

УДК 581.5:633.358:577.13

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ С НЕРИЗОБИАЛЬНЫМИ ЭНДОФИТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ РАСТЕНИЙ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.), ПЕРЕМЕЩАЮЩИМИСЯ ИЗ ИХ КОРНЕЙ В ПРИКОРНЕВУЮ ЗОНУ

© 2021 г. Л. Е. Макарова¹ *, Ю. А. Маркова¹, А. С. Морищ¹,
М. С. Карепова¹, А. В. Сидоров¹, Н. А. Соколова¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 30.12.2020 г.

После доработки 19.02.2021 г.

Принята к публикации 22.02.2021 г.

Показано, что из 11 штаммов эндофитных бактерий, обнаруженных в семенах растений гороха (*Pisum sativum* L.), 6 оказывались в водной среде роста корней их проростков в условиях гидрокультуры. Обнаружено различное влияние бактерий инокулятов (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Azotobacter chroococcum* и *Rhodococcus erythropolis*) на состав и концентрацию эндофитных бактерий в прикорневой зоне проростков гороха. У всех 6 культур эндофитных бактерий, обнаруженных в зоне роста корней, выявлена различная способность к деградации N-фенил-2-нафтиламина (N-ФНА) с образованием фталатов. На неодинаковый характер катаболизма этими бактериями N-ФНА, негативного аллелопатического компонента корневых экссудатов бобовых культур, указывал процент неразрушенного в среде роста субстрата и соотношение видов фталатов, образовавшихся при его деградации. Эти показатели могли определять степень участия выявленных эндофитных бактерий в контроле взаимоотношений растений гороха с разнообразными по стратегии взаимодействия бактериями.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., ризосфера, межмикробные взаимодействия, эндофитные бактерии, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Rhodococcus*, N-фенил-2-нафтиламин, фталаты

DOI: 10.31857/S0555109921040103

В публикации [1] сообщалось об исследованиях 50-летней давности, когда были получены первые доказательства сосуществования в клубеньках бобовых культур ризобий с эндофитными бактериями, а позднее показана неспособность последних самостоятельно вызывать образование клубеньков. Результаты многих исследований представлены доказательства важной роли непатогенных эндофитных бактерий в питании, защите от патогенов и регуляции роста растений [1–6]. В литературе приводятся свидетельства способности растений регулировать не только локализацию эндофитных бактерий в пределах организма, но и их численность, а также свидетельства возможности эндофитных ненодулирующих видов бактерий осуществлять биоконтроль растений. В публикации [7] высказано мнение, что поселяющиеся в клубеньках неризобийные эндофитные бактерии способствуют функционированию азотфиксирующей системы, обеспечивая улучшение минерального питания и синтез биологически активных соединений. В настоящее время обсуждаемую группу

бактерий объединяют термином PGPE (Plant Growth Promoting Endophytes), подобно бактериям, отнесенным к группе PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), которые, как известно, также играют существенную положительную роль для растений [2].

В список таксонов эндофитных бактерий, встречающихся у бобовых культур, входит более 25 неризобийных и 10 ризобийных родов, включая *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Sphingomonas*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*, *Devosia*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Azospirillum* и др. [4, 8].

В обзорах [2, 8] обсуждаются пути и механизмы проникновения эндофитных бактерий в ткани бобовых культур. Эндофитные бактерии попадают в растения в основном через корневую систему из почвы и, отчасти, через устьица. Существует вероятность проникновения этих бактерий также и с участием гидролитических ферментов. Экспе-

риментально показано [5], что одним из путей попадания эндофитных бактерий в корни являются разрывы в области выхода боковых корней, и дальнейшее их проникновение в ткани коры и сосудистой системы, как полагают, осуществляется апопластическим путем. Допускают проникновение эндофитных неризобияльных бактерий в корни совместно с ризобиями через корневые волоски [4, 7].

Приведенные в ряде публикаций факты указывают на присутствие эндофитных бактерий у бобовых культур не только в клубеньках, но и в разных органах и в сосудистых системах [1, 2, 7–9].

У исследователей, работающих с бобовыми культурами, интерес вызывают в основном бактерии, поселяющиеся в корнях и корневых клубеньках. Носителями и местом временного сохранения эндофитных бактерий могут быть семена растений [8, 10]. Однако в семенах бобовых культур эти бактерии менее исследованы. Известно об изолировании из семян гороха *Paenibacillus mendelii* sp. nov. [11]. При прорастании семени вероятны перемещения эндофитных бактерий в ткани надземных и подземных органов проростков. Миграция из семени в корни — это еще один возможный путь для появления эндофитных бактерий не только в составе бактериальной ассоциации клубеньков, образующихся под влиянием ризобий, но также и в составе ризосферного микробиома. На перемещение эндофитных бактерий из корней в прикорневую зону проростков гороха также указывали результаты исследований, представленных в настоящей работе.

Растение может контролировать концентрацию бактерий в прикорневой зоне посредством биологически активных компонентов корневых экссудатов негативного действия. В числе негативных аллопатических соединений в корневых экссудатах растений гороха наряду с давно известным фитоалексином пизатином были выявлены N-фенил-2-нафтиламин (N-ФНА) и фталаты [12]. В недавно опубликованной работе [13] показано, что некоторые виды ризосферных бактерий способны осуществлять деградировать N-ФНА до фталатов, а также преобразовывать одни виды фталатов в другие. Можно предположить, что количество и качественный состав фталатов в прикорневой зоне растения формируются в результате экскреции этих соединений из корней и трансформации бактериями, присутствующими в ризосфере. Важно, что фталаты могут подавлять бактерии избирательно, в зависимости от вида бактерий, типа алкильных заместителей в молекулах фталатов и концентрации их в среде [14]. На степень разнообразия бактерий ризосферного микробиома могут влиять возникающие в прикорневой зоне количественные и качественные изменения в составе фталатов. Количество этих соединений может

возрастать благодаря присутствующим в ризосфере видам бактерий, способных образовывать фталаты при деградации полициклических соединений [13]. Падение их количества вероятно при деградации фталатов по β -кетoadипатному пути до кислот цикла Кребса [15]. Один из двух путей биodeградации полициклических ароматических соединений, который приводил к образованию *o*-фталевой кислоты, чаще всего выявляли у представителей таких родов бактерий, как *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Burkholderia* [15–18]. К некоторым из перечисленных родов бактерий относятся виды эндофитных бактерий, поселяющихся в тканях бобовых культур [4, 8].

Цель работы — выяснение роли эндофитных бактерий, обнаруживаемых в прикорневой зоне корней проростков гороха в результате перемещения из корневых тканей во внешнюю среду, в биоконтроле ризосферного микробиома.

МЕТОДИКА

Объекты исследований. Объектами исследования служили семена и проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Торсдаг. Семена урожая 2017 г. получены при выращивании растений гороха в открытом грунте на территории СИФИБР СО РАН. В качестве инокулятов использовали бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (штамм 245 а — RCAM 1022, получен из Всероссийского института сельскохозяйственной микробиологии, г. Пушкин, Россия), и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* штамм. 1845, *Azotobacter chroococcum* штамм Az d10 ВКМ В-2272 Д, *Rhodococcus erythropolis* штамм 108 ВКМ — Ас 2784 Д из коллекции Центра коллективного пользования (ЦКП “Биоресурсный центр” Сибирского института физиологии и биохимии растений (СИФИБР СО РАН)).

Эксперименты с проростками проводили по схеме, описанной нами ранее [12]. Согласно схеме прорастание семян и рост проростков, служивших исходным материалом в работе, проводили на влажной фильтровальной бумаге в термостате без освещения при температуре 21°C в течение 48 ч. Далее проростки инкубировали в условиях гидрокультуры в камере BINDER KBW-240 (“Binder”, Германия) при 21°C, освещении $81 \text{ мкМ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь) в течение 24 ч. При изучении межбактериальных взаимодействий эндофитных бактерий с вносимыми в среду бактериями в составе инокулятов верхнюю часть проростков (семя + эпикотиль) располагали на поверхности пластиковой решетки. В отверстия решетки, служившей также крышкой сосуда с водной средой объемом 240 мл, пропускали корни проростков, которые на расстоянии 1.5 см от поверхности решетки погру-

жали в водную среду. При таком размещении верхняя часть проростков не контактировала с водой. Для предотвращения проникновения в сосуды бактерий из внешней среды сверху на крышку сосудов с растениями помещали плотно прилегающие по ее краям стеклянные чашки. Для получения достоверных доказательств выхода эндофитных бактерий из корней в прикорневую зону при проведении экспериментов использовали специальную конструкцию. Она представляла собой стеклянный цилиндр, сверху закрываемый ватным тампоном, и помещенную вертикально в его нижней части пластиковую непрозрачную пробирку объемом 15 мл с крышкой. В отверстие в крышке пробирки продевали корни проростков. Корни внутри пробирки на расстоянии 1.5 см от крышки погружали в водную среду без бактерий.

Средние размеры корней исходных проростков имели длину 30–35 мм, по окончании эксперимента — 46–58 мм. Для оценки взаимодействия растения с возникающими в водной среде ассоциациями бактерий прослеживали влияние последних на рост корней.

В водную среду для проростков вносили необходимые для роста микроэлементы из расчета 1 мл/л воды каждого раствора солей: ZnSO_4 (0.05 г/л), NaMoO_4 (1.76 г/л), CuSO_4 (0.05 г/л), MnCl_2 (0.35 г/л), H_3BO_3 (0.5 г/л). Одновременно с помещением корней проростков в водную среду в нее вносили бактерии *R. leguminosarum* bv. *viceae*, *P. syringae* pv. *pisii*, *A. chroococcum*, *R. erythropolis*. В среду с контрольными растениями инокулят не вносили. В начале и конце эксперимента (экспозиции) в водной среде, где росли корни проростков, подсчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ).

Поверхностное обеззараживание семян, используемых для исследования в них эндофитных бактерий и для получения проростков, проводили в 3 этапа. Вначале промывали их мыльным раствором, затем помещали на 10 мин в 95%-ный этанол, а после отмывания — на 30 мин в 3%-ный раствор пероксида водорода. После отмывки от раствора пероксида семена на 30 мин заливали нагретой до 60°C водой. Для получения проростков после остывания воды семена набухали в течение 6–7 ч. Набухание семян, рост проростков, процедуры, проводимые с проростками, происходили в строго соблюдаемых асептических условиях.

Наличие и состав эндофитных бактерий в семенах исследовали через 24 ч их набухания в стерильной воде. Семена, растирали до кашицы в керамической ступке, заливали небольшим объемом стерильной воды, перемешивали полученную массу и после 24-часового настаивания отбирали 1 мл жидкости для микробиологического анализа.

Культуры бактерий. Культуры бактерий выращивали на твердых агаризованных средах. Для бактерий *R. leguminosarum* bv. *viceae* и *P. syringae* pv. *pisii* среды готовили на гороховом отваре по прописи Берестецкого [19], для бактерий *A. chroococcum* использовали среду Эшби, для *R. erythropolis* — питательный агар на основе гидролизата говяжьего мяса (ГМФ-Агар, “Научно-исследовательский центр фармакотерапии ООО”, Россия).

Определение количества бактерий в водной среде роста корней. Титр бактерий, вносимых в водную среду, определяли по оптической плотности при 595 нм на фотометре для микропланшетов “iMark” (“Bio-Rad Microplate Manager”, США), и по количеству КОЕ. КОЕ в водной среде определяли в момент помещения на нее корней и через 24 ч. КОЕ подсчитывали, после разведения и высева разбавленных в 10^2 – 10^6 раз суспензий на твердые агаризованные среды. Суспензии с бактериями из водной среды с проростками контроля наносили на твердую среду, приготовленную на гороховом отваре в соответствии с прописью из работы [19]. Рост бактерий инокулятов оценивали по соотношению КОЕ в средах с растениями в начале и через 24 ч экспозиции, выраженному в процентах. Содержание (общее) эндофитных бактерий за 24 ч экспозиции в тех же средах оценивали по соотношению КОЕ для них и бактерий инокулятов, и выражали в %. Основой для дифференцированного подсчета КОЕ для этих двух групп бактерий были морфологические показатели для их колоний.

Исследование состава эндофитных бактерий. Состав эндофитных бактерий исследовали на основании морфологических признаков колоний на твердых средах в чашках Петри, которые засеивали водными суспензиями из сосудов с растениями, а также из водных вытяжек семян. Для микроскопических исследований окрашенных по Граму клеток использовали инвертированный микроскоп “Axio Observer” (“Carl Zeiss Microscopy”, Германия).

Изучение деструкции N-ФНА эндофитными бактериями. Суспензию клеток (смыв с твердого субстрата) переносили для адаптации в течение суток в конические колбы с жидкой минимальной средой, приготовленной, как описано в работе [20]. Суспензии с адаптированными бактериями переносили в ту же культуральную среду (объемом 250 мл) внесенную в коническую стеклянную колбу объемом 500 мл для инкубации в течение 1 сут с 10 мкМ N-ФНА (“Sigma”, США). При исследованиях деградации N-ФНА объем вносимых суспензий рассчитывали для получения конечного титра бактерий — 1.5×10^3 кл./мл. Титр суспензии рассчитывали, измеряя оптическую плотность на планшетном спектрофотометре “Immunochem-2100” при 675 нм (“High Technology Inc.”, США).

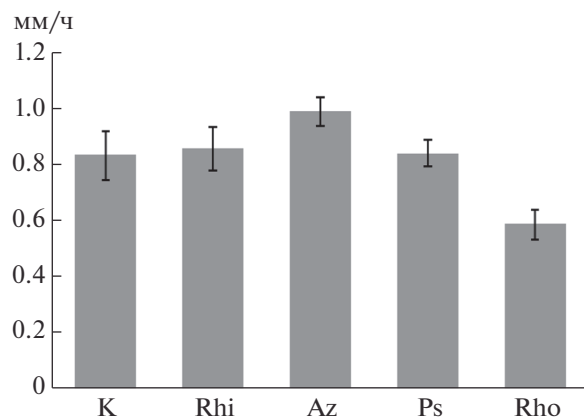


Рис. 1. Скорость роста корней проростков гороха (мм/ч) в течение 24 ч при инокуляции разными видами бактерий: K — контроль; бактерии инокулята водной среды: Rhi — *R. leguminosarum* bv. *viceae*, Az — *A. chroococcum*, Ps — *P. syringae* pv *pisi*, Rho — *R. erythropolis*.

Колбы с бактериями помещали на ротаторную качалку (60 об./мин) и выращивали при температуре 20–22°C. Выросшую культуру центрифугировали при 8000 g в течение 20 мин при 4°C. Из супернатанта после подкисления 2 н HCl до pH 3.0–4.0 этилацетатом экстрагировали ароматические соединения. Полученные экстракты упаривали досуха в вакууме в темноте, сухой остаток растворяли в небольших объемах очищенного от перекисей этилацетата и помещали в стеклянные бутылочки для газо-хромато-масс-спектрометрического (ГХ-МС) анализа.

Анализ состава ароматических продуктов деградации N-ФНА. Анализ состава этилацетатных экстрактов из культуральных сред проводили методом ГХ-МС на газожидкостном хроматографе с масс-

спектрометрическим детектором с использованием хромато-масс-спектрометра “7000QQTripleQuad/7890A MSD/DS” (“Agilent Technology”, США), как описано в работе [13]. Для идентификации анализируемых соединений использовали библиотеки масс-спектров NIST08 и WILEY7, а также проводили сравнение с аутентичными образцами N-ФНА (“Sigma”, США), бис (2-этил-гексил) фталата (синоним — диоктилфталат), диэтилфталата (“Sigma-Aldrich”, Германия) и дибутилфталата (“Реахим”, Россия).

Статистическая обработка. Для статистической обработки полученных результатов использовали пакет R 3.6.2. На рис. 1 и в табл. 2 и 3 приведены средние значения полученных показателей и стандартные отклонения для них, рассчитанные из трех независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Для выяснения роли эндофитных бактерий, появляющихся в прикорневой зоне корней проростков гороха в результате перемещения из корневых тканей во внешнюю среду, в биоконтроле ризосферного микробиома исследования проводили по двум направлениям. Первое из них связано с выявлением изменений в составе и концентрации бактерий в водной среде для роста корней проростков гороха (*Pisum sativum* L.) через 1 сут после внесения в нее разных видов ризосферных бактерий. Второе направление исследований связано с выяснением возможного вклада изучаемых эндофитных бактерий в метаболизм N-ФНА.

Приведенные в табл. 1 результаты свидетельствуют об обнаружении эндофитных бактерий гороха в семенах и появлении части этих бактерий в

Таблица 1. Культуры эндофитных бактерий, обнаруженные в семенах и водных средах корней проростков гороха

№ культуры	Семя	Водная среда для роста корней				
		без инокуляции (контроль)	инокулированные бактерии			
			<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	<i>Az. chroococcum</i>	<i>Rh. erythropolis</i>
1	+	+	+	—	—	+
2	+	+	+	+	+	—
3	+	+	+	+	+	—
4	+	+	+	—	+	+
5	+	+	+	—	—	—
6	+	+	+	—	+	—
7	+	—	—	—	—	—
8	+	—	—	—	—	—
9	+	—	—	—	—	—
10	+	—	—	—	—	—
11	+	—	—	—	—	—

Примечание: “+”, “—” — присутствие или отсутствие колоний бактерий, соответственно.

Таблица 2. Изменение количества бактерий инокулятов и их соотношения с количеством эндофитов в среде роста корней проростков гороха после 24 ч экспозиции

Бактерии инокулята	Изменение КОЕ бактерий инокулятов, % к исходному	Отношение: КОЕ эндофитные бактерии/КОЕ бактерий инокулята, %
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	312 ± 36	129 ± 25
<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	195 ± 27	35 ± 1
<i>A. chroococcum</i>	489 ± 57	49 ± 8
<i>R. erythropolis</i>	242 ± 1	11 ± 1

ризосфере корней проростков. Результаты в табл. 1 показали, что максимально 6 из 11 выделенных из семян культур бактерий обнаруживались в водной среде, где происходил рост корней проростков гороха. Верхняя часть проростков (семя + эпикотиль и часть прилегающего к ним корня длиной 1.5 см) не касались поверхности водной среды (см. Методику), куда была погружена большая часть корня. Наиболее вероятно, что обнаруженные в водной среде бактерии перемещались в среду из семени через ткани корня.

Все эти бактерии были грамположительными. Из них 4 культуры (№ 2, 7, 8, 11, табл. 1) палочковидной формы, спорообразующие, относились к роду *Bacillus*. В культурах 1, 3, 4, 5, 10 (табл. 1) представлены бактерии, имеющие форму кокков, а культуры 6, 10 не образующие споры палочки.

В настоящее время не ясно, почему только 6 из 11 обнаруженных нами в семенах эндофитных бактерий оказались способными транспортироваться из корней в водную среду. Возможно, ответом станут данные по определению у них активности гидролитических ферментов, которые, скорее всего, и обуславливают их продвижение через ткани корней.

Обнаружение бактерий в прикорневой зоне проростков гороха послужило основанием для изучения их взаимодействия с ризосферными бактериями. Такие взаимодействия неизбежно должны происходить с нодулирующими корнями гороха бактериями *R. leguminosarum*. Вероятны они и с бактериями, являющимися патогенами для названного растения, к которым, в частности, относятся *P. syringae* pv. *pisi*, использованные в экспериментах. Без сомнения, те же эндофитные бактерии в ризосфере будут иметь влияние на свободноживущие почвенные бактерии. Такое влияние было подтверждено результатами работы, в которой в качестве инокулятов для корней проростков использовали представителей свободноживущих бактерий *A. chroococcum* и *R. erythropolis*. *A. chroococcum* — азотфиксирующие бактерии, могли оказывать положительное влияние на рост растений гороха [21]. *R. erythropolis*, был выделен из ризосферы растений *Elytrigia repens*, росших на загрязненных нефтепродуктами почвах. Штамм способен активно деградировать полициклические ароматические со-

единения и положительно влиял на рост растений в условиях загрязнения почв нефтепродуктами [22, 23].

Соотношения концентраций эндофитных бактерий и бактерий, использованных в качестве инокулятов, определенные в водной среде по величине КОЕ через 1 сут экспозиции может служить показателем межмикробных взаимодействий в прикорневой зоне проростков гороха. Вторым показателем взаимодействий является количество вариантов эндофитных бактерий, появившихся на твердой среде совместно с бактериями инокулятов.

Титр бактерий инокулятов, вносимых в среду для корней проростков гороха, рассчитывали по показателям оптической плотности и затем корректировали по КОЕ после посева суспензии на твердые среды в чашках Петри. В начале экспериментов показатели КОЕ варьировали в пределах $0.1\text{--}0.3 \times 10^7$ кл./мл — для ризобий, и $1.4\text{--}1.9 \times 10^7$ кл./мл — для псевдомонад, азотобактеров и родококков. Бактерии в среде роста корней неинокулированных проростков (контроль) в начале экспозиции отсутствовали, а через 24 ч их роста суммарный показатель КОЕ для всех обнаруженных нами в этой среде эндофитных бактерий составлял $2.29 \pm 0.03 \times 10^7$ кл./мл.

Компоненты корневых экссудатов, по-видимому, способствовали росту бактерий, внесенных в водную среду в качестве инокулята, но в разной степени для различных исследуемых видов. Из результатов табл. 2 следует, что максимальный прирост КОЕ наблюдали у *A. chroococcum*. За ним в порядке убывания могут быть размещены ризобии, родококки и псевдомонады.

О различном характере взаимодействий бактерий, внесенных в водную среду роста корней в виде инокулята, с бактериями, поступившими в эту среду из корней можно судить по результатам, приведенным в табл. 2. Так, в водной среде с ризобиями доля эндофитных бактерий выше, чем ризобий (табл. 2). При этом состав колоний эндофитных бактерий по морфолого-культуральным показателям был аналогичен их составу в среде контроля (табл. 1). Возможно, имеет место совместимость исторически сформировавшихся бактериальных ассоциаций, которые благоприятны

для сосуществования каждого из представителей не только в тканях растения, но и в ризосфере растения-хозяина.

В среде с азотобактером обнаружено всего четыре варианта эндофитных бактерий (табл. 1). Это может быть связано со слабым ростом некоторых эндофитов на среде Эшби. В процессе работы выяснилось, что очень слабый рост на среде Эшби имели 2 из 6 культур (культуры бактерий № 1 и 5, табл. 1) эндофитных бактерий, выделенных из водных сред. По результатам, представленным в табл. 2, количество эндофитных бактерий в среде роста корней составляло около 50% от количества клеток *A. chroococcum*. Это достаточно хороший показатель совместного роста бактерий азотобактера и эндофитных бактерий. К такому заключению можно прийти, учитывая, что доминирующие в ростовой среде бактерии *A. chroococcum* отличались от трех других видов инокулированных бактерий наиболее высоким приростом (табл. 2).

Твердые среды на основе горохового отвара и ГМФ-агара, использованные, соответственно, для анализа состава бактерий в водных средах с псевдомонадами и родококками (см. Методику), вполне подходили и для роста на них колоний всех выделенных изолятов эндофитных бактерий. Поэтому наблюдаемое в табл. 1 отсутствие четырех форм эндофитных бактерий в водных средах с *P. syringae* pv. *pisi* и *R. erythropolis*, наиболее вероятно объясняется антибактериальным действием этих двух видов бактерий. Кроме того, можно утверждать, что псевдомонады и родококки сосуществовали с двумя, но не одинаковыми представителями эндофитных бактерий семян гороха. Можно предположить избирательное подавление псевдомонадами и родококками эндофитных бактерий. Подтверждают отмеченное выше действие псевдомонад и родококков в отношении эндофитных бактерий растений гороха представленные в табл. 2 показатели относительного содержания последних в средах роста корней. Они более низкие, чем в средах с ризобиями и азотобактером. При этом самое низкое содержание эндофитных бактерий в среде с родококками.

Для оценки взаимодействия растения с формирующимися в водной среде ассоциациями бактерий прослеживали их влияние на линейный рост корней проростков гороха. Оказалось, что инокуляция бактериями *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *P. syringae* pv. *pisi* не приводила к изменениям скорости их роста (рис. 1). Бактерии *A. chroococcum* усиливали, а бактерии *R. erythropolis*, напротив, заметно снижали рост корней. Примечательно, что два последних вида характеризовались высокой гормонсинтезирующей активностью [23, 24]. Именно этим свойством *A. chroococcum* объяснялось ускорение роста инокулированных этими бак-

териями корней проростков гороха в работе [21]. Однако причина ингибирующего влияния бактерий *R. leguminosarum erythropolis*, также активно синтезирующих ростстимулирующие фитогормоны, на рост корней тех же растений пока не ясна. Возможно, в клетках этого вида бактерий образуются соединения неизвестной природы негативно действующие на эндофитные бактерии растений гороха и на рост его корней.

В работах [12, 25] было показано, что в корнях бобовых культур и их корневых экссудатов обнаружены вещества N-ФНА и фталаты. Названные соединения оказывали ростподавляющее действие на бактерии *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *P. syringae* pv. *pisi*, *Clavibacter michiganensis* sps. *sepedonicus* [12, 13]. Было установлено, что перечисленные виды бактерий способны образовывать фталаты при деградации N-ФНА [13]. То есть ряд видов бактерий, отнесенные к разным родам, способны деградировать полициклические ароматические соединения (ПАУ) по пути с образованием о-фталевой кислоты и затем фталатов. Обнаружена аналогичная способность к деструкции N-ФНА и у штамма *A. chroococcum* (данные не опубликованы), использованного в работе. У *R. erythropolis* способность к деградации N-ФНА не была исследована, однако ранее у этого вида установили высокую активность при деградации ПАУ нефти с образованием протокатеховой кислоты [22].

Обнаружение в среде роста корней проростков гороха эндофитных бактерий позволило предположить, что в их взаимоотношениях с ризосферными бактериями также могут быть задействованы N-ФНА и фталаты. В составе этих соединений, являющихся компонентами корневых экссудатов растений гороха [12, 25], возможны количественные и качественные (в составе фталатов) изменения при участии ризосферных бактерий, способных деградировать N-ФНА и преобразовывать одни виды фталатов в другие [14]. Правомерным является выяснение роли эндофитных бактерий в возникновении изменений в количестве N-ФНА и в составе фталатов.

Результаты, представленные в табл. 3, показали, что все 6 бактериальных культур, которые были выявлены в зоне роста корней проростков гороха, способны деградировать N-ФНА с образованием фталатов. Наиболее высокая деградирующая активность у культур № 3 и № 6, самая низкая — у культуры № 5. У исследуемых культур при деградации N-ФНА в культуральных средах, где они инкубировались в присутствии вышеназванного субстрата, оказалось различным соотношение видов фталатов (табл. 3). Диоктилфталат, характеризующийся сильным антибактериальным действием [13, 14], среди продуктов деградации N-ФНА преобладал в среде, куда вносили бактерии культуры № 3 и составлял большой процент

Таблица 3. Состав фталатов, образовавшихся при деградации N-фенил-2-нафтиламина культурами эндофитных бактерий, показатели времени удерживания ($t_{уд}$) и степени вероятности (Ver, %)

Соединение	$t_{уд}$, мин	Ver, %	Относительная площадь пика, %					
			№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
Диэтилфталат	14.2	80.0	0.9 ± 0.1	—	—	—	—	—
Бутил-тетрадецил фталат	19.7	16.6	1.9 ± 0.4	—	—	1.5 ± 0.3	0.8 ± 0.2	3.3 ± 0.9
Дибутилфталат	21.6	34.8	75.7 ± 6.4	66.5 ± 4.2	54.0 ± 5.3	40.2 ± 3.1	20.2 ± 1.8	100
Диоктилфта-лат	31.5	70.7	67.1 ± 7.1	12.9 ± 2.2	100	31.3 ± 3.6	3.3 ± 0.9	79.7 ± 8.0
N-фенил-2-нафтиламин	26.2	46.6	100	100	18.7 ± 1.7	100	100	30.2 ± 3.5

Примечание: № 1–6 — номера культур эндофитных бактерий.

в среде с бактериями культур № 1 и № 6. Дибутилфталат доминировал среди продуктов деградации N-ФНА в средах с бактериями большинства культур (исключая культуру № 6). Наиболее активно образовывали дибутилфталат бактерии культуры № 6. Данное соединение не всегда вызывает негативное действие на бактерии. Исследованиями авторов работы [14] обнаружено ингибирование этим соединением образования бактериальных биопленок. Подавление роста бактерий в планктонной культуре он вызывал только при высоких концентрациях, а при более низких стимулировал этот процесс. Таким образом, показано, что обнаруженные в ризосфере проростков гороха эндофитные бактерии способны образовывать фталаты при деградации N-ФНА.

Итак, приведенные в настоящей работе результаты показывают, что в ризосфере растений гороха наблюдался различный характер взаимодействия между эндофитными бактериями и свободноживущими ризосферными бактериями, характеризующимися разными типами отношений с растениями гороха. Благоприятным оказалось сосуществование этих бактерий с ризобиями, нодулирующими корни гороха. *P. syringae* pv. *pisi*, патоген для растений гороха, поражающий органы надземной части данного растения, по сравнению с тремя другими исследуемыми нами видами бактерий, показал наименее интенсивный рост в среде роста корней (табл. 3) и обнаружил способность подавлять эндофитные бактерии растения-хозяина (табл. 1, 3). Бактерии *A. chroococcum* и *R. erythropolis*, использованные в эксперименте, существенно различались по активности роста в среде обитания корней и по характеру влияния на эндофиты гороха. Влияние корневых экссудатов гороха, очевидно, способствовало хорошей адаптации бактерии *A. chroococcum*, которые при этом не вызвали значительных изменений в составе и концентрации эндофитных бактерий. Этот вид бактерий положительно влиял на рост корней проростков гороха. В противоположность азотобактерам, родококки показали в водной среде невысокий прирост и наибольшую для четырех об-

суждаемых видов бактерий антибактериальную активность, а также ингибирующее действие на рост корней гороха.

Обнаруженное у эндофитных бактерий, перемещающихся из тканей корней растения гороха во внешнюю среду, свойство деградировать N-ФНА, одного из негативных аллелопатических компонентов корневых экссудатов, позволяет предположить важную роль образующихся при этом фталатов в их взаимоотношениях как с бактериями, проникающими в ткани данного растения, так и со свободноживущими ризосферными бактериями.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования (ЦКП) “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск, Россия).

Работа выполнена в рамках проекта под № гос.регистрации АААА-А17-117011810099-8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muresu R., Polone E., Sulas L., Baldan B., Tondello A., Delogu G. et al. // FEMS Microbiol Ecol. 2008. V. 63. P. 383–400.
2. Гарипова С.Р. // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132. № 5. С. 493–505.
3. Чеботарь В.К., Мальфанова Н.В., Щербаков А.В., Ахтемова Г.А., Борисов А.Ю., Люгтенберг Б., Тухонович И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 3. С. 283–289.
4. Martinez-Hidalgo P., Hirsh A.M. // Phytobioms. 2017. V. 1. № 2. P. 70–82.
5. Гарипова С.Р., Гарифуллина Д.В., Баймиев А.Х., Хайруллин Р.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 3. С. 299–307.
6. Иванчина Н.В., Гарипова С.Р., Хайруллин Р.М. // Агрохимия. 2018. № 4. С. 39–44.
7. Benito P., Alonso-Vega P., Aguado C., Luján R., Anzai Y., Hirsch A.M., Trujillo M.E. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 11051 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11428-1>
8. Dudeja S.S., Giri R., Saini R., Suneja-Madan P., Kothe E. // J. Basic Microbiol. 2012. V. 52. № 3. P. 248–260.

9. Кузнецова И.Г., Сазанова А.Л., Сафронова В.И., Пинаев А.Г., Верхозина А.В., Тихомирова Н.Ю., Оследкин Ю.С., Белимов А.А. // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50. № 3. С. 345–352.
10. Щербakov А.В., Заплаткин А.Н., Чеботарь В.К. // Достижения науки и техники АПК. 2013. № 7. С. 35–38.
11. Smerda J., Sedlacek I., Pacova Z., Durnova E., Smiskova A., Havel L. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005. V. 55. № 6. P. 2351–2354.
12. Макарова Л.Е., Петрова И.Г., Соколова Н.А., Мориц А.С. // Агрохимия. 2020. № 3. С. 62–69.
13. Макарова Л.Е., Мориц А.С., Соколова Н.А., Петрова И.Г., Семенов А.А., Дударева Л.В., Третьякова М.С., Сидоров А.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 2. С. 165–173.
14. Шафикова Т.Н., Омеличкина Ю.В., Еникеев А.Г., Бояркина С.В., Гвильдис Д.Э., Семенов А.А. // Докл. Академии наук. 2018. Т. 480. № 3. С. 381–383.
15. Liang D.-W., Zhang T., Fang H.H.P., He J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 80. № 2. P. 183–198.
16. Seo J.S., Keum Y.-S., Li Q.X. // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2009. V. 6. P. 278–309.
17. Eaton R.W., Ribbons D.W. // J. Bacteriol. 1982. V. 151. № 1. P. 48–57.
18. Chang H.K., Zylstra G.J. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 24. P. 6529–6537.
19. Берестецкий В.А. Методические рекомендации по получению новых штаммов *Rhizobium leguminosarum* и оценки их эффективности. Л.: ВНИИСХМ, 1976. 31 с.
20. Hartwig U.A., Josef C.M., Phillips D.A. // Plant Physiol. 1991. V. 95. № 3. P. 797–803.
21. Акимов Г.П., Верхотуров В.В., Соколова М.Г., Белолухов С.Л. // Известия ТСХА. 2019. № 1. С. 138–145.
22. Беловежец Л.А., Макарова Л.Е., Третьякова М.С., Маркова Ю.А., Дударева Л.В., Семенова Н.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 1. С. 76–81.
23. Третьякова М.С., Беловежец Л.А., Маркова Ю.А., Макарова Л.Е. // Агрохимия. 2017. № 12. С. 46–51.
24. Патент РФ. 2004. № 2231546.
25. Макарова Л.Е., Смирнов В.И., Клыба Л.В., Петрова И.Г., Дударева Л.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 4. С. 394–402.

Study of the Interaction of Rhizosphere Bacteria with Non-Rhizobial Endophytic Bacteria of Pea Plants (*Pisum sativum* L.), Moving from Their Roots to the Root Zone

L. E. Makarova^{a,*}, Yu. A. Markova^a, A. S. Morits^a, M. S. Karepova^a,
A. V. Sidorov^a, and N. A. Sokolova^a

^aSiberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

*e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

It was shown that out of 11 strains of endophytic bacteria found in the seeds of pea plants (*Pisum sativum* L.), only 6 found themselves in the aquatic growth medium of the roots of their seedlings grown under hydroculture conditions. Different effects of inoculum bacteria (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Azotobacter chroococcum*, and *Rhodococcus erythropolis*) on the composition and concentration of endophytic bacteria in the root zone of pea seedlings were found. All 6 cultures of endophytic bacteria found in the root growth zone showed a different ability to degrade N-phenyl-2-naphthylamine (N-PNA) to the formation of phthalates. The unequal nature of catabolism by these bacteria of this negative allelopathic component of root exudates of leguminous crops was shown by the percentage of the indicated substrate that was not destroyed in their growth medium and the ratio of phthalates formed during its degradation. These indicators can determine the degree of participation of the identified endophytic bacteria in controlling the relationship of pea plants with bacteria of various strategies of interaction.

Keywords: *Pisum sativum* L., rhizosphere, intermicrobial interactions, endophytic bacteria, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Rhodococcus*, N-phenyl-2-naphthylamine, phthalates