

## Растительно-микробные взаимодействия

УДК 633.31/.37:631.8:631.461.5:581.1

doi: 10.15389/agrobiology.2019.3.481rus

ПРОДУКТИВНОСТЬ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА  
ПОД ВЛИЯНИЕМ РОСТСТИМУЛИРУЮЩИХ ШТАММОВ  
МИКРООРГАНИЗМОВ\*Л.Ф. МИННЕБАЕВ<sup>1</sup>, Е.В. КУЗИНА<sup>1</sup>, Г.Ф. РАФИКОВА<sup>1</sup>, И.О. ЧАНЫШЕВ<sup>2</sup>,  
О.Н. ЛОГИНОВ<sup>1</sup>

Причина отсутствия повсеместного перехода к экологически ориентированному земледелию заключается в первую очередь в нестабильном эффекте при использовании биологических препаратов. Малоизученным остается вопрос о влиянии интродуцируемых микроорганизмов на аборигенную почвенную микробиоту, в частности о том, как использование биологических препаратов сказывается на естественных (природных) микробно-растительных связях. В настоящем исследовании нами впервые дана комплексная сравнительная оценка воздействия, которое оказывает интродукция штаммов ризобактерий, различающихся сочетанием ростстимулирующих свойств, на однолетние и многолетние бобовые культуры. Целью работы было изучение влияния ростстимулирующих штаммов бактерий *Paenibacillus ehimensis* ИВ 739, *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 и *Ps. chlororaphis* ИБ-51 на экосистему бобовое растение—аборигенное микробное сообщество. Объектами исследования в условиях вегетационного опыта служили растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.) сорта Чишминский 95, люпина белого (*Lupinus albus* L.) сорта Дега, нута (*Cicer arietinum* L.) сорта Заволжский, люцерны изменчивой (*Medicago × varia* Martyn) сорта Галия, донника белого (*Melilotus albus* Medik.) сорта Чермасан. Для обработки семян растений применяли жидкую культуру штаммов бактерий. В контрольном варианте использовали стерильную водопроводную воду. Эталоном служило известное микробиологическое удобрение Азотовит® на основе штамма бактерий *Azotobacter chroococcum* В-9029. Оценивали влияние инокуляции семян на всхожесть, размерные показатели растений, число клубеньков, анализировали численность различных групп ризосферных микроорганизмов, определяли количество азота, накопленное в почве и усвоенное растениями. Эксперимент проводили при комнатной температуре в условиях естественной освещенности. Продолжительность опыта составила 45 сут. На 18-е и 45-е сут эксперимента отбирали образцы растений, а также почвенные образцы для анализа численности изучаемых групп микроорганизмов, на 45-е сут — образцы для определения количества азота. Установлено стимулирующее воздействие штаммов *P. ehimensis* ИВ 739, *Ps. koreensis* ИБ-4, *Ps. chlororaphis* ИБ-51 на формирование и функционирование бобово-ризобияльных сообществ. Обработка ростстимулирующими микроорганизмами (plant growth promoting bacteria, PGPB) способствовала улучшению всхожести, роста и развития растений. В вариантах с обработкой семян *Ps. chlororaphis* ИБ-51 чаще отмечалось увеличение длины корней, *Ps. koreensis* ИБ-4 стимулировал развитие надземной части растений. При этом *Ps. chlororaphis* ИБ-51 и *Ps. koreensis* ИБ-4 хорошо показали себя на горохе, люпине и нуте, тогда как на люцерне и доннике стимуляцию роста не отмечали. Установлено, что инокуляция семян исследуемыми штаммами бактерий обеспечила подавление развития микроскопических грибов в ризосфере. Как следствие, развитие корневых гнилей на горохе снизилось с 66,7 до 25,3-43,8 %, на люпине — с 35,9 до 20,3-25,0 %. Не было выявлено ингибирующего воздействия инокулянтов на ризобии, наоборот, отмечалось усиление клубенькообразования. Так, при обработке семян кормовых культур *P. ehimensis* ИВ 739 число клубеньков на корнях выросло в 1,9-2,6 раза. Штамм *P. ehimensis* ИВ 739 показал себя наиболее активным по стимулированию накопления азота в растениях и в почве. Содержание азота в растениях гороха, обработанных этим штаммом, составило 8,5 % против 3,9 % в контроле, для люпина — 8,6 % против 5,0 %. Таким образом, наличие у штамма ростстимулирующих характеристик не гарантирует благоприятного влияния на продуктивность бобовых растений. Штаммы, обладающие схожими характеристиками, могут значительно различаться по эффективности применения на одних и тех же бобовых культурах.

Ключевые слова: PGPB, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, бобовые растения, ростстимулирующая активность, образование клубеньков, азотфиксация, взаимодействие растение—микрорганализм.

К настоящему времени известен ряд механизмов прямого (1-3) и опосредованного (4, 5) положительного влияния бактерий на растения. Установлено, что одна и та же ростстимулирующая бактерия (plant growth

\* В работе использовалось оборудование Центра коллективного пользования «БиоАналит» УИБ УФИЦ РАН.

promoting bacteria, PGPB) может быть наделена фитоположительными свойствами различной природы (6, 7). К сожалению, малоизученным остается вопрос о влиянии интродуцируемых микроорганизмов на аборигенную почвенную микробиоту, в частности о том, как использование биологических препаратов сказывается на естественных (природных) микробно-растительных связях (8). Доказано, что эффективность биологического препарата зависит не только от его полифункциональности, но и от того, насколько успешно агентам биологического контроля удается занять экологическую нишу в уже существующем сообществе (9-11).

Бобово-ризобияльное сообщество — один из наиболее известных примеров сбалансированного фитомикробиома. Клубеньковые бактерии, будучи естественными симбионтами бобовых растений, обеспечивают последних дополнительным азотом. Только некоторые штаммы ризобий обладают такими свойствами PGPB, как увеличение продуктивности сельскохозяйственных культур посредством синтеза фитогормонов (12, 13) и биоконтроля фитопатогенов (14, 15). С этой точки зрения представляется интересным изучить возможности повышения потенциала экосистемы бобовых растений через интродукцию микроорганизмов, наделенных комплексом полезных свойств.

Установлено, что биологическая активность ростстимулирующих бактерий *Paenibacillus ehimensis* IB 739 (ВКМ В-2680D), *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 (ВКМ В-2830D) и *Ps. chlororaphis* ИБ-51 имеет комплексную природу: все три штамма являются антагонистами фитопатогенов, а также могут продуцировать фитогормоны и способствовать улучшению азотного питания растений. При этом способность к фиксации атмосферного азота у штаммов *P. ehimensis* IB 739 и *Ps. koreensis* ИБ-4 сопоставима с нитрогеназной активностью бактерий рода *Azotobacter* (16). Фитогормоны цитокинины, пусть и в незначительном количестве, продуцируют все указанные штаммы, ауксины — только штамм *Ps. chlororaphis* ИБ-51. Необходимо отметить также, что *P. ehimensis* IB 739 и *Ps. koreensis* ИБ-4 служат продуцентами экзополисахаридов (ЭПС) (17, 18). Это свойство может играть положительную роль при инокуляции растений, поскольку наличие в бактериальном препарате ЭПС способствует увеличению периода жизнеспособности клеток микроорганизмов на поверхности семян.

Как отмечалось выше, возможность применения на практике комплекса полезных свойств, которыми наделены те или иные микроорганизмы, напрямую зависит от того, способны ли внесенные извне бактерии прижиться в ризосфере растения-хозяина (19, 20). На примере яровой пшеницы и огурца было установлено, что штаммы *P. ehimensis* IB 739, *Ps. koreensis* ИБ-4 и *Ps. chlororaphis* ИБ-51 успешно колонизируют ризосферу и сохраняют высокую численность микробной популяции на протяжении всего периода вегетации (21, 22).

В представленной работе впервые дана комплексная сравнительная оценка воздействия, которое оказывает интродукция штаммов ризобактерий, различающихся сочетанием ростстимулирующих свойств, на однолетние и многолетние бобовые культуры, и показано, что наличие у штамма способности стимулировать рост бобовых растений само по себе не гарантирует благоприятного влияния на их продуктивность.

Цель работы — изучение влияния ростстимулирующих штаммов бактерий *Paenibacillus ehimensis* IB 739, *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 и *Ps. chlororaphis* ИБ-51 на экосистему бобовое растение—аборигенное микробное сообщество.

*Методика.* В модельном эксперименте (2017 год) использовали чер-

нозем глинисто-иллювиальный (содержание общего гумуса 4,2 %, общего азота — 0,5 %, подвижного фосфора — 5,6 мг/100 г почвы; рН<sub>вод.</sub> 6,3). Для оптимизации водно-воздушного режима в вегетационные сосуды помещали дренаж (высота слоя 2 см), вносили воздушно-сухую нестерильную почву (1300 г) и увлажняли до 60 % от полной влагоемкости. Количество фосфора в почве определяли по методу Кирсанова, кислотность — потенциометрическим методом (23).

Семена растений гороха посевного (*Pisum sativum* L.) сорта Чишминский 95, люпина белого (*Lupinus albus* L.) сорта Дега, нута (*Cicer arietinum* L.) сорта Заволжский, люцерны изменчивой (*Medicago × varia* Martyn) сорта Галия и донника белого (*Melilotus albus* Medik.) сорта Чермасан стерилизовали замачиванием в 1 % растворе перманганата калия в течение 30 мин. Затем их 5-кратно промывали большим количеством стерильной водопроводной воды и на 1 сут полностью погружали в воду для набухания, после чего помещали на увлажненную фильтровальную бумагу для проращивания в течение 1 сут при комнатной температуре и оценивали лабораторную всхожесть.

Для обработки семян использовали жидкую культуру штаммов бактерий с известным титром микроорганизмов ( $10^8$ - $10^9$  КОЕ/мл). *P. ehimensis* ИВ 739 выращивали на среде I (24), *Ps. koreensis* ИБ-4 и *Ps. chlororaphis* ИБ-51 — на среде Кинг В (25). Семена инокулировали из расчета  $10^5$  кл/семя для крупных семян (горох, люпин, нут) и  $10^3$  кл/семя для мелкосеменных растений (люцерна, донник). В вегетационные сосуды высаживали по 5 проростков гороха, люпина, нута и по 10 проростков люцерны и донника. Глубина заделки — от 1 до 3 см. Для растений, которые не выносят семядоли на поверхность (горох, нут), применялась более глубокая заделка. В контрольном варианте для обработки семян использовали стерильную водопроводную воду. В качестве дополнительного контроля, необходимого для наблюдения за изменением содержания азота в почве, были взяты сосуды с почвой без растений. Эталонном служило известное микробиологическое удобрение Азотовит® на основе штамма бактерий *Azotobacter chroococcum* В-9029 (регистрант ООО «Промышленные инновации», Россия, <http://azotovit.ru>). Азотовит рекомендуется производителями как универсальное удобрение комплексного действия: он обеспечивает растения азотным питанием, подавляет фитопатогенную микрофлору, способствует развитию вегетативной системы растений (лист, стебель, соцветие), повышает урожайность.

Эксперимент проводили при комнатной температуре и естественной освещенности. Продолжительность опыта составила 45 сут. Образцы растений отбирали на 18-е и 45-е сут, почвенные образцы для анализа численности некоторых групп микроорганизмов — на 18-е и 45-е сут, для определения количества азота — на 45-е сут. Растения извлекали вместе с монолитом почвы, осторожно отмывали корневую систему, затем оценивали размерные показатели и число образовавшихся клубеньков. В высушенном растительном материале устанавливали содержание общего азота по Кьельдалю. Поражение корневыми гнилями учитывали в соответствии с методическими указаниями (26). Численность микроорганизмов в ризосфере определяли методом высева серийных разведений почвенной суспензии на агаризованные питательные среды — МПА (микроорганизмы, использующие органический азот), Эшби (аэробные свободноживущие азотфиксаторы и олигонитрофилы), Чапека-Докса с добавлением молочной кислоты (микромикеты) (27).

Статистическую обработку данных проводили в программе Microsoft

Excel. Рассчитывали средние значения ( $M$ ) и стандартные ошибки средних ( $\pm SEM$ ). Достоверность различий оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента ( $t$ -тест) и считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

*Результаты.* Согласно проведенным почвенным анализам, степень обеспеченности легкорастворимыми фосфатами для зернобобовых культур в опыте была средней при нейтральном показателе pH. Такие характеристики почвы можно считать благоприятными для активных форм спонтанных штаммов клубеньковых бактерий.

В таблице 1 обобщены данные, дающие представление о некоторых механизмах положительного влияния бактерий *P. ehimensis* ИВ 739, *Ps. koreensis* ИБ-4, *Ps. chlororaphis* ИБ-51 на растения (16, 17, 21, 22). Выбранные нами представители семейства бобовых различались по ареалам возделывания. Очевидно, что если штаммы *Rhizobium leguminosarum* (микросимбионт гороха) распространены практически повсеместно, то в случае с культурами нута и люпина в почве, где эти растения ранее не выращивались, подходящие микросимбионты могут отсутствовать.

Для культур зернобобовых однолетников (горох, люпин, нут) лабораторная всхожесть семян составила 92,5-98,0 %. Всхожесть семян кормовых трав (люцерна и донник) была ниже — соответственно 77,0 и 82,0 %. В условиях вегетационного опыта культуры *Ps. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739, а также биопрепарат Азотовит® оказывали положительное влияние на всхожесть семян бобовых растений. Интересно, что наибольшую отзывчивость на действие биопрепаратов проявила люцерна.

Показатель всхожести достигал максимальных значений при обработке семян жидкой культурой *Ps. koreensis* ИБ-4, при этом количество взошедших растений увеличивалось на 15-20 % по сравнению с контролем. Штамм *Ps. chlororaphis* ИБ-51 не оказывал (в случае гороха и нута) или оказывал незначительное стимулирующее воздействие на этот показатель. Полученные экспериментальные материалы не согласуются с данными по фитогормональной активности штаммов (см. табл. 1). Так, *Ps. chlororaphis* ИБ-51 значительно превосходит *Ps. koreensis* ИБ-4 в продукции регуляторов роста растений, но при этом не проявлял благоприятного влияния на всхожесть семян.

Известно, что повышенная концентрация индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) может приводить к ингибирующим эффектам (28), при этом наиболее простой способ регуляции концентрации фитогормонов в ризосфере растения — варьирование числа бактерий-продуцентов при инокуляции (29-31). Ранее в работе О.Н. Логинова было установлено, что высокий титр штамма *Ps. chlororaphis* ИБ-51 отрицательно сказывается на всхожести семян ряда овощных культур (18). По-видимому, подобный эффект наблюдался и в условиях нашего эксперимента. Кроме того, существует гипотеза, что когда фитогормоны, синтезируемые штаммами, находятся в комплексе с экзополисахаридами, как в случае культур *P. ehimensis* ИВ 739 и *Ps. koreensis* ИБ-4, то за счет постепенной диссоциации комплекса действие фитогормонов на растение носит более мягкий и пролонгированный характер (32).

Принято считать, что ауксины в основном способствуют росту корней (увеличению длины и ветвления) (31), а также положительно влияют на рост листьев. Цитокинины, в свою очередь, активизируют рост побегов в большей степени, чем корней, даже угнетая рост последних (33). В нашем эксперименте в вариантах с обработкой семян штаммом *Ps. chlororaphis* ИБ-51 (продуцент ауксинов и цитокининов) чаще отмечалось увеличение длины корней (рис. 1, А), а также числа листьев. Стимулирование развития

## 1. Известные проявления положительного воздействия изучаемых штаммов ростстимулирующих бактерий на растение ( $M \pm SEM$ ) (16, 17, 21, 22)

Штамм	Синтез фитогормонов, нг/мл КЖ		Способность к фиксации атмосферного азота			Антагонистические механизмы воздействия на фитопатогены		
	цитокинины	ИУК	рост на среде Эшби	нитрогеназная активность, мкг $N_2 \cdot мл^{-1} \cdot ч^{-1}$	антибиотики	протеазы	хитиназы	
<i>Paenibacillus ehimensis</i> IB 739	190,3±25,3	–	Умеренный	0,67±0,021	+	+	+	
<i>Pseudomonas koreensis</i> ИБ-4	119,0±17,3	40,4±4,7	Обильный	0,68±0,030	+	+	–	
<i>Ps. chlororaphis</i> ИБ-51	205,4±42,1	878,1±93,2	Умеренный	0,08±0,002	+	+	–	

Примечание. КЖ — культуральная жидкость, ИУК — индолил-3-уксусная кислота. Прочерк означает, что ферменты и метаболиты не были обнаружены.

## 2. Морфофизиологические показатели бобовых растений при обработке семян ростстимулирующими штаммами бактерий в разные сроки после инокуляции ( $M \pm SEM$ , вегетационный опыт, 2017 год)

Вариант	18-е сут				45-е сут			
	длина надземной части, см	длина главного корня, см	число листьев, шт.	число клубеньков, шт/растение	длина надземной части, см	длина главного корня, см	число листьев, шт.	число клубеньков, шт/растение
Горох посевной ( <i>Pisum sativum</i> L., сорт Чишминский 95)								
Контроль (вода)	32,3±1,7	11,0±0,8	6,3±0,7	2,1±0,9	73,7±5,8	16,2±0,9	12,7±1,3	9,0±2,5
<i>Paenibacillus ehimensis</i> IB 739	38,5±2,1*	11,3±0,8	7,0±0,5	3,7±1,2	77,6±4,1	15,7±1,5	14,5±2,1	12,7±4,4
<i>Pseudomonas koreensis</i> ИБ-4	38,0±2,2*	10,8±0,6	6,7±0,6	1,8±0,3	85,5±4,7*	18,2±0,9*	15,4±1,1*	20,4±3,8*
<i>Ps. chlororaphis</i> ИБ-51	36,3±2,8	12,7±0,7*	5,7±0,5	14,0±2,4*	76,3±6,3	18,4±0,8*	15,0±0,8*	20,3±5,1*
Азотовит®	38,7±2,5*	7,6±0,6*	5,5±0,3	6,8±3,9	84,0±4,2*	14,0±1,1*	14,0±2,5	10,4±1,7
Люпин белый ( <i>Lupinus albus</i> L., сорт Дега)								
Контроль (вода)	14,7±0,9	8,3±0,6	4,0±0,5	0,3±0,1	29,1±2,5	14,5±2,1	10,5±1,4	10,2±2,0
<i>P. ehimensis</i> IB 739	16,2±1,4	8,8±0,5	4,0±0,2	6,3±0,5*	30,0±3,2	18,3±1,5*	11,3±2,9	10,7±1,8
<i>Ps. koreensis</i> ИБ-4	18,5±1,1*	8,8±0,5	5,0±0,6	–	34,3±2,6*	14,6±1,8	11,7±2,5	8,3±1,7
<i>Ps. chlororaphis</i> ИБ-51	16,8±1,3	10,0±0,8*	5,0±0,5	0,5±0,1	36,0±3,8*	18,7±1,5*	13,3±1,2*	17,0±2,5*
Азотовит®	17,7±1,1*	8,3±0,6	4,0±0,4	–	35,7±3,9*	15,3±2,8	11,3±1,9	16,0±1,9*
Нут ( <i>Cicer arietinum</i> L., сорт Заволжский)								
Контроль (вода)	28,5±1,9	12,7±1,1	9,4±0,6	–	38,1±3,0	17,0±1,8	16,0±2,8	–
<i>P. ehimensis</i> IB 739	31,0±2,1	17,5±1,0*	10,3±0,7	–	40,0±3,7	20,3±2,5	15,3±2,1	–
<i>Ps. koreensis</i> ИБ-4	27,0±1,5	15,3±0,8*	9,7±0,6	–	44,0±2,5*	22,5±3,1*	14,7±1,9	–
<i>Ps. chlororaphis</i> ИБ-51	31,3±1,8	13,8±0,8	10,7±0,9	–	44,0±2,7*	21,7±2,7*	17,0±2,9	–
Азотовит®	30,3±2,3	11,2±0,6	9,0±0,5	–	45,7±3,1*	16,3±2,5	16,0±2,9	–
Люцерна изменчивая ( <i>Medicago × varia</i> Martyn, сорт Галия)								
Контроль (вода)	9,3±0,8	5,2±0,7	3,1±0,3	1,9±0,5	18,9±2,2	15,0±1,9	7,2±1,3	7,2±2,1
<i>P. ehimensis</i> IB 739	9,8±0,7	4,1±0,5	3,0±0,3	1,8±0,3	23,1±1,7*	15,1±2,1	10,7±1,9*	18,4±4,9*

Продолжение таблицы 2

<i>Ps. koreensis</i> ИБ-4	9,5±1,0	5,9±0,5	3,3±0,3	3,8±1,5	17,8±2,7	14,2±2,5	8,1±1,8	11,1±3,0
<i>Ps. chlororaphis</i> ИБ-51	8,8±0,7	4,7±0,4	2,8±0,4	1,8±0,2	18,1±2,1	14,8±2,5	8,0±1,9	10,6±1,9
Азотовит®	10,4±0,9	6,0±0,5	3,1±0,3	2,4±0,5	19,1±2,9	14,9±2,7	9,3±0,6*	25,2±6,7*
Донник белый ( <i>Melilotus albus</i> Medik., сорт Чермасан)								
Контроль (вода)	7,2±0,6	5,0±0,4	2,9±0,3	1,5±0,6	14,0±0,9	14,3±1,1	5,6±0,7	12,5±2,6
<i>P. ehimensis</i> ИВ 739	8,5±0,5*	5,5±0,4	3,3±0,3	1,3±0,3	15,6±1,8	15,4±2,5	6,4±1,1	23,9±3,8*
<i>Ps. koreensis</i> ИБ-4	8,3±0,6	5,6±0,5	2,7±0,2	3,0±1,0	14,0±1,3	12,3±2,0	6,0±1,0	13,6±1,8
<i>Ps. chlororaphis</i> ИБ-51	6,7±0,5	4,6±0,4	3,1±0,4	2,1±0,5	16,2±1,9	15,1±1,9	7,0±0,5*	16,6±2,9
Азотовит®	6,6±0,6	6,4±0,3*	2,8±0,3	0,6±0,3	20,6±3,1*	16,3±0,7*	7,7±0,9*	37,1±7,8*

Примечание. Прочерк означает, что клубеньки не образовались.

\* Различия с контролем статистически значимы при  $p \leq 0,05$ .

### 3. Численность различных групп микроорганизмов (КОЕ/г абс. сух. почвы) в ризосфере бобовых растений при обработке семян ростстимулирующими штаммами бактерий в разные сроки после инокуляции ( $M \pm SEM$ , вегетационный опыт, 2017 год)

Вариант	Горох посевной ( <i>Pisum sativum</i> L.)		Люпин белый ( <i>Lupinus albus</i> L.)		Нут ( <i>Cicer arietinum</i> L.)		Люцерна изменчивая ( <i>Medicago × varia</i> Martyn)		Донник белый ( <i>Melilotus albus</i> Medik.)	
	18-е сут	45-е сут	18-е сут	45-е сут	18-е сут	45-е сут	18-е сут	45-е сут	18-е сут	45-е сут
Микроорганизмы, использующие органический азот, $\times 10^7$										
Контроль (вода)	5,4±0,7	4,4±0,8	3,5±0,6	5,8±0,5	5,3±0,9	3,9±0,3	2,7±0,8	0,9±0,5	1,0±0,3	1,9±0,5
<i>Paenibacillus ehimensis</i> ИВ 739	6,3±0,8	1,0±0,1*	2,4±0,6	0,8±0,2*	6,4±0,7	1,2±0,2*	1,4±0,6	2,0±0,8	0,3±0,1*	2,5±0,5
<i>Pseudomonas koreensis</i> ИБ-4	4,3±0,6	1,7±0,2*	4,3±0,4	3,1±0,3*	3,3±1,3	1,3±0,2*	0,6±0,1*	2,0±0,7	0,5±0,2	3,1±0,9
<i>Ps. chlororaphis</i> ИБ-51	5,4±0,3	6,4±1,3	3,2±0,4	1,9±0,2*	4,2±0,7	0,7±0,1*	0,7±0,2*	2,0±0,6	1,0±0,2	2,9±0,6
Азотовит®	4,1±0,7	2,3±0,3*	3,2±0,5	1,5±0,2*	6,7±0,9	1,4±0,3*	1,1±0,4*	1,9±0,6	1,2±0,3	1,6±0,3
Аэробные свободживущие азотфиксаторы и олигонитрофилы, $\times 10^7$										
Контроль (вода)	1,2±0,3	2,0±0,4	1,6±0,2	1,2±0,4	2,8±0,6	1,1±0,2	1,2±0,5	1,7±0,3	0,8±0,2	1,3±0,5
<i>P. ehimensis</i> ИВ 739	2,1±0,6	2,4±0,2	1,6±0,2	1,3±0,3	3,6±0,5	1,1±0,1	1,5±0,3	1,5±0,3	0,9±0,2	2,1±0,5
<i>Ps. koreensis</i> ИБ-4	1,6±0,3	1,5±0,3	2,0±0,3	0,8±0,2	3,0±0,4	1,2±0,1	0,5±0,2	1,7±0,5	0,9±0,2	2,5±0,8
<i>Ps. chlororaphis</i> ИБ-51	1,1±0,3	1,5±0,4	1,7±0,3	2,1±0,6	1,6±0,8	0,8±0,2	0,9±0,2	1,8±0,3	0,8±0,1	1,5±0,4
Азотовит®	0,8±0,2	1,1±0,6	1,9±0,3	1,2±0,3	2,2±0,4	1,2±0,2	1,4±0,3	1,8±0,2	0,5±0,1	1,9±0,5
Микромицеты, $\times 10^4$										
Контроль (вода)	8,6±0,8	4,2±0,3	35,0±3,6	3,4±0,4	13,3±1,1	1,4±0,4	11,3±1,0	2,5±0,5	9,8±0,9	2,9±0,5
<i>P. ehimensis</i> ИВ 739	4,1±0,5*	1,8±0,2*	4,5±0,4*	3,0±0,3	3,3±0,3*	2,2±0,5	4,9±0,5*	3,9±1,0	1,6±0,3*	3,2±0,6
<i>Ps. koreensis</i> ИБ-4	3,2±0,4*	1,5±0,1*	2,0±0,2*	2,6±0,5	2,1±0,2*	1,8±0,3	0,8±0,1*	2,3±0,5	0,5±0,1*	3,9±0,6
<i>Ps. chlororaphis</i> ИБ-51	4,7±0,6*	5,0±0,5	2,8±0,3*	1,1±0,2*	4,9±0,5*	1,4±0,2	2,3±0,3*	3,6±0,7	1,6±0,2*	2,2±0,4
Азотовит®	8,1±0,5	1,5±0,2*	3,4±0,4*	3,1±0,3	7,3±0,6*	2,3±0,5	1,7±0,2*	1,3±0,8	4,7±0,5*	2,6±0,4

\* Различия с контролем статистически значимы при  $p \leq 0,05$ .

надземной части в большинстве случаев наблюдалось при инокуляции семян *Ps. koreensis* ИБ-4 (продуцент цитокининов) и препаратом Азотовит® (см. рис. 1, Б). Однако неправомерно говорить о специализации штаммов по воздействию на определенные органы растения-макросимбионта. Так, в случае использования *P. ehimensis* ИВ 739 (продуцент цитокининов) на горохе, люцерне и доннике у растений активизировался рост побегов, а на люпине и нуте — корневой системы.



**Рис. 1.** Развитие корневой системы и побегов бобовых растений при инокуляции штаммами ростстимулирующих бактерий: А — горох посевной (*Pisum sativum* L.), слева — контроль, справа — обработка штаммом бактерий *Pseudomonas chlororaphis* ИБ-51; Б — люпин белый (*Lupinus albus* L.), слева направо — контроль, обработка препаратом Азотовит®, обработка штаммом *Ps. koreensis* ИБ-4.

Штаммы *Ps. koreensis* ИБ-4 и *Ps. chlororaphis* ИБ-51 оказались активнее на горохе, люпине и нуте; на люцерне и доннике положительный эффект либо был менее заметен, либо отсутствовал. Возможно, это объясняется тем, что оболочка семян люцерны и донника содержит токсичные вещества, в частности алкалоиды (34), и исследуемые штаммы псевдомонад оказались менее устойчивы к действию бактерицидных веществ, чем культуры *Paenibacillus* и *Azotobacter*.

Образование первых клубеньков в условиях опыта наблюдалось приблизительно на 10-е сут после появления всходов. При этом на корнях нута клубеньки не обнаруживались на протяжении всего эксперимента, что было вполне логично. Нут не относится к числу приоритетных культур в Республике Башкортостан, поэтому в почве могли отсутствовать специфичные для этого вида клубеньковые бактерии. На первоначальном этапе наибольшее количество клубеньков обнаружили на корнях гороха, что, по-видимому, связано с быстрым ростом этой культуры (табл. 2). К концу опыта по числу клубеньков (в пересчете на одно растение) лидировал донник белый. Формирование клубеньков происходило как на главном корне, так и на придаточных и боковых корнях (часто было привязано к зоне корневых волосков), а также на стебле. При обработке жидкой культурой *P. ehimensis* ИВ 739, *Ps. chlororaphis* ИБ-51 и биопрепаратом Азотовит® характерным было образование более крупных розовых клубеньков, сосредоточенных вокруг главного корня в виде муфты.

Инокуляция бактериями в целом положительно влияла на процесс клубенькообразования, но растения разных родов неодинаково откликнулись на интродукцию РГРВ в микробное сообщество ризосферы. На горохе, обработанном штаммом *Ps. chlororaphis* ИБ-51, и на люпине в варианте с *P. ehimensis* ИВ 739 уже на 3-й нед эксперимента число клубеньков в несколько раз превышало контрольные значения ( $p \leq 0,05$ ). На люцерне и доннике через 2 нед после начала опыта между контрольным и опытными вариантами еще не было достоверной разницы в образовании клубеньков, к концу эксперимента в вариантах с внесением *P. ehimensis* ИВ

739 и Азотовита® отмечали увеличение числа клубеньков в 1,9-3,5 раза ( $p \leq 0,05$ ). В случае штаммов псевдомонад статистически достоверных различий по сравнению с контролем на кормовых культурах мы не выявили. В целом, *P. ehimensis* ИВ 739 и биопрепарат Азотовит® стимулировали клубенькообразование на люпине, люцерне и доннике, *Ps. chlororaphis* ИБ-51 был активен в ризосфере люпина и гороха, а *Ps. koreensis* ИБ-4 — только в ризосфере гороха.

Мы не установили связи между числом клубеньков и развитием корневой системы растения. Так, на люпине наибольшую длину корней зафиксировали при обработке *P. ehimensis* ИВ 739 и *Ps. chlororaphis* ИБ-51, штамм *Ps. koreensis* ИБ-4 и биопрепарат Азотовит® не оказали существенного влияния на анализируемые показатели (см. табл. 2). При этом на развитой корневой системе растений люпина, обработанных штаммом *P. ehimensis* ИВ 739, сформировалось меньше клубеньков, чем в варианте с Азотовитом®.

При анализе азотфиксирующей активности в ризосфере бобовых культур необходимо принимать во внимание, что описанный эксперимент продолжался до фазы цветения растений, поэтому представленные результаты могут служить только для предварительной оценки.

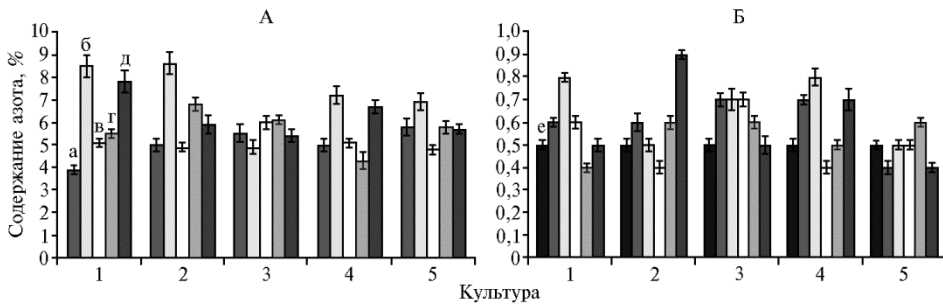


Рис. 2. Содержание азота в растениях гороха посевного (*Pisum sativum* L.) сорта Чишминский 95 (1), люпина белого (*Lupinus albus* L.) сорта Дера (2), нута (*Cicer arietinum* L.) сорта Заволжский (3), люцерны изменчивой (*Medicago × varia* Martyn) сорта Галия (4), донника белого (*Melilotus albus* Medik.) сорта Чермасан (5) (А) и в почве после выращивания растений (Б) при обработке семян ростстимулирующими штаммами бактерий: а — контроль, б — *Paenibacillus ehimensis* ИВ 739, в — *Pseudomonas koreensis* ИБ-4, г — *Ps. chlororaphis* ИБ-51, д — Азотовит®, е — почва без растений (вегетационный опыт, 2017 год).

Максимальное количество азота в корнях и биомассе обнаружили при инокуляции растений *P. ehimensis* ИВ 739 и обработке биопрепаратом Азотовит® (рис. 2, А). На горохе этот показатель составил 7,8-8,5 % против 3,9 % в контроле, на люцерне — 6,7-7,2 % против 5,0 % ( $p \leq 0,05$ ). После уборки растений значительное увеличение содержания азота в почве по сравнению с исходным количеством (0,5 %) отмечали при использовании штамма *P. ehimensis* ИВ 739 на горохе, нуте, люцерне, в варианте с обработкой люпина Азотовитом®, а также в почве, на которой выращивали нут, в вариантах с *Ps. koreensis* ИБ-4 и без инокуляции ( $p \leq 0,05$ ) (см. рис 2, Б). Очевидно, что штамм *P. ehimensis* ИВ 739 наиболее активно стимулировал процесс азотфиксации.

Следует подчеркнуть, что эти данные не согласуются с количеством клубеньков, образовавшихся на растениях. Например, в случае нута клубеньки не образовывались вовсе. Следовательно, фиксация азота нутом происходила только за счет присутствия в ризосфере растения-хозяина азотфиксирующих бактерий, не относящихся к ризобиям.

В вариантах опыта со штаммом *P. ehimensis* ИВ 739 запасы азота в



почве не истощались при его одновременном накоплении в растениях. В то же время на люпине при использовании биологического препарата Азотовит® происходило значительное накопление азота в почве, тогда как его усвоение растениями мы не зафиксировали.

Анализ полученных данных не выявил зависимости между нитрогеназой и нодулирующей активностью исследуемых штаммов и интенсивностью азотфиксации. Несмотря на то, что *P. ehimensis* ИВ 739 и *Ps. koreensis* ИВ-4 обладали одинаковой способностью к фиксации атмосферного азота (см. табл. 1), увеличение количества азота в почве и растениях гороха отмечалось только для штамма *P. ehimensis* ИВ 739. Обработка семян жидкой культурой штамма *Ps. chlororaphis* ИВ-51 значительно стимулировала клубенькообразование на горохе и люпине за счет выработки ауксинов, при этом накопления азота ни в растениях, ни в почве не зафиксировали.

Микробиологический анализ ризосферы бобовых культур показал, что максимальная численность микроорганизмов у крупносеменных растений приходилась на начальный период развития, а затем она снижалась. У кормовых трав, наоборот, к концу опыта отмечали увеличение количества ризосферных микроорганизмов (табл. 3). По-видимому, это объясняется различиями в жизненных циклах и стратегиях накопления элементов питания у однолетних и многолетних бобовых культур. На момент окончания опыта у зернобобовых растений наступала фаза завершения активного роста, что было напрямую связано с оттоком азота и других нутриентов из вегетативных органов в репродуктивные. При этом многолетние культуры еще продолжали активно развиваться и запасать питательные вещества в корневой системе, обеспечивая питание микробному сообществу.

Отметим также, что в конце опыта численность гетеротрофов в ризосфере у неинокулированных зернобобовых растений оказалась достоверно выше, чем у инокулированных ( $p \leq 0,05$ ). Этот факт можно расценивать как косвенное доказательство регулирующего воздействия на аборигенное бактериальное сообщество со стороны интродуцированных штаммов. Численность азотфиксирующих микроорганизмов в ризосфере как в контроле, так и в опытных вариантах на протяжении всего эксперимента составляла  $10^7$  КОЕ/г почвы. При этом в случае многолетних культур можно говорить о тенденции к увеличению численности азотфиксаторов к концу опыта.

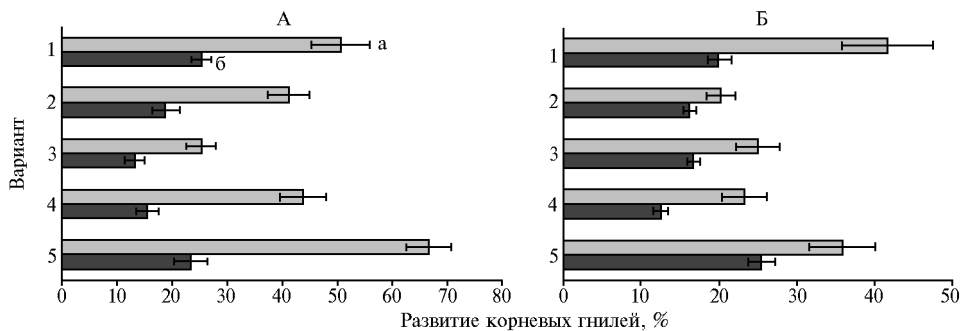


Рис. 3. Поражение гороха посевного (*Pisum sativum* L.) сорта Чишминский 95 (А) и люпина белого (*Lupinus albus* L.) сорта Дега (Б) корневыми гнилями на 18-е (а) и 45-е сут (б) после инокуляции семян ростстимулирующими штаммами бактерий: 1 — Азотовит®, 2 — *Pseudomonas chlororaphis* ИВ-51, 3 — *Ps. koreensis* ИВ-4, 4 — *Paenibacillus ehimensis* ИВ 739, 5 — контроль (вегетационный опыт, 2017 год).

Инокуляция семян штаммами бактерий, а также обработка биопрепаратом Азотовит® способствовала подавлению развития микроскопических грибов в ризосфере 2-недельных растений. К концу эксперимента

разница в численности микромицетов в контрольном и опытных вариантах была статистически недостоверной. При этом эффективность исследуемых штаммов против корневых гнилей сохранялась на протяжении всего вегетационного опыта и составила в среднем на горохе 33,7-62,1 %, на люпине — 30,4-50,9 % (рис. 3). В варианте с биопрепаратом Азотовит отмечали наибольшее количество растений, пораженных корневыми гнилями.

Таким образом, мы установили, что внесение PGPB не обязательно оказывает на растение благоприятное воздействие. Другие авторы сообщали, что эффективность бактериальных обработок может различаться даже на разных сортах одного вида сельскохозяйственной культуры (35, 36). Эти данные согласуются с результатами работы В.Н. Ефимова с соавт. (37), в которой указывается на то, что бобовые культуры очень избирательны в отношении интродуцируемых штаммов бактерий и по-разному откликаются на применение тех или иных биологических препаратов.

Известно, что ауксинподобные вещества относятся к нодулирующим агентам, то есть стимулируют процесс клубенькообразования (38). При этом низкая концентрация ИУК увеличивает клубенькообразование, а высокая ингибирует нодуляцию (39). Нами не установлена зависимость интенсивности клубенькообразования от ростстимулирующей активности бактерий, в том числе от ее природы (цитокинины, ауксины). Тем не менее, поскольку инокуляция исследуемыми штаммами не тормозила клубенькообразование, можно констатировать отсутствие конкурентного или подавляющего действия со стороны испытываемых штаммов в отношении аборигенных ризобий почвы.

Если рассматривать роль, которую свободноживущие азотфиксаторы играют в обеспечении растений азотом, то наш эксперимент подтвердил, что увеличение содержания биологического азота в почве не всегда приводит к его накоплению в корнях и биомассе растений (40). Одно из объяснений состоит в том, что фиксированный диазотрофами азот атмосферы может оставаться недоступным для растений вследствие его локализации в почве в составе микробной биомассы (41).

Итак, инокуляция семян бобовых культур штаммами бактерий родов *Paenibacillus* и *Pseudomonas*, обладающих комплексом положительных свойств (продукция фитогормонов, нитрогеназная активность, синтез антибиотических веществ), способствует увеличению всхожести семян, росту побегов и корней, улучшению азотного питания растений, стимулирует образование клубеньков, а также приводит к снижению поражения корневыми гнилями. При этом разные виды бобовых культур демонстрируют неодинаковую отзывчивость на интродукцию PGPB (plant growth promoting bacteria). В целом, полученные данные свидетельствуют о перспективности применения *Paenibacillus ehimensis* ИВ 739 на люцерне изменчивой и доннике белом, *Pseudomonas koreensis* ИБ-4, *Pseudomonas chlororaphis* ИБ-51 — на горохе посевном, люпине белом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Sziderics A.H., Rasche F., Trognitz F., Sessitsch A., Wilhelm E. Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*, 2007, 53(11): 1195-1202 (doi: 10.1139/W07-082).
2. Joo G.J., Kim Y.M., Kim J.T., Rhee I.K., Kim J.H., Lee I.J. Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. *Journal of Microbiology*, 2005, 43(6): 510-515.
3. Yang J., Klopper J.W., Ryu C.M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(1): 1-4 (doi: 10.1016/j.tplants.2008.10.004).
4. Forchetti G., Masciarelli O., Alemanno S., Alvares D., Abdala G. Endophytic bacteria in sun-

- flower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(5): 1145-1152 (doi: 10.1007/s00253-007-1077-7).
5. Francis I., Holsters M., Vereecke D. The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(1): 1-12 (doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01989.x).
  6. van Loon L.C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 2007, 119(3): 243-254 (doi: 10.1007/s10658-007-9165-1).
  7. Berg G. Plant—microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(1): 11-18 (doi: 10.1007/s00253-009-2092-7).
  8. Raaijmakers J.M., Paulitz T.C., Steinberg C., Alabouvette C., Möenne-Loccoz Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, 2009, 321(1-2): 341-361 (doi: 10.1007/s11104-008-9568-6).
  9. Chandrashekhara, Niranjanranj S., Deepak S.A., Amrutesh K.N., Shetty N.P., Shetty H.S. Endophytic bacteria from different plant origin enhance growth and induce downy mildew resistance in pearl millet. *Asian Journal of Plant Pathology*, 2007, 1(1): 1-11 (doi: 10.3923/ajppaj.2007.1.11).
  10. Walters D.R., Fountaine J.M. Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. *The Journal of Agricultural Science*, 2009, 147(5): 523-535 (doi: 10.1017/S0021859609008806).
  11. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 2007, 31(4): 425-448 (doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x).
  12. Gouws L.M., Botes E., Wiese A.J., Trenkamp S., Torres-Jerez I., Tang Y., Hills P.N., Usadel B., Lloyd J.R., Fernie A.R., Kossmann J., van der Merwe M. The plant growth promoting substance, lumichrome, mimics starch, and ethylene-associated symbiotic responses in lotus and tomato roots. *Front. Plant Sci.*, 2012, 3: 120 (doi: 10.3389/fpls.2012.00120).
  13. Khan W., Prithiviraj B., Smith D.L. Nod factor [Nod Bj V (C<sub>18:1</sub>, MeFuc)] and lumichrome enhance photosynthesis and growth of corn and soybean. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165(13): 1342-1351 (doi: 10.1016/j.jplph.2007.11.001).
  14. Hemissi I., Mabrouk Y., Abdi N., Bouraoui M., Saidi M., Sifi B. Effects of some *Rhizobium* strains on chickpea growth and biological control of *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 24(5): 4080-4090 (doi: 10.5897/AJMR10.903).
  15. Akhtar M.S., Shakeel U., Siddiqui Z.A. Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilis*, *Pseudomonas alcaligenes* and *Rhizobium* sp. on lentil. *Turk. J. Biol.*, 2010, 34: 1-7 (doi: 10.3906/biy-0809-12).
  16. Логинов О.Н., Четвериков С.П., Давлетшин Т.К., Кузина Е.В. Штамм азотфиксирующих бактерий *Pseudomonas* sp. для получения биопрепарата против заболеваний пшеницы, вызываемых фитопатогенными грибами, и повышения урожайности. Патент РФ № 2529958. Заявл. 20.08.2013. Оpubл. 10.10.2014. Бюл. № 28.
  17. Рафикова Г.Ф., Коршунова Т.Ю., Миннебаев Л.Ф., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Новый штамм бактерий *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 как перспективный агент биологического контроля фитопатогенов. *Микробиология*, 2016, 85(3): 317-326 (doi: 10.7868/S0026365616030137).
  18. Худайгулов Г.Г., Логинов О.Н., Мелентьев А.И. Экзополисахарид альгинатного типа *Raenibacillus ehimensis* 739. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 2011, 5: 214-217.
  19. Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений. *Саратовский образовательный журнал*, 1998, 10: 25-31.
  20. Иванчина Н.В., Гарипова С.Р. Влияние ростстимулирующих бактерий (PGPB) на продуктивность и устойчивость растений. *Агрохимия*, 2012, 7: 87-95.
  21. Мелентьев А.И. *Аэробные спорообразующие бактерии Bacillus Cohn в агроэкосистемах*. М., 2007.
  22. Логинов О.Н. *Бактерии Pseudomonas и Azotobacter как объекты сельскохозяйственной биотехнологии*. М., 2005.
  23. Спирина В.З., Соловьева Т.П. *Агрохимические методы исследования почв, растений и удобрений*. Томск, 2014.
  24. Кузьмина Л.Ю. *Исследование взаимодействий бактерий-антагонистов с растениями и фитопатогенными грибами. Автореф. канд. дис.* Казань, 1998.
  25. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. *Бактерии рода Pseudomonas*. Киев, 1990.
  26. *Методические указания по государственным испытаниям фунгицидов, антибиотиков и протравителей семян сельскохозяйственных культур*. М., 1985.
  27. Дзержинская И.С. *Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов*. Астрахань, 2008.
  28. Long H.N., Furuya N., Kurose D., Takeshita M., Takanami Y. Isolation of endophytic bacteria from *Solanum* sp. and their antibacterial activity against plant pathogenic bacteria. *Journal of the*

*Faculty of Agriculture, Kyushu University, 2003, 48(1-2): 21-28.*

29. Persello-Cartieaux F., David P., Sarrobert C., Thibaud M.C., Achouak W., Robaglia C., Nussaume L. Utilization of mutants to analyze the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its naturally root-associated *Pseudomonas*. *Planta*, 2001, 212(2): 190-198 (doi: 10.1007/s004250000384).
30. Compant S., Reiter B., Sessith A., Nowak J., Clement C., Barka E.A. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by a plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 71(4): 1685-1693 (doi: 10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005).
31. Idris E.E.S., Iglesias D.J., Talon M., Borriss R. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2007, 20(6): 619-626 (doi: 10.1094/MPMI-20-6-0619).
32. Веселов С.Ю., Иванова Т.Н., Симоныч М.В., Мелентьев А.И. Исследование цитокининов, продуцируемых ризосферными микроорганизмами. *Прикладная биохимия и микробиология*, 1998, 34(2): 175-179.
33. Кудоярова Г.Р., Курдиш И.К., Мелентьев А.И. Образование фитогормонов почвенными и ризосферными бактериями как фактор стимуляции роста растений. *Известия УНЦ РАН*, 2011, 3-4: 5-16.
34. Joy S.G., George P. Phytochemical analysis of alfalfa (*Medicago sativa*) seed extract by Soxhlet extraction using different solvents. *American Journal of Advanced Drug Delivery*, 2014, 2(2): 145-152.
35. Гарипова С.Р., Гарифуллина Д.В., Маркова О.В., Иванчина Н.В., Хайруллин Р.М. Изучение бактериальных ассоциаций эндофитов клубеньков, способствующих увеличению продуктивности бобовых растений. *Агрехимия*, 2010, 11: 50-58.
36. Kumari S., Khanna V. Effect of antagonistic rhizobacteria inoculated with *Mesorhizobium ciceri* on control of fusarium wilt in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *African Journal of Microbiology Research*, 2014, 8(12): 1255-1265 (doi: 10.5897/AJMR2013.6481).
37. Ефимов В.Н., Воробейков Г.А., Патил А.Б., Мирюгина Т.А., Бредихин В.Н., Хотянович А.В. Азотное питание и продуктивность гороха и кормовых бобов при обработке семян комплексом бактериальных препаратов. *Агрехимия*, 1996, 1: 10-15.
38. Ferguson V.J., Mathesius U. Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 2014, 40(7): 770-790 (doi: 10.1007/s10886-014-0472-7).
39. van Noorden G.E., Ross J.J., Reid J.B., Rolfe B.G., Mathesius U. Defective long-distance auxin transport regulation in the *Medicago truncatula* super numeric nodules mutant. *Plant Physiology*, 2006, 140(4): 1494-1506 (doi: 10.1104/pp.105.075879).
40. Spehn E.M., Scherer-Lorenzen M., Schmid B., Hector A., Caldeira M.C., Dimitrakopoulos P.G., Finn J.A., Jumpponen A., O'Donovan G., Pereira J.S., Schulze E.D., Troumbis A.Y., Körner C. The role of legumes as a component of biodiversity in a cross-European study of grassland biomass nitrogen. *Oikos*, 2002, 98: 205-218 (doi: 10.1034/j.1600-0706.2002.980203.x).
41. Шабавев В.П. Влияние внесения азотфиксирующей бактерии *Pseudomonas putida* 23 на баланс азота в почве. *Почвоведение*, 2010, 4: 471-476.

*Уфимский институт биологии —  
обособленное структурное подразделение  
ФГБНУ Уфимского ФИЦ РАН,  
450054 Россия, г. Уфа, Проспект Октября, 69,  
e-mail: linar00711@gmail.com, misshalen@mail.ru, rgf07@mail.ru,  
biolab316@yandex.ru* ✉;

*Башкирский НИИ сельского хозяйства —  
обособленное структурное подразделение  
ФГБНУ Уфимского ФИЦ РАН,  
450059 Россия, г. Уфа, ул. Рихарда Зорге, 19,  
e-mail: chanyshv.io@bashkortostan.ru*

*Поступила в редакцию  
31 октября 2018 года*

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2019, V. 54, № 3, pp. 481-493*

## PRODUCTIVITY OF LEGUME-RHIZOBIAL COMPLEX UNDER THE INFLUENCE OF GROWTH-STIMULATING MICROORGANISMS

*L.F. Minnebaev<sup>1</sup>, E.V. Kuzina<sup>1</sup>, G.F. Rafikova<sup>1</sup>, I.O. Chanyshv<sup>2</sup>, O.N. Loginov<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Ufa Institute of Biology — Subdivision of the Ufa Federal Research Centre RAS, 69, Prosp. Oktyabrya, Ufa, 450054 Russia, e-mail linar00711@gmail.com, misshalen@mail.ru, rgf07@mail.ru, biolab316@yandex.ru (✉ corresponding author);*

*<sup>2</sup>Bashkir Research Institute of Agriculture — Subdivision of the Ufa Federal Research Centre RAS, 19, ul. Rikharda Zorge, Ufa, 450059 Russia, e-mail chanyshv.io@bashkortostan.ru*

**ORCID:**Minnebaev L.F. [orcid.org/0000-0001-7332-1348](https://orcid.org/0000-0001-7332-1348)Kuzina E.V. [orcid.org/0000-0002-6905-0108](https://orcid.org/0000-0002-6905-0108)Rafikova G.F. [orcid.org/0000-0001-7655-5588](https://orcid.org/0000-0001-7655-5588)

The authors declare no conflict of interests

**Acknowledgements:**

In this work, the equipment of the BioAnalit Collective Use Center of the UIB UFIC RAS was used.

Received October 31, 2018

Chanyshev I.O. [orcid.org/0000-0002-1463-3250](https://orcid.org/0000-0002-1463-3250)Loginov O.N. [orcid.org/0000-0002-7367-2970](https://orcid.org/0000-0002-7367-2970)

doi: 10.15389/agrobiology.2019.3.481eng

**Abstract**

The lack of a general transition to environmentally oriented (environmentally friendly) agriculture is primarily due to the fact that use of biologicals shows unstable effects. An impact of the introduced microorganisms on the native soil microbiota, in particular, on natural microbial-plant relations, remains little studied. The purpose of this work was to study the effect of growth-stimulating strains of *Paenibacillus ehimensis* IB 739, *Pseudomonas koreensis* IB-4 and *Ps. chlororaphis* IB-51 on the legume plant—an aboriginal microbial community ecosystem. Seeds of pea (*Pisum sativum* L.) variety Chishminsky 95, white lupine (*Lupinus albus* L.) variety Dega, chickpea (*Cicer arietinum* L.) variety Zavolzhsky, alfalfa changeable (*Medicago × varia Martyn*) variety Galia, white melilot (*Melilotus albus* Medik.) variety Chermasan were treated with liquid cultures of rhizosphere bacteria strains. Sterile tap water was the control, and well-known microbiological fertilizer Azotovit® based on *Azotobacter chroococcum* B-9029 strain was the standard. Seed germination percentage, plant size, the number of root nodules, root rot lesions, nitrogen accumulation in the soil and nitrogen assimilation by plants, and abundance of inoculants in the soil served as estimates of the effect of seed inoculation during 45-day pot experiment carried out under room temperature and natural lighting. Plants, along with the soil samples for counting inoculants, were collected on day 18 and day 45, the samples for assessing nitrogen accumulation were collected on day 45. The obtained data indicate the stimulating effect of strains *P. ehimensis* IB 739, *Ps. koreensis* IB-4, and *Ps. chlororaphis* IB-51 on the formation and function of various legume-rhizobial communities. Treatment with plant growth-promoting (PGP) microorganisms improved seed germination, plant growth and development. In seed treating with *Ps. chlororaphis* IB-51, the root length predominantly increased, whereas *Ps. koreensis* IB-4 strain stimulated the development of the aerial parts. The *Ps. chlororaphis* IB-51 and *Ps. koreensis* IB-4 were most effective on pea, lupine and chickpea plants with no growth stimulation on alfalfa and melilot plants. The inoculation of seeds with tested bacterial strains was found to suppress the development of microscopic fungi in the rhizosphere, as a result, the root rot on peas decreased from 66.7 % to 25.3-43.8 %, on lupine from 35.9 % to 20.3-25.0 %. The inoculants showed no inhibitory effect on rhizobia, on the contrary, nodulation became more abundant. After seed bacterization of fodder crops with *P. ehimensis* IB 739, the number of nodules on the roots increased 1.9-2.6 times. *P. ehimensis* IB 739 proved to be the most active in providing accumulation of nitrogen in plants and in the soil. The nitrogen concentration in the treated pea plants was 8.5 % vs. 3.9 % in the control, in lupine — 8.6 % vs. 5.0 % in the control. To summarize, the growth-promoting properties of a strain do not guarantee its favorable effect on the productivity of leguminous plants. Strains having similar characteristics can significantly differ in their effectiveness on the same legume crops.

**Keywords:** PGPB, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, leguminous plants, growth-promoting activity, nodule formation, nitrogen fixation, plant-microorganism interaction.

**Научные собрания****IX ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ  
«СТРАТЕГИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И РАСТЕНИЙ  
С ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДОЙ»****(14-18 октября 2019 года, ИБФРМ РАН, г. Саратов)****Научные направления конференции:**

- Растительные и микробные сообщества, их биоразнообразие, механизмы функционирования и адаптация к воздействию абиотических и биотических факторов
- Метаболическая и генетическая интеграция в растительно-бактериальных симбиозах
- Микробные метаболиты и их влияние на организм человека и животных
- Современные физико-химические методы изучения микробно-растительных ассоциаций

**Контакты и информация:** <http://ibppm.ru/>