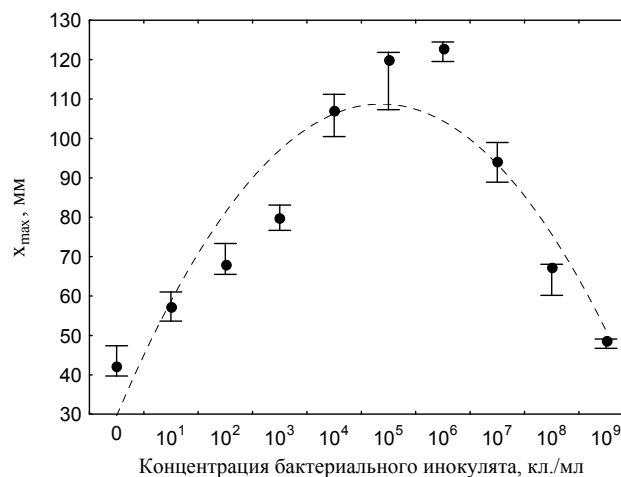


Рис. 5. Зависимость максимальной длины корня от концентрации бактерий *Pseudomonas* sp. B-6798 в инокуляте

Влияние обработки бактериальных культур на развитие растений в лабораторных экспериментах. По окончании экспериментов, где проростки кукурузы, пшеницы и овса указанных выше сортов проращивались в вегетационных сосудах, были произведены замеры следующих параметров: длина основного корня (для кукурузы); суммарная длина корневой системы (для овса и пшеницы), количество корней второго порядка; сухая биомасса растения. Зависимости исследуемых параметров от концентрации бактериальных культур, как правило, принимают вид кривой с перегибом. В табл. 2 приведены данные о бактериальных концентрациях, в которых отмечен пик эффекта стимуляции, максимальном значении измеряемого параметра и его отношении к контролю в вегетационном эксперименте с кукурузой и с пшеницей. Оптимальными концентрациями бактерий во всех вариантах для кукурузы оказались 10^5 , 10^6 кл./мл. Для пшеницы наибольший эффект на параметры развития оказала концентрация 10^4 кл./мл. В целом зона оптимума бактериальных клеток для развития растений соответствует зоне оптимума, показанного для параметров кинетического роста этих сельскохозяйственных культур.

Т а б л и ц а 2

**Оптимальные концентрации бактериальных культур, максимальное значение
измеряемых параметров развития растений**

	Параметр	Вариант	Оптимальная концентрация, кл/мл	Максималь- ное значение	Отношение к контролю
Пшеница	Суммарная длина корней, мм	<i>Pseudomonas</i> sp. B-6798	10 ⁴	294,3±55,2	1,6
		Планриз	10 ⁴	224,1±55,2	1,2
	Сухая биомасса, г	<i>Pseudomonas</i> sp. B-6798	10 ⁴	0,30±0,04	2,1
		Планриз	10 ⁴	0,23±0,04	1,6
Кукуруза	Длина главного корня, мм	<i>Pseudomonas</i> sp. B-6798	10 ⁵	100,4±7,6	2,8
	Кол-во корней второго порядка, шт.	<i>Pseudomonas</i> sp. B-6798	10 ⁶	17±2	2,1
	Сухая биомасса, г	<i>Pseudomonas</i> sp. B-6798	10 ⁶	0,65±0,03	5,0
Овес	Суммарная длина корней, мм	<i>Pseudomonas</i> sp. B-6798	10 ¹	200,6±42,3	2,7
	Сухая биомасса, г	<i>Pseudomonas</i> sp. B-6798	10 ²	0,42±0,08	2,1

Концентрация псевдомонад опытного штамма для растений овса, в которых наблюдаются максимальные значения параметров развития, находятся на уровне 10–100 кл/мл. Такой низкий диапазон оптимальных бактериальных концентраций для овса можно объяснить тем, что корневые выделения овса мало привлекательны для данных бактерий или имеют достаточно малое содержание соединений, которые могли бы использовать бактерии *Pseudomonas* sp. B-6798 в качестве источника углерода и энергии. В более высоких концентрациях нами не только не отмечено эффекта стимуляции, но и наблюдалось частичное ингибирование параметров роста растений. Некоторое ингибирование отмечено также для отдельных параметров развития кукурузы в концентрациях 10⁸–10⁹ кл/мл. Известно, что дефицит в почве того или иного элемента минерального питания может вызвать ситуацию, когда ризосферные микроорганизмы будут выступать реальными конкурентами по отношению к корням растений [11]. Это может произойти в результате более эффективного поглощения микробными клетками минеральных элементов из почвенных растворов или из-за повышенной в этих условиях скорости экзосмоса органических соединений корнями.

Таким образом, вероятным нам представляется, что концентрация PGPR, приходящаяся на зону оптимума для каждого вида бактерий, может варьировать. Кроме того, она в меньшей степени изменяется непосредственно для вида растения-хозяина.

Влияние ризосферных бактерий на рост и развитие кукурузы, пшеницы и овса в полевых экспериментах. Проведение полевого эксперимента позволило выявить влияние бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 на рост и развитие растений в естественных условиях.

В целом можно отметить положительное влияние бактериализации семян на параметры развития растений. За исключением полевого сезона 2005 г., наблюдается достоверное увеличение длины растений, сухой биомассы под действием ризосферных бактерий в среднем на 30–80% по отношению к растениям без бактериализации (табл. 3). Достаточно низкое влияние бактерий на развитие пшеницы в сезон 2005 г. можно объяснить благоприятными погодными условиями вегетационного сезона, позволившими растениям в контрольных и опытных вариантах достигнуть максимально возможной в данных условиях длины, т.е. реализовать ресурсный параметр. Следует также отметить, что эксперименты с пшеницей в приведенные годы проводились в разных почвенно-климатических зонах, поэтому не исключено, что более тяжелые почвы, на которых произрастала пшеница в 2005 г., являлись неблагоприятным фактором для процесса корневой колонизации.

Таблица 3

**Параметры развития растений и их увеличение
по отношению к контролю в полевых экспериментах**

Культура, год эксперимента	Параметр	Вариант	Значение	Отношение к контролю
Овес, 2004 г.	Длина растений, мм	Планриз	80,7±19,2*	1,5
		<i>Ps. sp</i> В-6798	75,9±4,2*	1,4
	Сухая биомасса, г	Планриз	1,97±0,17*	1,3
		<i>Ps. sp</i> В-6798	2,12±0,13*	1,4
Кукуруза, 2004 г.	Сухая биомасса, г	<i>Ps. sp</i> В-6798, 10 ⁴ кл/мл	127,5±11,4*	1,4
		<i>Ps. sp</i> В-6798, 10 ⁶ кл/мл	146,9±3,0*	1,6
Пшеница, 2003 г.	Длина растений, см	Планриз	67,4±3,9*	1,1
		<i>Ps. sp</i> В-6798	82,1±2,2*	1,4
	Сухая биомасса, г	Планриз	1,38±0,03*	0,9
		<i>Ps. sp</i> В-6798	2,33±0,14*	1,6
Пшеница, 2005 г.	Длина растений, см	Планриз	81,5±1,9	1,0
		<i>Ps. sp</i> В-6798	83,4±1,9	1,0
	Сухая биомасса, г	Планриз	2,31±0,12	0,9
		<i>Ps. sp</i> В-6798	2,95±0,35	1,2

* $p < 0,05$.

Несмотря на то что в данном сезоне не удалось достигнуть статистически значимого отличия длины и биомассы растений по окончании эксперимента, рост бактеризованных растений до начала кущения значительно опережал контрольный. Это связано со стимуляцией роста растений бактериями именно на ранних этапах развития последних, поскольку численность бактерий в

зоне ризосферы в этот период максимальна (в дальнейшем возможно их значительное вытеснение из ризосферы аборигенными видами).

По нашим данным, при бактеризации псевдомонадами растения быстрее проходят фазы развития, достигая цветения в более короткие сроки, когда удлинение вегетативной части практически прекращается. Так, начало цветения впервые отмечено в варианте с обработкой опытным штаммом псевдомонасы, а затем в варианте с планризом.

Полевые эксперименты, проведенные с растениями овса и кукурузы, показали, что бактеризация семян привела к увеличению параметров развития растений, начиная с фазы проростков; положительное действие бактерий отмечается до окончательного замера длины вегетативной части и сухой биомассы.

На основании данных, полученных в фазу полной спелости, нами была вычислена урожайность пшеницы [20].

На рис. 6 представлена урожайность пшеницы в различных вариантах полевого эксперимента 2005 г.

Хотя параметры развития бактеризованных растений практически не отличаются от контрольного варианта в фазу полной спелости, наблюдается увеличение урожайности пшеницы. На ее увеличение в большей мере оказало влияние увеличение количества зерен в колосе и рост значений массы 1000 зерен.

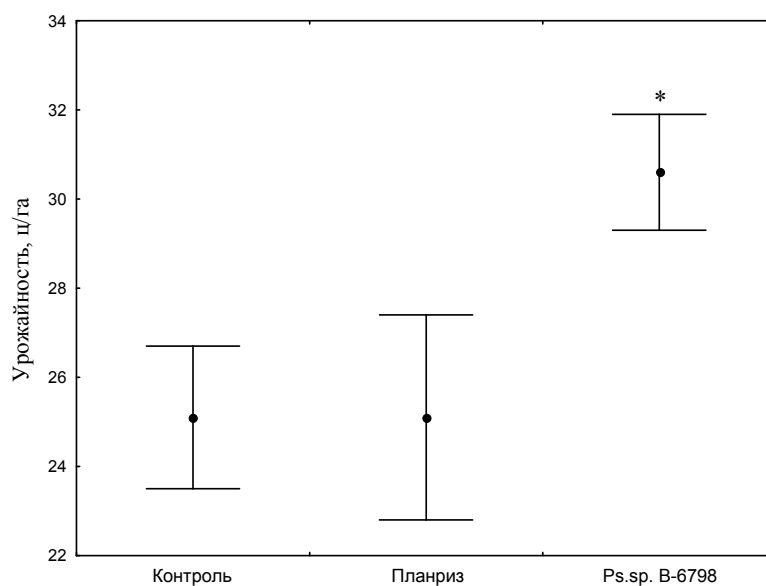


Рис. 6. Урожайность пшеницы в различных вариантах полевого эксперимента 2005 г.
Звездочкой отмечено статистически значимое отличие $p < 0,05$

Данные полевых испытаний подтверждают полученный в лабораторных экспериментах эффект стимуляции роста и развития пшеницы, овса и кукурузы бактериями формальдегидрезистентного штамма *Pseudomonas* sp. В-6798.

В процессе полевых и лабораторных экспериментов бактерии опытного штамма оказывали на рост и развитие растений больший эффект, чем широко применяемые в России бактерии *P. fluorescens* AP-33, являющиеся активным началом биопрепарата «Планриз».

Высокая антагонистическая активность по отношению к фитопатогенным грибам *Pseudomonas* sp. В-6798 может служить основанием для разработки биологического препарата с полифункциональными свойствами.

При выращивании бактерий на среде, содержащей формальдегид, стоимость препарата на их основе снижается на 25–30% по сравнению с аналогичными биопрепаратами за счет уменьшения затрат на обеспечение стерильности процесса культивирования. При этом биологическая эффективность от применения препарата на основе бактерий штамма *Pseudomonas* sp. В-6798 на 10–60% выше аналогового биопрепарата «Планриз».

Литература

1. Надыкта В.Д. Перспективы биологической защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов // Защита и карантин растений. 2004. № 6. С. 26–28.
2. Боронин А.М., Кочетков В.В. Биологические препараты на основе псевдомонад // АГРО XXI. 2000. 140 с.
3. Штерншис М.В., Джалилов Ф.С., Андреева И.В., Томилова О.Г. Биопрепараты в защите растений. Новосибирск, 2000. 128 с.
4. Benizri E., Baudon E., Guckert A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria // Biocontrol science and technology. 2001. № 11. P. 557–574.
5. Смирнов О.В. Многоцелевое действие биопрепаратов // Защита и карантин растений. 2006. № 2. С. 20–21.
6. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. М.: Федеральное агентство по сельскому хозяйству (Россельхоз) Минсельхоза РФ, 2005. 420 с.
7. Патент РФ 21022474. Штамм мителотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. ВКПМ В-6798, способный использовать формальдегид в качестве единственного источника углерода и энергии в бедной минеральной среде / Е.В. Евдокимов, М.В. Миронов, А.В. Евдокимов, И.Э. Макиенко, Е.В. Корниевская. 8 с.
8. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 438 с.
9. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. М.: МГУ, 1995. 224 с.
10. Гуцина Ю.А., Корниевская Е.В. Кинетика оценки антагонистического действия формальдегидутилизирующих псевдомонад на патогенные грибы рода *Fusarium*. Режим доступа: <http://psn.ru>, свободный.
11. Сомова Л.А. Функциональная и индикаторная роль гетеротрофных микроорганизмов в искусственных экосистемах: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Красноярск, 1999. 86 с.
12. Баславская С.С., Трубецкова О.Н. Практикум по физиологии растений. М.: Изд-во МГУ, 1964. 228 с.
13. Методические указания по проведению производственных испытаний средств и методов защиты зерновых культур от болезней // Приложение к защите и карантину растений. М.: МГУ, 2004. 23 с.

14. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
15. Georgakopoulos D.G., Fiddaman P., Leifert C., Malathrakis N.E. Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists// *Journal of applied microbiology*. 2002. № 92. P. 1078–1086.
16. Kerr J.R. Bacterial inhibition of fungal growth and pathogenicity // *Microbial ecology in health and disease*. 1999. № 11. P. 129–142.
17. Евдокимов Е.В. Динамика популяций в задачах и решениях: Учеб. пособие. Томск: ТГУ, 2001. 73 с.
18. Смиряев А.В., Мартынов С.П., Кильчевский А.В. Биометрия в генетике и селекции растений. Режим доступа: <http://library.timacad.ru>, свободный.
19. Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Математические модели биологических продукционных процессов. М.: Изд-во МГУ, 1993. 302 с.
20. Ковалев В.М. Теория урожая. Режим доступа: <http://library.timacad.ru>, свободный.