

УДК 631.472.74:631.46:631.416.5

БАКТЕРИИ-ПРОДУЦЕНТЫ ЭКТОИНА РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ТЕХНОГЕННОЙ ЗАСОЛЕННОЙ ПОЧВЕ

© 2022 г. А. В. Назаров^а *, Л. Н. Ананьина^а, А. А. Горбунов^б, А. А. Пьянкова^а^аИнститут экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Голева, 13, Пермь, 614081 Россия^бИнститут технической химии Уральского отделения РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Академика Королева, 3, Пермь, 614013 Россия

*e-mail: nazarov@iegm.ru

Поступила в редакцию 22.10.2021 г.

После доработки 18.02.2022 г.

Принята к публикации 24.02.2022 г.

С целью исследования ризосферных сообществ бактерий-продуцентов эктоина, а также оценки влияния данного осмопротекторного соединения на растения в условиях техногенного засоления изучены сообщества бактерий ризосферы растений видов марь красная (*Chenopodium rubrum* L.) и бескильница расставленная (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.), произрастающих на техногенной почве (*Technosol*) вблизи солеотвала предприятия Соликамского калийного производственного рудоуправления 2 ПАО «Уралкалий» (г. Соликамск, Пермский край). Обнаружено, что подавляющее большинство бактерий в изученной почве способно к синтезу эктоина. Установлено, что концентрация эктоина, как и численность бактерий-продуцентов, больше в ризосфере, чем в почве без растений. Концентрация эктоина в ризосфере мари красной составляла 167.4 ± 9.8 мкмоль/кг, в ризосфере бескильницы расставленной – 92.9 ± 14.1 мкмоль/кг, в почве без растений – 23.9 ± 8.4 мкмоль/кг. В составе бактериального сообщества ризосферы мари красной преобладали бактерии, принадлежащие роду *Pseudomonas*, в ризосфере бескильницы расставленной – представители рода *Halomonas*. Показано стимулирующее влияние на рост корня проростков в условиях солевого стресса штаммов: *Halomonas* sp. МК 2-1, *Pseudomonas* sp. BR 19-12, *Dietzia* sp. РМК 9, способных к продукции эктоина. Полученные данные указывают на существование положительного воздействия ризосферных бактериальных сообществ на растения в условиях засоления вследствие продукции эктоина и могут быть использованы для создания биотехнологий, повышающих продуктивность растений, произрастающих на засоленных почвах.

Ключевые слова: эктоин, бактериальные сообщества, солеотвалы, осмопротекторные соединения

DOI: 10.31857/S0032180X22080123

ВВЕДЕНИЕ

Промышленная добыча калийных солей на Верхнекамском месторождении в Пермском крае приводит к складированию на поверхности галитовых отходов, ежегодный объем образования, которых составляет 35–36 млн т [8]. Почвы, расположенные в непосредственной близости от мест складирования данных отходов – солеотвалов, имеют повышенную минерализацию и являются местообитанием для галофильных и галотолерантных растений и микроорганизмов [2, 5]. Сформировавшиеся возле солеотвалов технопедагомплески характеризуются хлоридно-натриевым засолением (сумма солей в корнеобитаемых слоях местами достигает 3.7%), щелочностью (до рН 8.8), солонцеватостью (по обменному натрию), повышенным содержанием тяжелых ме-

таллов (Cu, Ni, Ba, Pb, V, Mn, Co, Sr в 1.2–2.5 раза больше, чем в дерново-подзолистой почве) [3].

Известно, что бактерии, обитающие в прикорневой зоне почвы (ризосфере), могут снижать стрессовое воздействие засоления на растения, улучшая минеральное питание растений, продуцируя биологически активные вещества (фитогормоны, витамины), разрушая поступающую от растений в прикорневую почву 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту, снижая тем самым выработку растениями стрессового гормона – этилена [22]. Одной из основных систем защиты бактерий и растений от повышенной концентрации солей в среде является накопление осмопротекторных соединений, которые защищают клетки от осмотического стресса и обезвоживания [45, 46]. У бактерий важнейшим

осмопротектором является циклическая амидно-нокислота эктоин [21, 40].

При совместном культивировании галофильных и негалофильных бактерий устойчивость негалофильных микроорганизмов к гиперосмотическому воздействию может быть связана с усвоением ими эктоина, который образуют бактерии-галофилы [11]. Выявлено снижение негативного влияния повышенной минерализации воды на морские диатомовые водоросли в результате поступления в их клетки данного осмопротектора от ассоциированных с ними бактерий, продуцирующих эктоин [23]. Обнаружено, что эктоин обладает антистрессовым действием на клетки и ткани, стабилизирует клеточные элементы и биополимеры, благодаря чему находит применение в медицине, косметологии и биотехнологии [21, 32]. Поэтому эктоин, синтезируемый бактериями ризосферы, потенциально может оказывать положительное воздействие на растения в условиях засоления. Однако способность ризосферных бактерий образовывать эктоин в условиях засоления почвы и его роль в повышении устойчивости растений к солевому стрессу в настоящее время не изучены.

Высокая концентрация солей в почве оказывает на растения негативное воздействие из-за повышения осмотического давления почвенного раствора и токсического действия неорганических ионов на клетки [25]. Осмотический и окислительный стресс, вызванный токсическим действием солей, повреждает структуры фотосинтетического аппарата и, вследствие этого, снижает продуктивности растений [24]. Так как эктоин стабилизирует липидный слой и увеличивает гидратацию поверхности клеточных мембран, что повышает их устойчивость к осмотическому стрессу [28], наиболее вероятным механизмом положительного влияния эктоина, синтезируемого ризосферными бактериями, на растения является стабилизация в условиях засоления почвы клеточных мембран наружных клеток корня, прежде всего, корневых волосков и клеток в зоне деления.

Цель работы – исследование ризосферных сообществ бактерий-продуцентов эктоина, а также оценка влияния данного осмопротекторного соединения на растения в условиях техногенного засоления.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на территории района промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей вблизи солеотвала предприятия Соликамского калийного производственного рудоуправления 2 (СКПРУ 2) ПАО «Уралкалий» (г. Соликамск, Пермский край). Территория Соликамского района относится к зоне умеренных широт, входит в состав Атлантико-континентальной

области. Среднегодовые температуры воздуха в г. Соликамске колеблются в пределах 0.5–1.3°C, средняя температура июля 17.0–17.4°C, средняя температура января от –16.0 до –15.8°C, осадков в году выпадает 470–550 мм [12]. Рельеф ледниковый, сглаженно-увалистый, подьемы на увалы пологие, во многих местах наблюдается развитие болот, преобладающими отметками являются 140–180 м над ур. м. [13]. Соликамский район входит в почвенный подрайон Чердынско-Соликамских песчаных и супесчаных дерново-сильно- и среднеподзолистых почв, материнскими породами почв служат водно-ледниковые пески, подстилаемые покровными суглинками, ниже которых залегают пермские мергелистые глины, мергели и известняки [4]. Город Соликамск находится на южной границе района среднетаежных пихтово-еловых лесов [9].

Основными объектами исследования являлись бактериальные сообщества ризосферы растений марь красная (*Chenopodium rubrum* L.) семейства Chenopodiaceae и бескильница расставленная (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.) семейства Poaceae, произрастающих на техногенной почве (*Technosol*), сформировавшейся на площадке, созданной для солеотвала. Проективное покрытие растений растительной группировки исследуемого участка 10%, в растительном покрове преобладали бескильница расставленная (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.) (проективное покрытие 5%), марь красная (*Chenopodium rubrum* L.) (3%), марь сизая (*Ch. glaucum* L.) (1%). Почва (*Technosol*) легкоуглинистая, имеющая техногенное хлоридное калиево-натриевое засоление, содержание гумуса – 1.0%, pH водной вытяжки – 7.4, общий азот – 0.06%, Na⁺ – 1450 мг/кг, K⁺ – 366 мг/кг, содержание водорастворимых солей – 0.5%.

Отбор, подготовку и микробиологический посев почвенных образцов проводили согласно методическим рекомендациям [4]. Растения, 10 экземпляров каждого вида, выкапывали из почвы и стряхивали непрочно удерживающуюся на корнях почву, оставляя прочно связанную с корнями. Для микробиологического посева образцы корней с почвой массой 5–10 г переносили в колбу со 100 мл стерильной водой и встряхивали 5 мин на качалке со скоростью 180 оборотов в минуту. Отмытые корни вынимали из колбы, подсушивали между листов фильтровальной бумаги и взвешивали. По разнице массы корней с почвой и отмытых корней рассчитывали массу ризосферной почвы, взятой для микробиологического анализа. Контрольную почву без корней растений отбирали в 3 повторностях массой 100–200 г на расстоянии более 15 см от корней растений. Для микробиологического посева почвенную суспензию из почвы без растений получали встряхиванием на качалке аналогично образцам ризосферной почвы.

Агрохимический анализ почвы проводили стандартными методами [10], содержание органического углерода – по методу Тюрина, рН – потенциометрическим методом, общий азот – методом Кьельдаля, содержание Na^+ и K^+ – атомно-абсорбционной спектрометрией водных вытяжек из почвы на приборе AA-6300 (Shimadzu, Япония).

Для учета численности, выделения и культивирования бактерий использовали агаризованную среду Раймонда [38] с добавлением в нее (г/л): триптона – 5.0, дрожжевого экстракта – 2.5, NaCl – 50.0 и агара – 15.0. Численность бактерий выражали в количестве колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г почвы. Для оценки численности бактерий-продуцентов эктоина в почве выделенные в чистую культуру штаммы исследовали на способность к продукции эктоина.

Для определения эктоина бактериальные культуры выращивали в 50 мл минеральной среды Раймонда [38] с добавлением (г/л): NaCl – 50.0 и глюкозы – 1.0. Рост культуры контролировали по оптической плотности (ОП), измерения которой осуществляли на спектрофотометре BioSpec-mini (Shimadzu, Япония) при длине волны 540 нм. При достижении ОП₅₄₀, равной 1, клетки осаждали на центрифуге Sartorius (Германия) при 10000 об./мин в течение 15 мин при температуре +26°C. После центрифугирования 100 мг сырой бактериальной биомассы ресуспендировали в 10 мл 80%-ного раствора этанола, встряхивали 30–60 мин на вортексе АВ-30С (Россия). Суспензию центрифугировали на центрифуге Sartorius (Германия) при 10000 об./мин в течение 15 мин при температуре +26°C. Супернатант высушивали при 40°C. Сухой остаток растворяли в 1.5 мл 80%-ного раствора ацетонитрила в воде, раствор использовали для определения эктоина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ). Штаммы-продуценты эктоина отобрали для таксономического анализа.

Эктоин из почвы экстрагировали 80%-ным раствором этанола. Навеску почвы массой 10 г помещали в колбу с 20 мл этанола. Колбу с образцом встряхивали на качалке 180 об./мин в течение 10 мин. Суспензию сливали и центрифугировали при 10000 об./мин 15 мин на центрифуге (Sartorius, Германия). Почвенный осадок вновь заливали 20 мл этанола и повторяли процедуру с экстракцией почвы и центрифугированием полученной суспензии. Супернатанты (отцентрифугированные экстракты из почвы) собирали вместе, объединяли и высушивали при 40°C. Сухой остаток растворяли в 1.0 мл дистиллированной воды, добавляли 1.0 мл хлороформа и встряхивали 60 мин на вортексе АВ-30С (Россия) для удаления липидов. Полученную эмульсию центрифугировали при 10000 об./мин 15 мин на центрифуге (Sartorius, Германия). Водную фракцию использовали

для определения концентрации эктоина методом ВЭЖХ.

Эктоин из ризосферы экстрагировали из образца корней с почвой общей массой 10 г аналогично вышеописанному методу. Корни вынимали из колбы после первого встряхивания на качалке, подсушивали между листами бумаги и взвешивали. По разнице массы корней с почвой и отмытых корней вычисляли массу ризосферной почвы, взятой для анализа.

Для экстракции эктоина с фильтров из чашек Петри в биотестах растения убирали, затем в чашки добавляли 5 мл 80%-ного этанола для фиксации пробы, через 1 ч этанол выпаривали при 40°C, после чего в чашки добавляли по 10 мл дистиллированной воды и отбирали аликвоту 5 мл, которую центрифугировали в течение 5 мин со скоростью 8000 об./мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия). Супернатант использовали для анализа содержания эктоина.

Количественное определение эктоина проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе высокого давления Shimadzu LC-20 с УФ-спектрофотометрическим детектором с рабочей длиной волны $\lambda = 230$ нм (Shimadzu, Япония) согласно [42].

Бактерии идентифицировали на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. ДНК из чистых культур бактерий выделяли общепринятым методом [43]. Амплификацию нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК осуществляли на приборе C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США) при использовании бактериальных праймеров 27F и 1492R [31]. Определение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК проводили с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям производителя. Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программ Sequence Scanner v 2.0 и MEGA 6.0 (<http://www.megasoftware.net>). Поиск гомологичных последовательностей проводили в базе данных ezTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>).

Влияние бактерий-продуцентов эктоина на растения оценивали с помощью биотеста по длине корней проростков рапса (*Brassica napus* L.). Семена стерилизовали сначала 1 мин в 70%-ном этаноле, затем 10 мин в 1%-ном растворе гипохлорита натрия. Обработанные семена отмывали в стерильной воде. Для инокуляции семян использовали штаммы бактерий-продуцентов эктоина, выделенные из почвы: *Pseudomonas* sp. BR 19-12, имеющий наибольшее сходство по нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК со штаммом

Таблица 1. Концентрация эктоина и численность бактерий в почве (среднее ± стандартное отклонение)

Образец	Концентрация эктоина, мкмоль/кг	Общая численность учтенных бактерий, КОЕ/г	Численность бактерий-продуцентов эктоина, КОЕ/г
Ризосфера мари красной	167.4 ± 9.8	(3.5 ± 0.7) × 10 ⁷	(3.3 ± 0.4) × 10 ⁷
Ризосфера бескильницы расставленной	92.9 ± 14.1	(1.6 ± 0.6) × 10 ⁷	(1.5 ± 0.6) × 10 ⁷
Почва без растений	23.9 ± 8.4	(2.8 ± 0.3) × 10 ⁶	(2.6 ± 0.4) × 10 ⁶

P. xanthomarina KMM 1447^T (сходство 98.60%), *Halomonas* sp. МК 2-1 – со штаммами *Halomonas venusta* DSM 4743^T и *Halomonas hydrothermalis* Slthf2^T (99.78%), *Dietzia* sp. РМК 9 – с *Dietzia psychrocaliphila* JCM 10987^T (99.56%). Штамм *Halomonas* sp. МК 2-1 был выделен из ризосферы мари красной, *Pseudomonas* sp. BR19-12 – из ризосферы бескильницы расставленной, *Dietzia* sp. РМК 9 – из почвы без растений. Семена инокулировали в течение 1 ч суточной суспензией бактерий в концентрации 10⁸/г семян. Обработанные семена помещали в количестве 25 шт. в чашки Петри на поверхность фильтровальной бумаги и заливали 5 мл 1.0%-ного раствора NaCl. Через 7 сут измеряли длину корней проростков и концентрацию эктоина.

Оценку воздействия эктоина на растения проводили аналогично эксперименту (биотесту), описанному выше. Стерильные семена помещали в чашки Петри на поверхность фильтровальной бумаги и заливали 5 мл 1.0%-ного раствора NaCl с добавлением эктоина. Концентрация добавленного эктоина (0.17, 1.13 и 0.14 мкмоль/5 мл) соответствовала его содержанию в вариантах эксперимента с обработкой семян бактериями-продуцентами эктоина: *Pseudomonas* sp. BR19-12 (0.17 мкмоль/5 мл), *Halomonas* sp. МК 2-1 (1.13 мкмоль/5 мл) и *Dietzia* sp. РМК 9 (0.14 мкмоль/5 мл).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Для описания результатов исследования применяли стандартные методы параметрической статистики: рассчитывали среднее арифметическое (M), стандартное отклонение (SD). Сравнение двух групп проводили при помощи двустороннего критерия Стьюдента. Критическим уровнем значимости в данном исследовании принимали 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В изученной почве (*Technosol*) как в ризосфере растений, так и в почве без корней растений методом ВЭЖХ был обнаружен эктоин (табл. 1). Содержание эктоина в ризосфере было больше, чем в почве без растений. Так, в ризосфере мари красной содержание эктоина больше в 7.0 раз, в ризосфере бескильницы расставленной – в 3.9 раза,

что, очевидно, связано с большей численностью бактерий, способных к продукции эктоина. Численность данных бактерий в ризосфере мари красной была больше, чем в почве без растений – в 11.7 раза, в ризосфере бескильницы расставленной – в 5.8 раза.

В настоящее время накопление в почве осмопротекторных веществ, в том числе эктоина, обнаружено при снижении ее влажности [19, 50]. В результате стрессового воздействия на почвенные микроорганизмы, вызванного высыханием почвы, общее содержание осмопротекторных соединений возрастает до 5 раз и более [47, 51]. Концентрация эктоина в почве (*Abruptic Lixisol*) саванноидного растительного сообщества в Австралии в условиях недостатка воды составила 1.6 мкмоль/кг, гидроксиэктоина – 2.8 мкмоль/кг [51]. В изученной почве с техногенным засолением (*Technosol*) эктоин выявлен в большей концентрации (табл. 1), чем в ранее изученной почве с низкой влажностью [51], при этом гидроксиэктоин в исследованной почве не обнаружен.

В проведенном исследовании в ризосфере мари красной была выявлена большая численность бактерий, чем в ризосфере бескильницы расставленной (табл. 1). Численность бактерий в ризосферной зоне обусловлена количеством органических веществ, поступающих с корневыми выделениями, так как выделяемые корнями органические соединения являются источником питания для ризосферных бактерий, поэтому [33] количество органических соединений в корневых выделениях зависит от вида растений, их фенофазы, возраста и физиологического состояния, а также факторов окружающей среды [15]. Кроме того, на количество органических веществ, выделяемых корнями, влияет морфология и анатомия корней. Так, с увеличением диаметра корней возрастает количество корневых выделений в ризосферную зону [52]. Бескильница расставленная имеет мочковатую корневую систему, состоящую из множества тонких корней, мари красная – стержневую корневую систему, образованную меньшим количеством более толстых корней. Поэтому различие между данными видами в количестве корневых выделений и, следовательно, в численности бактерий в ризосфере, возможно, определяется типом корневой системы. Например, в ряде работ

Таблица 2. Биоразнообразие бактерий-продуцентов эктоина

Род бактерий	Типовой штамм ближайшего родственного вида (сходство, %)	Доля рода в бактериальном сообществе, %
Ризосфера мари красной		
<i>Halomonas</i>	<i>H. hydrothermalis</i> Slthf2 ^T (99.8); <i>H. taeanensis</i> BH539 ^T (99.3); <i>H. titanicae</i> BH1 ^T (98.9); <i>H. ventosae</i> A112 ^T (99.3); <i>H. venusta</i> DSM 4743 ^T (99.8)	67.6
<i>Bacillus</i>	<i>B. hwajinpoensis</i> SW-72 ^T (99.7); <i>B. marisflavi</i> TF-11 ^T (100.0)	12.2
<i>Photobacterium</i>	<i>P. halotolerans</i> MACL01 ^T (97.9)	6.9
<i>Planomicrobium</i>	<i>P. flavidum</i> ISL-41 ^T (99.1)	3.0
<i>Salegentibacter</i>	<i>S. salarii</i> ISL-6 ^T (99.1)	2.4
<i>Microbacterium</i>	<i>M. terricola</i> KV-448 ^T (98.8)	1.2
<i>Marinobacter</i>	<i>M. maritimus</i> CK47 ^T (97.8)	1.0
Ризосфера бескильницы расставленной		
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. xanthomarina</i> KMM 1447 ^T (98.6–98.9)	88.6
<i>Halomonas</i>	<i>H. variabilis</i> DSM 3051 ^T (99.4)	3.0
<i>Rhodococcus</i>	<i>R. wratislaviensis</i> NCIMB 13082 ^T (100.0); <i>R. fascians</i> DSM 20669 ^T (100.0)	1.3
<i>Arthrobacter</i>	<i>A. nicotianae</i> DSM 20123 ^T (98.8)	0.6
<i>Bacillus</i>	<i>B. marisflavi</i> TF-11 ^T (99.9); <i>B. vietnamensis</i> 15-1 ^T (99.7–98.8)	0.3
Почва без растений		
<i>Halomonas</i>	<i>H. alkaliphila</i> 18bAG ^T (99.8); <i>H. titanicae</i> BH1 ^T (100.0)	35.6
<i>Dietzia</i>	<i>D. psychrocaliphila</i> JCM 10987 (99.6)	23.7
<i>Bacillus</i>	<i>B. hwajinpoensis</i> SW-72 ^T (99.5); <i>B. vietnamensis</i> 15-1 ^T (99.8)	18.2
<i>Salinibacterium</i>	<i>S. amurskyense</i> KMM 3673 ^T (99.8–99.9)	15.4

выявлено меньшее количество органических веществ, выделяемых корнями пшеницы, имеющей мочковатую корневую систему по сравнению с корнями растений томата [6] и рапса [49], обладающими стержневой корневой системой.

Доля выделенных штаммов-продуцентов эктоина в бактериальном сообществе ризосферы мари красной составляла 94.3%, ризосферы бескильницы расставленной – 93.8%, почвы без растений – 92.9% от общей численности КОЕ бактерий, учтенных на агаризованной среде Раймонда. Полученные данные согласуются с литературными, согласно которым эктоин является наиболее широко распространенным осмопротекторным соединением аэробных хемогетеротрофных эубактерий [40].

В ризосфере бескильницы расставленной наибольшую часть бактериального сообщества составляли представители рода *Halomonas* (табл. 2), способные к синтезу эктоина. В ряде работ также отмечено преобладание бактерий рода *Halomonas* в ризосфере галофильных растений засоленных местообитаний: берегов соленых озер национального парка Кишкуншаг в Венгрии [18], солончаков, расположенных на юге Туниса [35], побережья Персидского залива [14], мангровых лесов Саудовской Аравии [17], засоленных почв Приаралья [1]. Кроме того, известно, что бактерии рода *Halomonas* являются активными продуцентами эктоинов [26].

В ризосфере мари красной преобладали бактерии-продуценты эктоина, принадлежащие к роду

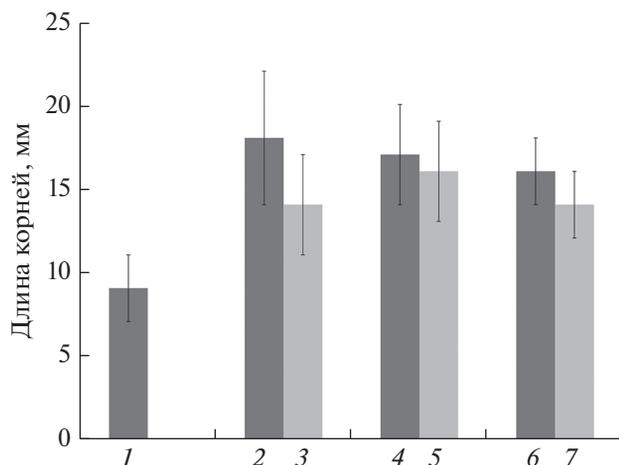


Рис. 1. Влияние бактерий и эктоина на длину корней рапса в растворе NaCl (1%): 1 – без бактерий; 2 – *Pseudomonas* sp. BR 19-12; 3 – эктоин, 0.17 мкмоль; 4 – *Halomonas* sp. МК 2-1; 5 – эктоин, 1.13 мкмоль; 6 – *Dietzia* sp. РМК 9; 7 – эктоин, 0.14 мкмоль.

Pseudomonas, имевшие наибольшее сходство по нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК со штаммом *P. xanthomarina* КММ 1447^T. Ранее сообщалось об изоляции *P. xanthomarina* из ризосферы [44] и из тканей растений [20, 40] как засоленных, так и незасоленных экосистем. Способность к продукции эктоина среди представителей рода *Pseudomonas* выявлена у *P. stutzeri* [48] и *P. syringae* pv. *syringae* [30].

Инокуляция растений бактериями и добавление эктоина в концентрациях, равных его содержанию в чашках с растениями, инокулированными бактериями, снижала негативное влияние засоления на рост корней растений (рис. 1). В вариантах эксперимента с инокуляцией бактерий проростки растений имели в 1.8–2.0 раза большую длину корней, чем в варианте без инокуляции. При этом длина корней растений при добавлении эктоина составляла 78–94% от их длины в вариантах с инокуляцией семян растений бактериями, имеющими такую же концентрацию эктоина в экстрактах с чашек Петри. Уровень значимости отличий значений длины корней между вариантами опытов с добавлением в чашки Петри эктоина и вариантами с инокуляцией бактериями составлял: для штамма *Pseudomonas* sp. BR 19-12 – 0.0000002, для штамма *Halomonas* sp. МК 2-1 – 0.0342972, для штамма *Dietzia* sp. РМК 9 – 0.0002736. Фактический критерий Стьюдента при сравнении данных был равен 5.6, 2.1, 3.8 при числе степеней свободы 98, 107 и 82, соответственно. Полученные значения указывают на наличие достоверной разницы между величинами измеренного параметра в вариантах с инокуляцией семян бактериями и вариантами с добавлением в чашки Петри эктоина при доверительной вероятности 95%. Большая длина корней про-

ростков в вариантах с инокуляцией бактерий, чем в вариантах с добавлением эктоина, вероятно, обусловлена способностью бактерий продуцировать не только эктоин, но и другие биологически активные вещества (фитогормоны, витамины).

В ряде работ выявлено положительное действие на растения в условиях засоления их обработки осмопротекторами: бетаином и пролином [27, 29, 34]. В то же время данные о снижении негативного воздействия засоления на растения, обработанные эктоином, получены впервые. Между тем, известно, что введение бактериальных генов синтеза эктоина в геном табака и томата приводило к накоплению данного осмопротектора в тканях растений и к повышению устойчивости к засолению трансгенных растений [36, 37]. Кроме того, многочисленны работы о положительном воздействии на растения в условиях засоления галофильных и галотолерантных бактерий, в частности бактерий рода *Halomonas* [16, 38]. Однако до сих пор не обращалось внимания на синтез осмопротекторов галофильными и галотолерантными ризосферными бактериями, как на механизм повышения устойчивости растений к засолению среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружено, что подавляющее большинство выделенных бактерий из изученной почвы способно к синтезу эктоина. Доля выделенных штаммов-продуцентов эктоина в бактериальном сообществе ризосферы мари красной составляла 94.3%, ризосферы бескильницы расставленной – 93.8%, почвы без растений – 92.9%. Выделенные бактерии-продуценты эктоина из ризосферы мари красной принадлежали к родам *Halomonas*, *Bacillus*, *Photobacterium*, *Planomicrobium*, *Salegentibacter*, *Microbacterium*, *Marinobacter*, из ризосферы бескильницы расставленной – относились к родам *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, из почвы без растений – к родам *Halomonas*, *Dietzia*, *Bacillus*, *Salinibacterium*.

Выявлено наличие данного осмопротектора в засоленной техногенной почве (*Technosol*), при этом содержание эктоина в ризосфере было больше, чем в почве без растений, что, очевидно, связано с большей численностью бактерий-продуцентов эктоина в ризосфере изученных растений. Установлено стимулирующее влияние эктоина на рост корней растений при засолении среды. Полученные данные указывают на существование положительного воздействия ризосферных бактериальных сообществ на растения в условиях засоления вследствие продукции эктоина.

Исследования ризосферных бактерий, продуцирующих эктоин, и роль данного соединения в повышении солеустойчивости растений способ-

ствуют пониманию принципов функционирования микробно-растительных ассоциаций в условиях засоления и потенциально могут быть основой для создания биотехнологий, повышающих продуктивность растений, произрастающих на засоленных почвах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290008-4.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бегматов Ш.А., Селицкая О.В., Васильева Л.В., Берестовская Ю.Ю., Манучарова Н.А., Дренова Н.В. Морфофизиологические особенности некоторых культивируемых бактерий засоленных почв Приаралья // Почвоведение. 2020. № 1. С. 81–88. <https://doi.org/10.31857/S0032180X20010049>
2. Ерёмченко О.З., Лымарь О.А. Почвенно-экологические условия зоны солеотвалов и адаптация к ним растений // Экология. 2007. № 1. С. 18–23.
3. Ерёмченко О.З., Четина О.А., Кусакина М.Г., Шестаков И.Е. Техногенные поверхностные образования зоны солеотвалов и адаптация к ним растений. Пермь, 2013. 148 с.
4. Кортаев Н.Я. Почвы Пермской области. Пермь, 1962. 277 с.
5. Корсакова Е.С., Ананьина Л.Н., Назаров А.В., Бачурин В.А., Плотникова Е.Г. Разнообразие бактерий семейства *Halomonadaceae* района разработок Верхнекамского месторождения солей // Микробиология. 2013. Т. 82. № 2. С. 247–250. <https://doi.org/10.7868/S0026365613020079>
6. Кравченко Л.В., Шапошников А.И., Макарова Н.М., Азарова Т.С., Львова К.А., Костюк И.И., Ляпунова О.А., Тихонович И.А. Состав корневых экзометаболитов мягкой пшеницы и томата, влияющих на растительно-микробные взаимодействия в ризосфере // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 5. С. 781–786.
7. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 303 с.
8. О состоянии и об охране окружающей среды Пермского края в 2019 году. Доклад Министерства природных ресурсов, лесного хозяйства и экологии Пермского края. Пермь, 2020. 285 с.
9. Овеснов С.А. Конспект флоры Пермской области. Пермь, 1997. 252 с.
10. Практикум по агрохимии / Под ред. В.Г. Минеева. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2001. 689 с.
11. Стрелкова Е.А., Позднякова Н.В., Журина М.В., Плакунов В.К., Беляев С.С. Роль внеклеточного полимерного матрикса в устойчивости бактериальных биопленок к экстремальным факторам среды // Микробиология. 2013. Т. 82. № 2. С. 131–138. <https://doi.org/10.7868/S0026365613020158>
12. Шкляев А.С., Балков В.А. Климат Пермской области. Пермь, 1963. 163 с.
13. Ястребов Е.В. Рельеф // Пермская область. Пермь, 1959. С. 30–41.
14. Al-Mailem D.M., Sorkhoh N.A., Marafie M., Al-Awadhi H., Eliyas M., Radwan S.S. Oil phytoremediation potential of hypersaline coasts of the Arabian Gulf using rhizosphere technology // Biores. Technol. 2010. V. 101. P. 5786–5792. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.082>
15. Baldri D.V., Vivanco J.M. Regulation and function of root exudates // Plant Cell Environ. 2009. V. 32. P. 666–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01926.x75>
16. Bharti N., Barnawal D., Maji D., Kalra A. Halotolerant PGPRs Prevent Major Shifts in Indigenous Microbial Community Structure Under Salinity Stress // Microb. Ecol. 2015. V. 70. P. 196–208. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0557-4>
17. Bibi F., Ullah I., Alvi S.A., Bakhsh S.A., Yasir M., Al-Ghamdi A.A.K., Azhar E. Isolation, diversity, and biotechnological potential of rhizo- and endophytic bacteria associated with mangrove plants from Saudi Arabia // Genet. Mol. Res. 2017. V. 16. P. 1–12. <https://doi.org/10.4238/gmr16029657>
18. Borsodi A.K., Barany A., Krett G., Marialigeti K., Szilokovacs T. Diversity and ecological tolerance of bacteria isolated from the rhizosphere of halophyton plants living nearby Kiskunsag soda ponds, Hungary // Acta Microbiol. Immunol. Hung. 2015. V. 62. P. 183–197. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.2.8>
19. Bouskill N.J., Wood T.E., Baran R., Ye Z., Bowen B.P., Chien Lim H., Zhou J., Van Nostrand J.D., Nico P., Northen T.R., Silver W.L., Brodie E.L. Belowground Response to Drought in a Tropical Forest Soil. I. Changes in Microbial Functional Potential and Metabolism // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00525>
20. Chen W.-M., Tang Y.-Q., Mori K., Wu X.-L. Distribution of culturable endophytic bacteria in aquatic plants and their potential for bioremediation in polluted waters // Aquat. Biol. 2012. V. 15. P. 99–110. <https://doi.org/10.3354/ab00422>
21. Czech L., Hermann L., Stöveken N., Richter A.A., Höpner A., Smits S.H.J., Heider J., Bremer E. Role of the Extremolytes Ectoine and Hydroxyectoine as Stress Protectants and Nutrients: Genetics, Phylogenomics, Biochemistry, and Structural Analysis // Genes. 2018. V. 177. № 9. P. 1–58. <https://doi.org/10.3390/genes9040177>
22. Dimkpa C., Weinand T., Asch F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions // Plant Cell Environ. 2009. V. 32. P. 1682–1694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x>
23. Fenizia S., Thume K., Wirgenings M., Pohnert G. Ectoine from Bacterial and Algal Origin Is a Compatible Solute in Microalgae // Mar. Drugs. 2020. № 18. V. 42. P. 1–13. <https://doi.org/10.3390/md18010042>
24. Gao H.-J., Yang H.-Y., Bai J.-P., Liang X.-Y., Lou Y., Zhang J.-L., Wang D., Zhang J.-L., Niu S.-Q., Chen Y.-L. Ultrastructural and physiological responses of potato

- (*Solanum tuberosum* L.) plantlets to gradient saline stress // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 5. P. 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00787>
25. Gupta B., Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization // *Int. J. Genom.* 2014. P. 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>
 26. Haba R.R., Arahall D.R., Sánchez-Porro C., Ventosa A. The family *Halomonadaceae* // *The prokaryotes. Gammaproteobacteria*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2014. P. 325–360.
 27. Habib N., Ashraf M., Ali Q., Perveen R. Response of salt stressed okra (*Abelmoschus esculentus* Moench) plants to foliar-applied glycine betaine and glycine betaine containing sugarbeet extract // *South African J. Botany.* 2012. V. 83. P. 151–158.
 28. Harishchandra R.K., Wulff S., Lentzen G., Neuhaus T., Galla H.-J. The effect of compatible solute ectoine on the structural organization of lipid monolayer and bilayer membranes // *Biophys. Chem.* 2010. V. 150. № 1–3. P. 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2010.02.007>
 29. Hossain M.A., Fujita M. Evidence for a role of exogenous glycinebetaine and proline in antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2010. V. 16. P. 19–29. <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0003-0>
 30. Kurz M., Burch A.Y., Seip B., Lindow S.E., Gross H. Genome-driven investigation of compatible solute biosynthesis pathways of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and their contribution to water stress tolerance // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 5452–5462. <https://doi.org/10.1128/AEM.00686-10>
 31. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* / Eds E. Stackebrandt, M. Goodfellow N.Y: John Wiley and Sons, 1991. P. 115–175.
 32. Lentzen G., Schwarz T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 72. P. 623–634. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0553-9>
 33. Lynch J.M. *The Rhizosphere*. Chichester: John Wiley and Sons, 1990. 458 p.
 34. Mapelli F., Marasco R., Rolli E., Barbato M., Cherif H., Guesmi A., Ouzari I., Daffonchio D., Borin S. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with *Salicornia* growing in Tunisian hypersaline soils // *Biomed. Res. Int.* 2013. V. 2013. P. 1–13. <https://doi.org/10.1155/2013/248078>
 35. Meloni D., Martinez C. Glycinebetaine improves salt tolerance in vinal (*Prosopis ruscifolia* Griesbach) seedlings. *Braz. J. Plant Physiol.* 2009. V. 21. № 3. P. 233–241.
 36. Moghaieb R.E., Tanaka N., Saneoka H., Murooka Y., Ono H., Nakamura A., Nguyen N.T., Suwa R., Fujita K. Characterization of salt tolerance in ectoine-transformed tobacco plants (*Nicotiana tabacum*): photosynthesis, osmotic adjustment, and nitrogen partitioning // *Plant, Cell Environ.* 2006. V. 29. P. 173–182. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01410.x>
 37. Moghaieb R.E., Nakamura A., Saneoka H., Fujita K. Evaluation of salt tolerance in ectoine-transgenic tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in terms of photosynthesis, osmotic adjustment, and carbon partitioning // *GM crops.* 2011. V. 2. P. 58–65. <https://doi.org/10.4161/gmcr.2.1.15831>
 38. Orhan F. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*) // *Braz. J. Microbiol.* 2016. V. 47. P. 621–627. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.001>
 39. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // *Developments in Industrial Microbiology.* 1961. V. 2. № 1. P. 23–32.
 40. Roberts M.F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms // *Saline Syst.* 2005. V. 1. P. 1–30. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>
 41. Rocha J., Tacao M., Fidalgo C., Alves A., Henriques I. Diversity of endophytic *Pseudomonas* in *Halimione portulacoides* from metal(loid)-polluted salt marshes // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2016. V. 23. P. 13255–13267. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6483-x>
 42. Schubert T., Maskow T., Benndorf D., Harms H., Breuer U. Continuous synthesis and excretion of the compatible solute ectoine by a transgenic, nonhalophilic bacterium // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 3343–3347. <https://doi.org/10.1128/AEM.02482-06>
 43. Short protocols in molecular biology / Eds. F.M. Ausubel et al. N.Y.: John Wiley and Sons, 1995. 836 p.
 44. Shukla K.P., Sharma S., Singh N.K., Singh V. Deciphering Rhizosphere Soil System for Strains Having Plant Growth Promoting and Bioremediation Traits // *Agric. Res.* 2012. V. 1. P. 251–257. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0028-4>
 45. Slama I., Abdelly C., Bouchereau A., Flowers T., Savoure A. Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress // *Annals of Botany.* 2015. V. 115. P. 433–447. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu239>
 46. Sleator R.D., Hill C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence // *FEMS Microbiol. Rev.* 2001. V. 26. P. 49–71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00598.x>
 47. Slessarev E.W., Lin Y., Jimenez B.Y., Homyak P.M., Chadwick O.A., D'Antonio C.M., Schimel J.P. Cellular and extracellular C contributions to respiration after wetting dry soil // *Biogeochemistry.* 2020. V. 147. P. 307–324. <https://doi.org/10.1007/s10533-020-00645-y>
 48. Stöveken N., Pittelkow M., Sinner T., Jensen R.A., Heider J., Bremer E. A specialized aspartokinase enhances the biosynthesis of the osmoprotectants ectoine and hydroxyectoine in *Pseudomonas stutzeri* A1501 // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 4456–4468. <https://doi.org/10.1128/JB.00345-11>
 49. Tang L.L., Zhan M., Shang C.H., Yuan J.Y., Wan Y.B., Qin M.G. Dynamics of root exuded carbon and its relationships with root traits of rapeseed and wheat // *Plant Soil Environ.* 2021. V. 67. P. 317–323. <https://doi.org/10.17221/561/2020-PSE>
 50. Warren C.R. Pools and fluxes of osmolytes in moist soil and dry soil that has been re-wet // *Soil Biol. Biochem.*

2020. V. 150. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.108012>
51. Warren C.R. Response of osmolytes in soil to drying and rewetting // *Soil Biol. Biochem.* 2014. V. 70. P. 22–32.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.008>
52. Williams A., Langridge H., Straathof A.L., Muhamadali H., Hollywood K.A., Goodacre R., de Vries F.T. Root functional traits explain root exudation rate and composition across a range of grassland species // *J Ecol.* 2022. V. 110. P. 21–33.
<https://doi.org/10.1111/1365-2745.13630>

Bacteria Producing Ectoin of the Rhizosphere of Plants Growing on Technogenic Saline Soil

A. V. Nazarov^{1, *}, L. N. Anan'ina¹, A. A. Gorbunov², and A. A. Pyankova¹

¹ *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, 614081 Russia*

² *Institute of Technical Chemistry UB RAS, Perm, 614013 Russia*

*e-mail: nazarov@iegm.ru

In order to study the rhizosphere communities of bacteria-producers of ectoine, as well as to assess the effect of this osmoprotective compound on plants, under the conditions of technogenic salinization, we studied the communities of bacteria in the rhizosphere of plants of the species of red goosefoot (*Chenopodium rubrum* L.) and weeping alkaligras (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.), growing on technogenic soil (Technosol) near the salt dump of the Solikamsk Potash Industrial Ore Administration 2 (SKPRU 2) of PJSC Uralkali (Solikamsk, Perm Territory). It was found that the overwhelming majority of bacteria in the studied soil are capable of synthesizing ectoine. It was found that the concentration of ectoine, as well as the number of producing bacteria, was higher in the rhizosphere than in the soil without plants. The concentration of ectoine in the rhizosphere of red goosefoot was $167.4 \pm 9.8 \mu\text{mol/kg}$, in the rhizosphere of an unstable beetle $92.9 \pm 14.1 \mu\text{mol/kg}$, in soil without plants $23.9 \pm 8.4 \mu\text{mol/kg}$. Bacteria belonging to the genus *Pseudomonas* predominated in the bacterial community of red goosefoot rhizosphere, and representatives of the genus *Halomonas* prevailed in the rhizosphere of weeping alkaligras. A stimulating effect was shown on the growth of seedling roots under conditions of salt stress of strains producing ectoine: *Halomonas* sp. MK 2-1, *Pseudomonas* sp. BR 19-12, *Dietzia* sp. PMK 9. The data obtained indicate the existence of a positive effect of rhizosphere bacterial communities on plants under salinization due to the production of ectoine and can be used to create biotechnologies that increase the productivity of plants growing on saline soils.

Keywords: technogenic salinization, rhizosphere, bacteria, ectoine, bacterial communities