

Растительно-микробные взаимодействия в биологизированных агротехнологиях

УДК 633.16:631.8:579.64

doi: 10.15389/agrobiology.2016.3.335rus

МИКРОБНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ЭНДОФИТНЫХ И РИЗОБАКТЕРИЙ, КОТОРЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ У ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ (*Hordeum vulgare* L.) И ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР*

В.К. ЧЕБОТАРЬ^{1, 2}, А.Н. ЗАПЛАТКИН¹, А.В. ЩЕРБАКОВ^{1, 2},
Н.В. МАЛЬФАНОВА², А.А. СТАРЦЕВА³, Я.В. КОСТИН³

Используемый нами подход, предполагающий сочетание эндофитных и ризобактерий при разработке микробных препаратов для растениеводства, позволяет формировать самодостаточные растительно-микробные системы, повышая эффективность сельскохозяйственного производства и снижая экологическую нагрузку на окружающую среду. В статье представлены данные по свойствам перспективных штаммов эндофитных и ризобактерий и их эффективности в вегетационных и полевых опытах. Ризобактерии выделяли из корней растений томата (*Solanum lycopersicum* L.) сорта Белла, эндофитные бактерии — из внутренних тканей стебля борщевика (*Heracleum sphondylium* L.). Для видовой идентификации изучаемых штаммов бактерий определяли нуклеотидные последовательности гена 16S-rРНК, а также культурально-биохимические свойства. В вегетационных опытах использовали среднеспелый сорт салата (*Lactuca sativa* L.) Ералаш и раннеспелый сорт редиса (*Raphanus sativus* L.) Дуро. Показано, что штамм *Bacillus subtilis* TR6 был активен против всех тестируемых фитопатогенных грибов. Зоны ингибирования составляли 17,4–48,2 мм. Практически все исследуемые штаммы были способны продуцировать ауксины, кроме штамма TR7. Наибольшая продукция ауксинов наблюдалась у штаммов TR9 и TR1 — соответственно 12,3 и 20,1 мкг/мл среды. Три из пяти изученных штаммов (*B. subtilis* HC8, *B. subtilis* B2G и *Azotobacter chroococcum* AZ7) достоверно увеличивали (на 15,2–34,2 %) биомассу у салата. Штаммы *B. subtilis* Ч-13 и *B. subtilis* TR6 недостоверно увеличивали урожай зеленой массы салата. Среди изученных штаммов следует отметить *B. subtilis* HC8, который достоверно увеличивал (на 15,2–42,1 %) урожай редиса и салата в вегетационных опытах. Применение микробных препаратов на основе эндофитных и ризобактерий может быть эффективным перспективным элементом современных технологий выращивания ячменя (*Hordeum vulgare* L.), существенно снижая себестоимость производства и улучшая эффективность применения минеральных удобрений при его возделывании. Так, урожай зерна ячменя сорта Данута (2-летние полевые опыты) при применении микробных препаратов на основе эндофитных и ризобактерий достоверно увеличился на 23,8–43,9 % по сравнению с контролем и на 11–29 % по сравнению с фоном, где вносились только минеральные удобрения. Эффективность использования азота из минерального удобрения при инокуляции семян ячменя перспективными штаммами эндофитных и ризобактерий увеличивалась на 11,7–22,1 %, фосфора на 5,1–10,3 %, калия на 10,2–19,4 %.

Ключевые слова: эндофитные и ризобактерии, микробные препараты, бациллы, фунгицидная активность, стимуляция роста, урожай зерна, коэффициент использования минеральных удобрений.

Современное высокоэффективное сельскохозяйственное производство невозможно без применения удобрений и средств защиты растений. Так, широкое использование минеральных удобрений, в первую очередь азотных, позволило за последние 50 лет более чем в 5 раз поднять урожайность основных сельскохозяйственных культур в развитых странах. Однако процесс получения и применения минеральных азотных удобрений наиболее энергоемкий — на него расходуется от 30 до 50 % всей энергии, потребляемой в сельскохозяйственном производстве. Последствия приме-

* Работы по выделению эндофитных и ризобактерий, изучению их фунгицидных свойств, способности продуцировать ауксины и различные ферменты, а также эффективности эндофитных и ризобактерий в вегетационных опытах выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-16-00146), работа по изучению эффективности эндофитных и ризобактерий в полевых опытах с яровым ячменем выполнена при государственной финансовой поддержке ведущих университетов Российской Федерации (субсидия 074-U01).

нения минеральных азотных удобрений негативны для здоровья человека, биоразнообразия почвенных микроорганизмов, при этом ухудшается плодородие почв, растет выброс парниковых газов, и только в Европе все это ежегодно требует компенсационных затрат в объеме от 70 до 320 млрд евро (1). Альтернативный дешевый и безопасный источник азота для сельскохозяйственного производства — биологический азот. Для России это особенно актуально, так как за последние 20 лет применение минеральных удобрений снизилось в 3-5 раз. При этом ситуация усугубляется тем, что производители сельскохозяйственной продукции не способны в достаточном количестве приобретать дорогостоящие минеральные удобрения и вынуждены использовать запасы азота, фосфора и калия в почве без их восполнения, что ведет к потере плодородия почв. Таким образом, научно обоснована необходимость обеспечить современное земледелие высокоэффективными микробными препаратами для обработки не менее 20 млн га, что определяется структурой посевных площадей Российской Федерации и результатами многолетних испытаний эффективности микробных препаратов (2-5).

Внимание ученых привлечено к ассоциациям растений с полезными микроорганизмами с точки зрения не только изучения фундаментальных основ их взаимодействия, но и возможного использования таких взаимодействий в практике экологически ориентированного адаптивного растениеводства. Большинство работ направлено на изучение ризосферных микроорганизмов (6-8). Однако имеются микроорганизмы, существующие внутри растения, включая надземную часть и семена, так называемые эндофитные бактерии. Эндофитными могут называться бактерии, которые способны колонизировать внутренние ткани растения, не оказывая отрицательного влияния на его развитие и не вызывая заболеваний (9, 10). Из существующих на земле 300 000 видов растений каждый служит хозяином для одного и более видов эндофитных бактерий (11). Однако в настоящее время всего несколько видов растений достаточно полно изучены в отношении содержания в них эндофитных бактерий. Открываются большие перспективы по поиску, выделению и изучению видов эндофитных бактерий, положительно влияющих на развитие растений, с целью создания все более эффективных микробиологических препаратов для адаптивного растениеводства (12). Бактериальные эндофиты колонизируют в растении те же экологические ниши, что и фитопатогенные микроорганизмы, поэтому их также рассматривают в качестве перспективных агентов биоконтроля фитопатогенов (8, 12).

Использованный нами подход, предполагающий сочетание эндофитных и ризобактерий при разработке микробных препаратов для растениеводства, позволяет формировать самодостаточные растительно-микробные системы, повышая эффективность сельскохозяйственного производства и снижая экологическую нагрузку на окружающую среду.

Целью представляемой работы стало изучение хозяйственно ценных свойств эндофитных и ризобактерий из корней и внутренних тканей культурных и диких растений, создание образцов микробных препаратов на основе штаммов и сравнение действия перспективных и существующих микробных препаратов на ячмене и овощных культурах в вегетационных и полевых опытах для выявления эффективных вариантов.

Методика. При выполнении микробиологических исследований использовали приемы общей и технической микробиологии (13, 14).

Ризобактерии выделяли из корней растений томата (*Solanum lycopersicum* L.) сорта Белла. Корни промывали в проточной воде, помещали в колбы с 300 мл стерильной воды и встряхивали в течение 2 ч на качалке (200 об/мин). Отбирали по 1 мл из каждой колбы для приготовления серийных разведений (до 10^{-5}), по 100 мкл из каждого разведения высевали

на триптон-соевый агар (TSA, «Sigma», США), разведенный в 20 раз (0,5× TSA). Чашки культивировали 3 сут при 28 °С. Для выделения эндофитных бактерий из внутренних тканей стебля борщевика (*Heracleum sphondylium* L.) использовался метод поверхностной стерилизации. Очищенный образец стебля промывали 10 мин в 70 % этаноле, 5 мин — в 10 % гипохлорите натрия и 5 раз — в стерильной водопроводной воде. После стерилизации образец асептически разрушали, используя стерильные пестик и ступку. Для подтверждения успешности стерилизации делали смывы с поверхности тканей и высев полученных проб на агаризованную картофельную среду (PDA, «Sigma», США). Из сока борщевика готовили ряд последовательных разведений и высевали на картофельную среду в чашки Петри (в 3 повторностях).

Протеазную активность выделенных штаммов эндофитных и ризобактерий изучали на чашках со средой 0,5× TSA, обогащенной 5 % молока. Липазную активность определяли на чашках с 0,5× TSA с добавлением 2 % Tween 80, глюканиазную активность — на 0,5× TSA с лихенаном, целлюлазную — на 0,5× TSA с Na-карбоксиметилцеллюлозой, хитиназную — на чашках с хитином (15). Продукцию ауксинов определяли колориметрическим методом (16). Исследуемые штаммы вносили в жидкую среду Кинга («Sigma», США), содержащую триптофан (250 мкг/мл), и инкубировали 4 сут при 28 °С на качалке (150 об/мин). Выросшие культуры центрифугировали 10 мин при 13000 об/мин, 1 мл супернатанта добавляли в пробирку с 2 мл реактива Сальковского и 25 мкл ортофосфорной кислоты. Смесь оставляли на 30 мин при комнатной температуре и измеряли интенсивность развившегося розового окрашивания на спектрофотометре Specord S100 («Analytik Jena AG», Германия) при $\lambda = 530$ нм. Содержание индол-3-уксусной кислоты (ИУК) определяли по градуировочному графику.

При видовой идентификации изучаемых штаммов эндофитных и ризобактерий определяли нуклеотидные последовательности гена 16S-rРНК (17). Для ПЦР-амплификации фрагментов использовали универсальные эубактериальные праймеры FD1 и RD1 (18). Амплифицированные фрагменты ДНК выделяли из агарозного геля (19), затем определяли их нуклеотидные последовательности с использованием автоматического секвенатора SEQ2000 XL («Beckman Coulter», США) в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями базы данных GeneBank с помощью программы BLAST (20).

Общий титр штаммов эндофитных и ризобактерий учитывали методом серийных разведений на чашках со средой TSA («Sigma», США). Для мониторинга хозяйственно ценных свойств у перспективных штаммов эндофитных и ризобактерий использовали биотесты по стимуляции роста проростков у кукурузы (*Zea mays* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum*) согласно описанию (18), а также по подавлению развития фитопатогенных грибов *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL), *F. solani* и *Phytophthora ultimum* LBOP17 (определение зон задержки роста методом лунок при диффузии в агаре).

Эффективность микробных препаратов в вегетационных и полевых опытах изучали по общепринятой методике (19).

В вегетационных опытах использовали среднеспелый сорт салата (*Lactuca sativa* L.) Ералаш и раннеспелый сорт редиса (*Raphanus sativus* L.) Дуро. При подготовке субстрата дерново-подзолистую супесчаную почву, взятую на опытном поле Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСХМ), смешивали с торфяным грунтом марки Терравита (ЗАО «МНПП Фарт», Россия) (20 % + 80 %) и добавляли раствор азофо-

ски (NPK 16:16:16, ОАО «Акрон», Россия) из расчета 100 % NPK. Вегетационные сосуды объемом 3 л с помещенным в них субстратом (по 5 кг) однократно проливали водопроводной водой (700 мл). Семена редиса проращивались в течение 48 ч при температуре 28 °С. Непосредственно перед посадкой проростки салата на 15 мин замачивали в суспензии ризо- и эндофитных бактерий (10^7 КОЕ/мл). Семена салата (без проращивания) непосредственно перед посадкой замачивали на 15 мин в бактериальной суспензии (10^7 КОЕ/мл) следующих штаммов: *Bacillus subtilis* Ч-13 (стандарт, продуцент микробного препарата экстрасол), *B. subtilis* B2G (стандарт, продуцент микробного препарата Z24), *B. subtilis* TR6, *B. subtilis* HC8, *Azotobacter chroococcum* Az7. В контроле семена замачивали в стерильной воде. В подготовленный субстрат семена высаживали на глубину 1,5 см (по 2 шт. в лунку). Лунки располагались конвертом (по 5 лунок на сосуд). После посадки проводили однократный полив (500 мл). После появления всходов салата и редиса в сосуде оставляли по три растения. В процессе вегетации полив осуществляли каждые 3 сут по 100 мл. Урожай салата (надземная часть растений) учитывали через 44 сут, редиса (корнеплоды) — через 35 сут вегетации (собранные образцы взвешивали на электронных весах с точностью до 0,1 г).

Полевой опыт (Рязанская обл., 2013–2014 годы) по выращиванию ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Данута (по озимой пшенице сорта Мироновская 808 как предшественнику) проводили по общепринятой методике (19) в 4-кратной повторности на общей площади 460,8 м² (площадь одной делянки 9,6 м²). Почва участка серая лесная тяжелосуглинистая с высоким содержанием элементов питания. Анализ почвы осуществляли согласно ГОСТ 26483-85, ГОСТ 26213-19, ГОСТ 25336, ГОСТ 26207-91. Агротехника соответствовала общепринятой для культуры в южной части Нечерноземной зоны РФ. Фоновые удобрения вносили весной перед посевом поверхностно вразброс (по действующему веществу, кг/га: диаммофоска — 23, аммиачная селитра — 37). Микробные препараты применяли согласно рекомендациям разработчика. Схема опыта: 1-й вариант — без удобрений (контроль); 2-й вариант — N₆₀P₆₀K₆₀ (фон); 3-й вариант — экстрасол (*Bacillus subtilis* Ч-13, стандарт; разработчик — ВНИИСХМ; замачивание семян в 10 % растворе препарата); 4-й вариант — экстрасол + N₆₀P₆₀K₆₀; 5-й вариант — *B. subtilis* TR6; 6-й вариант — *B. subtilis* TR6 + N₆₀P₆₀K₆₀; 7-й вариант — *B. subtilis* HC8; 8-й вариант — *B. subtilis* HC8 + N₆₀P₆₀K₆₀. Почвенные образцы отбирали с каждой делянки (по 5 разовых проб, из которых составлялся средний образец). Эффективность использования минеральных удобрений определяли разностным методом (5).

Достоверность различий оценивали по Б.А. Доспехову (21).

Результаты. Всего из корней томатов выделили семь штаммов ризобактерий, из борщевика — штамм эндофитных бактерий HC8. Определение нуклеотидных последовательностей гена 16S-rPHK у изолятов позволило идентифицировать штаммы TR6 и HC8 как *B. subtilis* (23).

При анализе фунгицидной активности методом лунок было показано, что только штамм TR6 активен против всех тестируемых фитопатогенных грибов *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl), *F. solani*, *Pythium ultimum*. Диаметр зоны подавления роста составлял 17,4–48,2 мм.

Изучение энзиматической активности ризобактерий показало, что пять из семи изучаемых штаммов (кроме TR9 и TR1) обладали протеазной активностью, два (TR5 и TR6) — липазной, три (TR10, TR7 и TR6) — глюколазной активностью. Только у двух штаммов (TR7 и TR6) наблюдалась целлюлазная активность и ни один не проявлял хитиназную активность. Изучение продукции ИУК в присутствии триптофана как прекур-

сора ИУК подтвердило, что практически все исследуемые штаммы (кроме TR7) были способны выделять ауксины. Наибольшую продукцию ауксинов отмечали у штаммов TR9 и TR1 (соответственно 12,3 и 20,1 мкг/мл среды). По хозяйственно ценным свойствам (биоконтроль, стимуляция роста, ферментативная активность) для дальнейших исследований отобрали штамм TR6, идентифицированный как *B. subtilis*.

Ранее было показано, что штамм эндофитных бактерий *B. subtilis* HC8, выделенный из внутренних тканей растений борщевика, обладал комплексом хозяйственно ценных свойств и представлял интерес для использования в качестве микробного препарата, увеличивающего продуктивность культурных растений (23-25).

В этой связи мы изучили влияние отобранных ранее пяти перспективных штаммов эндофитных и ризосферных бактерий из родов *Bacillus* и *Azotobacter* на продуктивность редиса и салата. На растениях редиса наибольшую достоверную прибавку показали штаммы *B. subtilis* Ч-13 (стандарт, продуцент препарата экстрасол) и *B. subtilis* HC8 (эндофит борщевика) — соответственно 27,7 и 42,1 % (табл. 1). Штамм *B. subtilis* TR6, ранее отобранный как продуцент антифунгальных и ростстимулирующих веществ, достоверно (на 23,9 %) снизил урожай корнеплодов редиса. Другие исследованные штаммы *A. chroococcum* AZ7, *B. subtilis* B2G (стандарт, продуцент иностранного препарата Z24) недостоверно (соответственно на 15,3 % и 11,9 %) снижали урожай корнеплодов редиса.

1. Продуктивность редиса (*Raphanus sativus* L.) и салата (*Lactuca sativa* L.) при инокуляции перспективными штаммами эндофитных и ризосферных бактерий (вегетационный опыт)

Вариант	Редис (сорт Дуро)			Салат (сорт Ералаш)		
	масса корнеплода, г	прибавка урожая		урожай биомассы растений, г	прибавка урожая	
		г	%		г	%
Контроль	9,91			65,0		
<i>Bacillus subtilis</i> Ч-13 (продуцент препарата экстрасол)	12,66*	2,75	27,7	71,5	6,5	10,0
<i>Bacillus subtilis</i> B2G (продуцент препарата Z24)	8,73	-1,18	-11,9	75,9*	10,9	16,8
<i>Bacillus subtilis</i> TR6 (ризобактерия)	7,54	-2,37	-23,9	70,6	5,6	8,6
<i>Bacillus subtilis</i> HC8 (эндофит)	14,08*	4,17	42,1	74,9*	9,9*	15,2
<i>Azotobacter chroococcum</i> AZ7 (ризосферная бактерия)	8,39	-1,52	-15,3	87,2*	22,2	34,2
НСР ₀₅	1,90			9,3		

* Различия с контролем достоверны при $P < 0,05$.

Выбранный нами сорт салата оказался более отзывчивым на инокуляцию исследуемыми перспективными штаммами эндофитных, ризосферных и ризобактерий. Так, три из пяти исследуемых (HC8, B2G и AZ7) достоверно увеличивали (на 15,2-34,2 %) биомассу у салата. Штаммы *B. subtilis* Ч-13 и *B. subtilis* TR6 недостоверно увеличивали урожай зеленой массы салата. Среди изученных штаммов следует отметить штамм *B. subtilis* HC8, который достоверно увеличивал (на 15,2-42,1 %) урожай редиса и салата в вегетационных опытах.

Таким образом, вегетационные опыты на овощных культурах (салат и редис) показали, что штаммы эндофитных, ризосферных и ризобактерий, ранее отобранные по комплексу хозяйственно ценных свойств, не всегда достоверно влияют на продуктивность сельскохозяйственных культур.

Продолжение изучения их эффективности в полевых мелкоделяночных опытах с ячменем сорта Данута (2-летние опыты, Рязанская обл.) показало, что перспективные штаммы эндофитных и ризобактерий *B. subtilis* HC8 и *B. subtilis* TR6, как и стандартный штамм *B. subtilis* Ч-13, достоверно

но увеличивали урожайность ячменя (на 13,1-17,6 %) (табл. 2).

Интересно отметить, что от всех исследуемых штаммов эффект был выше, чем от минеральных удобрений (N₆₀P₆₀K₆₀) в рекомендованной дозе. Так, при использовании перспективных штаммов эндофитных и ризобактерий, относящихся к *B. subtilis*, урожайность зерна у ячменя достоверно увеличилась на 23,8-43,9 % относительно контроля и на 11-29 % — по сравнению с вариантом, где вносились только минеральные удобрения. Таким образом, подтверждается, что применение микробных препаратов для обработки семян ячменя — перспективный элемент технологий его выращивания, особенно с учетом расходов на минеральные удобрения.

2. Урожайность ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Данута в полевом мелкоделяночном опыте при инокуляции перспективными штаммами эндофитных и ризосферных бактерий (Рязанская обл., среднее за 2013-2014 годы)

Вариант	Урожайность зерна, т/га	Прибавка, т/га	
		к контролю	к фону
Без удобрений (контроль)	2,44		
N ₆₀ P ₆₀ K ₆₀ (фон)	2,72	0,28	
<i>Bacillus subtilis</i> Ч-13, микробный препарат экстрасол (стандарт)	2,76	0,32	0,04
<i>B. subtilis</i> Ч-13 + N ₆₀ P ₆₀ K ₆₀	3,51	1,07	0,79
<i>B. subtilis</i> TR6 (ризобактерия)	2,87	0,43	0,15
<i>B. subtilis</i> TR6 + N ₆₀ P ₆₀ K ₆₀	3,28	0,84	0,56
<i>B. subtilis</i> HC8 (эндофит)	2,80	0,36	0,08
<i>B. subtilis</i> HC8 + N ₆₀ P ₆₀ K ₆₀	3,02	0,58	0,30
НСП ₀₅	0,26		

Возникает естественный вопрос о механизмах действия перспективных штаммов эндофитных и ризобактерий на растения ячменя. Ранее мы показали, что исследуемые штаммы этих бактерий способны продуцировать ряд фитогормонов (22, 23), которые могут стимулировать развитие корневой системы растений и особенно корневых волосков. Развитие корневой системы инокулированных растений и собственно корневых волосков способствует существенному улучшению поглотительной способности и, соответственно, приводит к улучшению использования применяемых минеральных удобрений. Это было подтверждено в наших полевых мелкоделяночных опытах при подсчете коэффициента использования минеральных удобрений, проведенном разностным методом (табл. 3). Так, эффективность использования азота из минерального удобрения при инокуляции семян ячменя перспективными штаммами эндофитных и ризобактерий увеличивалась на 11,7-22,1 %, фосфора — на 5,1-10,3 %, калия — на 10,2-19,4 %. Отсюда становится понятно, за счет чего достоверно увеличился урожай зерна ячменя в полевом опыте.

3. Эффективность использования питательных веществ из удобрений растениями ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Данута в полевом мелкоделяночном опыте при инокуляции перспективными штаммами эндофитных и ризосферных бактерий (Рязанская обл., среднее за 2013-2014 годы)

Вариант	Коэффициент использования, %		
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
N ₆₀ P ₆₀ K ₆₀ (фон)	12,9	5,7	11,4
<i>Bacillus subtilis</i> Ч-13 (микробный препарат экстрасол) (стандарт) + N ₆₀ P ₆₀ K ₆₀	35,0	15,4	30,8
<i>B. subtilis</i> TR6 + N ₆₀ P ₆₀ K ₆₀	27,9	12,3	24,6
<i>B. subtilis</i> HC8 + N ₆₀ P ₆₀ K ₆₀	24,6	10,8	21,6

Итак, выполненное в вегетационных и полевых опытах сравнение эффективности разработанных ранее и предлагаемых микробных препаратов на основе выделенных из корней культурных и диких растений эндофитных и ризобактерий указывает на перспективность совместного применения этих двух групп бактерий в современных биологизированных техноло-

гиях выращивания ячменя и овощных культур (салат и редис). Сочетание эндофитных и ризобактерий при разработке микробных препаратов для растениеводства позволяет формировать самодостаточные растительно-микробные системы, снижая себестоимость производства и повышая коэффициент использования минеральных удобрений при возделывании культуры.

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,

196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,

e-mail: vladchebotar@rambler.ru;

²Университет ИТМО (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики),

191002 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9;

³ФГБОУ ВПО Рязанский государственный агротехнологический университет им. П.А. Костычева,

390044 Россия, г. Рязань, ул. Костычева, 1,

e-mail: alestarceva@yandex.ru

Поступила в редакцию
24 апреля 2015 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2016, V. 51, № 3, pp. 335-342

MICROBIAL PREPARATIONS ON THE BASIS OF ENDOPHYTIC AND RHIZOBACTERIA TO INCREASE THE PRODUCTIVITY IN VEGETABLE CROPS AND SPRING BARLEY (*Hordeum vulgare* L.), AND THE MINERAL FERTILIZER USE EFFICIENCY

V.K. Chebotar^{1, 2}, A.N. Zaplatkin¹, A.V. Shcherbakov^{1, 2}, N.V. Mal'fanova²,
A.A. Startseva³, Ya. V. Kostin³

¹All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail vladchebotar@rambler.ru;

²ITMO University (Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics), 9, ul. Lomonosova, St. Petersburg, 191002 Russia;

³P.A. Kostychev Ryazan State Agrotechnological University, 1, ul. Kostycheva, Ryazan, Russia 390044, e-mail alestarceva@yandex.ru

Acknowledgements:

Works on the isolation of rhizobacteria and the study of their antifungal properties, ability to produce auxins and various enzymes, as well as the effectiveness of endophytic and rhizobacteria in pot experiments were performed with the financial support of the Russian Science Foundation (project № 14-16-00146), work on the efficacy of endophytic and rhizobacteria in field experiments with spring barley was made with state financial support of the leading universities of the Russian Federation, grant 074-U01.

Received April 24, 2015

doi: 10.15389/agrobiology.2016.3.335eng

Abstract

We use an approach involving a combination of endophytic and rhizobacteria in the development of microbial preparations for crop production, which allows to create self sufficient plant-microbe systems, enhancing agricultural production and reducing the environmental burden. The article presents data on the properties of promising strains of endophytic and rhizobacteria and their efficiency in pot and field experiments. Rhizobacteria were isolated from the roots of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Bella, endophytic bacteria from internal tissues of hogweed (*Heracleum sphondylium* L.) stem. Identification of the studied bacterial strains was determined by nucleotide sequences of the 16S rRNA gene, and on cultural and biochemical properties. Middle grade lettuce (*Lactuca sativa* L.) variety Eralash and early maturing variety Duro of radish (*Raphanus sativus* L.) were used in pot experiments. It was shown that the *Bacillus subtilis* strain TR6 was active against all tested phytopathogenic fungi. Zones of inhibition varied from 17.4 to 48.2 mm. Almost all of the studied strains were capable of producing auxins, except strain TR7. Highest auxin production was observed in strains TR1 and TR9 — 12.3 and 20.1 rg/ml of medium respectively. Three of the five studied strains (*B. subtilis* HC8, *B. subtilis* B2G and *Azotobacter chroococcum* AZ7) significantly (by 15.2-34.2 %) increased the biomass of the lettuce. The strains of *B. subtilis* Ch-13 and *B. subtilis* TR6 increased the yield of lettuce but insignificantly. Among the studied strains, *B. subtilis* HC8 should be noted, which significantly (by 15.2-42.1 %) increased harvest of radishes and lettuce in pot experiments. Application of microbial preparations based on endophytic and rhizobacteria can be effective promising element of modern technologies of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivation, significantly reducing production costs and improving the efficiency of application of mineral fertilizers for its cultivation. Thus, the grain yield of barley variety Danuta (2-year field experiments) due to application of microbial preparations on the basis of

endophytic and rhizobacteria has been increased by 23.8-43.9 % compared to the control and by 11-29 % compared to mineral fertilizers. Due to inoculation of barley seeds with promising strains of the endophytic and of rhizobacteria the efficiency of nitrogen, phosphorus and potassium use from mineral fertilizers increased by 11.7-22.1 %, 5.1-10.3 %, and 10.2-19.4 %, respectively.

Keywords: endophytic and rhizobacteria, microbial preparations, bacilli, fungicidal activity, plant growth promotion, grain yield, mineral fertilizers use efficiency.

REFERENCES

1. Sutton M.A., Oenema O., Erisman J.W., Leip A., van Grinsven H., Winiwarter W. Too much of a good thing. *Nature*, 2011, 472: 159-161 (doi: 10.1038/472159a).
2. Berestetskii O.A., Dorosinskii L.M., Kozhemyakov A.P. *Izvestiya AN SSSR, seriya biol.*, 1987, 5: 670-679 (in Russ.).
3. *Biopreparaty v sel'skom khozyaistve (metodologiya i praktika ispol'zovaniya mikroorganizmov v rastenievodstve i kormoproizvodstve)* /Pod redaktsiei I.A. Tikhonovicha, Yu.V. Kruglova [Biologicals in agriculture: methodology and practical use of microorganisms in crop and fodder production. I.A. Tikhonovich, Yu.V. Kruglov (eds.)]. Moscow, 2005 (in Russ.).
4. Kozhemyakov A.P., Belobrova S.N., Orlova A.G. Sozdanie i analiz bazy dannykh po effektivnosti mikrobykh biopreparatov kompleksnogo deystviya [Creating and analyzing a database on the efficiency of microbial preparations of complex action]. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2011, 3: 112-115 (in Russ.).
5. Chebotar' V.K., Zavalin A.A., Kiprushkina E.I. *Effektivnost' primeneniya biopreparata Ekstrasol* [Effectiveness of Extrasol, a biopreparation]. Moscow, 2007 (in Russ.).
6. Lindow S.E., Brandl M.T. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69: 1875-1883 (doi: 10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003).
7. Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2004, 17: 6-15 (doi: 10.1094/MPMI.2004.17.1.6).
8. Berg G., Eberl L., Hartmann A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ. Microbiol.*, 2005, 7: 1673-1685 (doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x).
9. Holliday P. *A dictionary of plant pathology*. Cambridge University Press, Cambridge, 1989.
10. Schulz B., Boyle C. What are endophytes? In: *Microbial root endophytes*. B.J.E. Schulz, C.J.C. Boyle, T.N. Sieber (eds.). Springer-Verlag, Berlin, 2006: 1-13.
11. Strobel G., Daisy B., Castillo U., Harper J. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.*, 2004, 67: 257-268 (doi: 10.1021/np030397v).
12. Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J., Dowling D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008, 278: 1-9 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x).
13. Segi I. *Metody pochvennoi mikrobiologii* [Methods in soil microbiology]. Moscow, 1983 (in Russ.).
14. *Metody obshchei bakteriologii* /Pod redaktsiei E.N. Kondrat'evoi, L.V. Kalakutskogo [Methods in general bacteriology. E.N. Kondrat'eva, L.V. Kalakutskii (eds.)]. Moscow, 1983 (in Russ.).
15. Wirth S.J., Wolf G.A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *J. Microbiol. Meth.*, 1990, 12: 197-205 (doi: 10.1016/0167-7012(90)90031-Z).
16. Kamilova F., Validov S., Azarova T., Mulders I., Lugtenberg B. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.*, 2005, 7: 1809-1817 (doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00889.x).
17. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. E. Stackebrandt, M. Goodfellow (eds.). Wiley, NY, 1991: 115-175.
18. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 1991, 173(2): 697-703.
19. Onishchuk O.P., Chizhevskaya E.P., Kurchak O.N., Andronov E.E., Simarov B.V. *Ekologicheskaya genetika*, 2014, XII(1): 39-47 (in Russ.).
20. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, 215: 403-410 (doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
21. Dospekhov B.A. *Metodika polevogo opyta* [Methods in field trials]. Moscow, 1985 (in Russ.).
22. Chebotar' V.K., Makarova N.M., Shaposhnikov A.I., Kravchenko L.V. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2009, 45(4): 465-469 (in Russ.).
23. Malfanova N., Kamilova F., Validov S., Shcherbakov A., Chebotar V., Tikhonovich I., Lugtenberg B. Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed. *Microb. Biotechnol.*, 2011, 4: 523-532 (doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00253.x).
24. Malfanova N., Franzil L., Lugtenberg B., Chebotar V., Ongena M. Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. *Arch. Microbiol.*, 2012, 194: 893-899 (10.1007/s00203-012-0823-0).
25. Malfanova N., Kamilova F., Validov S., Chebotar V., Lugtenberg B. Is L-arabinose important for the endophytic lifestyle of *Pseudomonas* spp.? *Arch. Microbiol.*, 2013, 195: 9-17 (doi: 10.1007/s00203-012-0842-x).