

ФОМКИНА М. М., ИБРАГИМОВА С. А.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ДЛЯ ОБРАБОТКИ СЕМЯН

Аннотация. Исследована возможность использования культуральных жидкостей *Xanthomonas campestris* B-2373 D и *Azotobacter vinelandii* D-08 для обработки семян пшеницы сорта «Московская 39». Показано положительное влияние микробных экзополисахаридов (левана и ксантана) на водопоглотительную способность и энергию прорастания семян. Наибольший эффект достигается при использовании ксантана.

Ключевые слова: экзополисахариды, ксантан, леван, ризосферные бактерии, влагопоглотительная способность, энергия прорастания, семена пшеницы.

FOMKINA M. M., IBRAGIMOVA S. A.

USING OF MICROBIAL POLYSACCHARIDES FOR SEED TREATMENT

Abstract. The experimental study considers the possibility of using of *Xanthomonas campestris* B-2373 D and *Azotobacter vinelandii* D-08 culture fluids for the treatment of wheat seeds of "Moscow 39" variety. The positive effect of microbial exopolysaccharides on the water absorption and the energy of seed germination is shown. The maximum effect is achieved when using xanthan.

Keywords: exopolysaccharides, xanthan, levan, rhizospheric bacteria, water absorption capacity, energy of seed germination, wheat seeds.

Одна из актуальных проблем сельского хозяйства состоит в увеличении урожайности, сохранении плодородия почв, ростостимуляции, улучшении питания растений, увеличении влагоудерживающей способности семян. Регуляторы роста оказывают существенное влияние на все аспекты развития растений. Многофункциональность их воздействия привела к значительному расширению области их применения в растениеводстве, изучению действия полисахаридов как добавки к основным препаратам.

В современной биотехнологии растениеводства широко используются биопрепараты на основе ризосферных микроорганизмов, соответствующие требованиям экологической безопасности и обладающие широким спектром положительного действия на растения. Эффективные микробные препараты способны сохранять высокий титр и физиологическую активность клеток в течение длительного времени [6].

В настоящее время все большее внимание исследователей привлекает введение в состав биопрепаратов наполнителей, стабилизаторов, биологически активных веществ, гелеобразующих компонентов, способствующих не только продлению сроков хранения, но и повышению адгезивных свойств биоагентов и их выживанию после инокуляции. Такие

добавки должны быть безвредными для природных экосистем и человека. Улучшение свойств биопрепаратов может достигаться как за счет увеличения продукции экзополисахаридов (ЭПС) самими производителями, так и за счет введения в них полисахаридов других микроорганизмов.

В практике растениеводства широко используются липкогенные экологически безопасные препараты, такие как экзополисахарида ксантана (ЭПАА), «Райкат Старт» и др. Они используются в технологиях выращивания сельскохозяйственных растений в качестве прилипательей. На основе бактериального экзополисахарида ксантана и ЭПАА разработана липкогенная композиция, введение которой в инокулянты обеспечивает выживаемость ризобий при хранении [11].

Показано, что биопрепараты, содержащие в своем составе полисахариды, увеличивают полевую всхожесть и стимулируют рост растений; выполняют роль быстро доступных запасов энергии; продлевают срок действия микробных препаратов и пестицидов. Растения, обработанные такими препаратами, быстро поглощают воду и питательные элементы, тем самым инициируя более раннюю фотосинтетическую активность и укорачивая цикл созревания урожая [10; 11]. При этом гельные препараты имеют ряд преимуществ и, по данным многих авторов, часто оказываются более эффективными, чем жидкие [4; 9]. Так, покрытие семян воздухо- и водорегулирующей пленкой, способствует повышению устойчивости растений к стрессам и фитопатогенам в ранних фазах онтогенеза, а также защищает интродуцируемые и аборигенные почвенные микроорганизмы от повреждающего действия экстремальных факторов (температуры, высушивания, УФ-радиации) [8].

Цель работы: исследование влияния микробных полисахаридов на влагопоглотительную способность и развитие семян пшеницы.

Материалы и методы. Объектом исследований явились культуральные жидкости *Xanthomonas campestris* B-2373 D и *Azotobacter vinelandii* Д-08, содержащие ЭПС ксантан и леван соответственно. В качестве материала для исследования использовали семена озимой пшеницы сорта «Московская 39».

Для получения биопрепарата на основе бактерии *Azotobacter vinelandii* использовали мелассную среду с добавлением минеральных солей. Культивирование проводили в термостатируемом шейкере при 150 об/мин и 28 °C в течение 48 часов. Полученный препарат, содержащий живые клетки (10^9 - 10^{10} КОЕ/мл) и микробные метаболиты, хранили при 4 °C в течение 40 сут.

Бактерию *Xanthomonas campestris* выращивали на мелассной среде в термостатируемом шейкере при 150 об/мин и 28 °C в течение 4 сут. Затем культуральную

жидкость (КЖ), содержащую ксантан, подвергали термолизу (80 °С, 1 ч) для инактивации бактерий.

Полученные препараты использовали для обработки семян пшеницы при разведении водой 1:100.

Для определения влагопоглотительной способности выровненные семена пшеницы в количестве 50 штук обрабатывали в течение 1 часа следующими вариантами: контроль – водопроводная вода, опыт 1 – КЖ *Xanthomonas campestris*, опыт 2 – КЖ *Azotobacter vinelandii*.

После выдержки семена помещали в кювету с фильтровальной бумагой и подсушивали в течение 20 ч. По истечении данного времени семена взвешивали, помещали во влажную камеру и каждый час проводили расчет связанной воды.

В процессе хранения КЖ *Azotobacter vinelandii* количество синтезируемого полисахарида левана определяли гравиметрическим методом. Для этого 10 мл КЖ *Azotobacter vinelandii* центрифугировали при 8000 г в течение 15 мин для осаждения клеток. Затем отбирали 5 мл супернатанта, приливали 5 мл 96% этилового спирта, выдерживали при комнатной температуре в течение суток, отделяли осадок и высушивали при 50 °С до постоянной массы в течение 24 ч. Высушеннную массу взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,0001 г.

Для анализа влияния ЭПС на развитие семян определяли энергию прорастания – количество семян, проросших при заданных условиях за трое суток. Для этого опытные и контрольные семена пшеницы в количестве 100 штук помещали в чашки Петри на смоченную водой фильтровальную бумагу. Проращивание вели в климатической камере при 20 °С. Через 3 дня подсчитывали количество проросших семян и выражали в процентах от исходного числа.

Экспериментальные результаты обрабатывали статистическим методом дисперсионного анализа с использованием пакетов специальных программ Microsoft Excel 2010.

Результаты и их обсуждение. Для улучшения роста и минерального питания растений часто используют биопрепараты на основе ризосферных бактерий. На кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии в этом направлении активно ведутся работы с высокопродуктивными штаммами *Pseudomonas aureofaciens* B-11364 и *Azotobacter vinelandii* Д-08. Показана возможность использования мелассы в качестве основного компонента среды для культивирования данных бактерий, что повышает адгезивные свойства и снижает себестоимость готовых биопрепаратов. Кроме того, за счет способности *Azotobacter vinelandii* синтезировать ЭПС леван отпадает необходимость дополнительного

использования прилипателей при обработке семян культуральной жидкостью бактерий [1; 7]. Также в качестве связующего можно использовать культуральную жидкость, содержащую ксантан, полученную при культивировании *Xanthomonas campestris* на мелассе [5].

В результате проведенных исследований было показано положительное действие микробных ЭПС левана и ксантана на энергию прорастания и влагопоглотительную способность (ВПС) биообработанных семян пшеницы.

Во всех вариантах максимальное влагопоглощение семян отмечено в течение первых 60 мин. В дальнейшем количество поглощаемой влаги снижалось, и через 4 часа было минимально. Наибольшие значения ВПС выявлены при обработке семян ксантаном. Так, за весь исследуемый период количество поглощенной воды составило 0,0139 г, что на 7,2 % и 29,5 % больше, чем в варианте с леваном и в контроле соответственно (см. рис. 1).

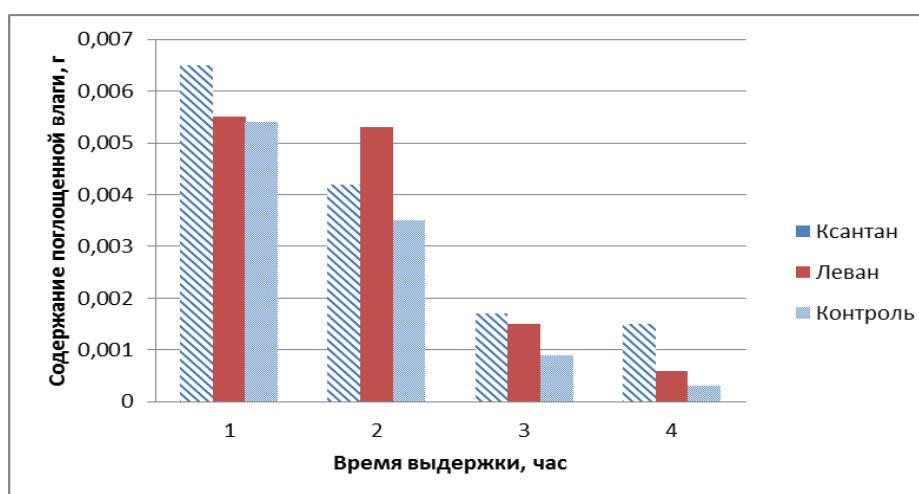


Рис. 1. Динамика ВПС семян пшеницы при обработке ЭПС.

Высокое водопоглощение ксантана обусловлено его способностью формировать гель. Уже при концентрации полисахарида 0,1% вязкость системы возрастает на порядок. При обработке семян раствором ксантана на поверхности создается полисахаридная оболочка, позволяющая поглощать большее количество воды по сравнению с леваном.

В связи с тем, что при проведении опыта использовалась КЖ, содержащая живые клетки *Azotobacter vinelandii*, то во время ее хранения количество левана, синтезируемого бактериями, изменялось. Так через 10, 20 и 30 суток хранения КЖ при 4 °C количество левана составило 3,4, 3,8, 4,0 г/л соответственно. При этом с увеличением количества левана ВПС семян также повышалась (в 1,7 и 2,2 раза через 20 и 30 сут относительно 10 сут хранения КЖ соответственно).

В дальнейшем содержание левана в КЖ снизилось, что может быть обусловлено его гидролизом. Из литературы известно, что микроорганизмы способны использовать

внеклеточные полисахариды в качестве энергетических субстратов и источника электронов в реакциях дегидрирования, являющихся обязательным этапом окислительно-восстановительных процессов в микробной клетке, а также в качестве источников углеродного питания, включая ЭПС или продукты их деструкции в конструктивный обмен [2].

Обработка семян биопрепаратами способствует высокой энергии прорастания семян и развитию растений, что обусловлено положительным влиянием бактериальных метаболитов [3]. Присутствие ЭПС также положительно воздействует на развитие растений.

Нами было показано, что при обработке семян в опытных вариантах с леваном и ксантаном значения энергии прорастания составили 88% и 95%, что на 7,4% и 20% больше, чем в контроле соответственно. При использовании КЖ *Azotobacter vinelandii*, хранившейся в течение 20 сут, показатель энергии прорастания достиг 100%, что свидетельствует о стимулирующем воздействии, как бактериальных метаболитов, так и полисахарида (см. рис. 2).

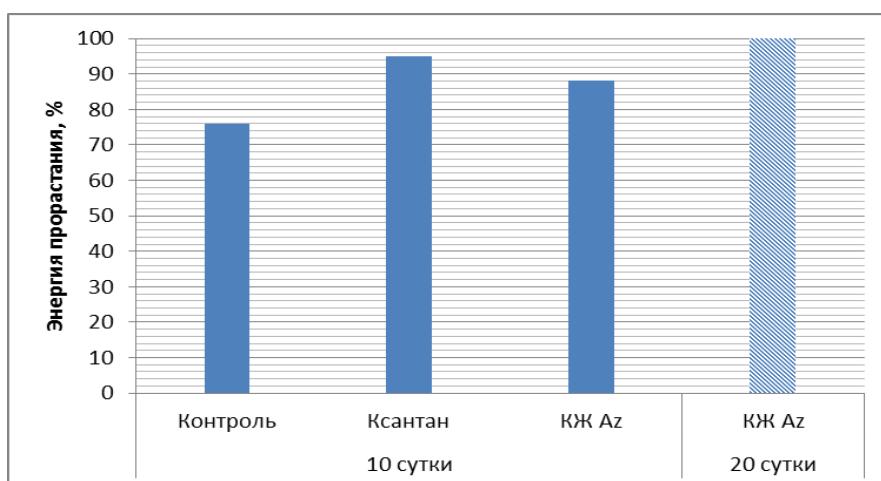


Рис. 2. Влияние ЭПС на прорастание семян пшеницы.

Таким образом, исследуемые микробные экзополисахариды оказывают благоприятное влияние как на семяна пшеницы, так и на бактерии в культуральной жидкости, создавая оптимальные условия для их развития. Тем самым ксантан и леван могут выступать как биологически активные вещества для повышения качества микробных препаратов с пролонгированным сроком хранения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурова Ю. А., Ибрагимова С. А., Ревин В. В. Получение бактериальной суспензии *Pseudomonas aureofaciens* 2006 на мелассе и изучение некоторых ее свойств //

Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012. – № 10 (146). – С. 61–65.

2. Гоголева Е. В., Гречушкина Н. Н., Егоров Н. С. Экзополисахарид *Mycobacterium lacticolum* штамм 121 // Тез. докл. V съезда Всесоюзн. микробиол. об-ва. – Ереван, 1975. – С. 118.
3. Захаркина А. С., Ибрагимова С. А., Ревин В. В. Изучение развития семян кукурузы при обработке бактериальными суспензиями на основе ризосферных бактерий *Pseudomonas aureofaciens* и *Azotobacter vinelandii* // Ресурсосберегающие экологически безопасные технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции. Лапшинские чтения: Материалы IX Международной научно-практической конференции. 18-19 апреля 2013 г. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2013. – С. 68–71.
4. Косенко Л. В., Мандровская Н. М., Кругова Е. Д. и др. Действие ростстимулятора растений бактозоля на *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 250a и его азотустойчивый мутант M_71 в условиях различной обеспеченности азотом // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 1. – С. 40–47.
5. Пат. 2421967 Российская Федерация, МПК⁵¹ C1 A01C 1/06, Способ получения оболочки для предпосевной обработки семян / В. В. Ревин, С. А. Ибрагимова, заявитель и патентообладатель ООО «Наука – Сервис», ГОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва». – № 2010113399/21; заявл. 06.04.2010; опубл. 27.06. 2011, Бюл. № 18. – 4 с.
6. Пацко Е. В., Воробей Н. А., Паршикова Т. В., Коць С. Я. [и др.]. Перспективность использования ассоциаций азотфикссирующих микроорганизмов для повышения урожайности растений // Бюл. Моск. общ. исп. прир. – 2009. – Т. 114. Вып. 2. – С. 84–86.
7. Шутова В. В., Котина Е. А. Использование мелассы в средах для культивирования левансинтезирующего штамма *Azotobacter vinelandii* // Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке: Материалы всеросс. науч. конф. с междунар. участием. МГУ им. Н.П. Огарёва. 23-25 сентября 2015 г. – Саранск: Референт, 2015. – С. 54–57.
8. Верхотурова І. С. Збереження життєздатності *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* в гелевих композиціях на основі липкогену ЕПАА // Молодь і поступ біології: Матеріали V міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів. 12 -15 травня 2009 р. – Львів, 2009. – С. 215.

9. Каменєва І. А., Грітчина Л. Ю., Мельничук Т. М. и др. Перспектива розробки гельних препаратів на основі агрономічно корисних мікроорганізмів // Матеріали XII з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського. 25 - 30 травня 2009 р. – Ужгород: Ужгородський національний університет, 2009. – С. 376.
10. Мандровська Н. М., Кругова О. Д., Коць С. Я. и др. Дія синтетичного полісахариду на ріст бульбочкових бактерій і ризогенез коріння // Агроекол. журн. – 2005. – № 4. – С. 47–51.
11. Пат. 89120 України UA C12 №1/00, A 01C 1/00 Композиція для інокуляції насіння бобових рослин на основі бульбочкових бактерій та липкогена ЕПАА / Леонова Н. О., Воцелко С. К., Титова Л. В. и др.; опубл. 25.12.2009, Бюл. № 24.