



**Издатель**

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет»  
Российская Федерация, г.Петрозаводск, пр.Ленина,33

Научный электронный журнал

**ПРИНЦИПЫ ЭКОЛОГИИ**

<http://ecopri.ru>

**Т. 8. № 2 (32). Июнь, 2019**

**Главный редактор**

А. В. Коросов

**Редакционный совет**

В. Н. Большаков  
А. В. Воронин  
Э. В. Ивантер  
Н. Н. Немова  
Г. С. Розенберг  
А. Ф. Титов

**Редакционная коллегия**

Г. С. Антипина  
В. В. Вапиров  
А. Е. Веселов  
Т. О. Волкова  
Е. П. Иешко  
В. А. Илюха  
Н. М. Калинкина  
А. М. Макаров  
А. Ю. Мейгал  
В. К. Шитиков  
В. Н. Якимов  
A. Gugotek B.  
J. B. Jakovlev  
R. Krasnov  
J. P. Kurhinen

**Службы поддержки**

А. Г. Марахтанов  
Е. В. Голубев  
С. Л. Смирнова  
Н. Д. Чернышева  
М. Л. Киреева

**ISSN 2304-6465**

**Адрес редакции**

185910, Республика Карелия, г.Петрозаводск, пр. Ленина, 33. Каб. 453

E-mail: [ecopri@psu.karelia.ru](mailto:ecopri@psu.karelia.ru)

<http://ecopri.ru>





УДК 581.1.

# ВСХОЖЕСТЬ СЕМЯН И СОСТОЯНИЕ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА НИХ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM*

ЕРОФЕЕВА

Елена Александровна

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, 603950 Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, ННГУ, корп. 1, кафедра экологии, [ele77785674@yandex.ru](mailto:ele77785674@yandex.ru)

РЕЧКИН

Александр Иванович

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, 603950 Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, ННГУ, корп. 1, кафедра экологии, [re-ka@mail](mailto:re-ka@mail)

САВИНОВ

Александр Борисович

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, 603950 Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, ННГУ, корп. 1, кафедра экологии, [sabcor@mail.ru](mailto:sabcor@mail.ru)

## Ключевые слова:

*Azotobacter*  
*Triticum aestivum*  
пигмент  
липопероксидация  
рост  
всхожесть семян

**Аннотация:** В настоящее время способность различных штаммов *Azotobacter* вступать в симбиоз с пшеницей мягкой и влиять на развитие этого вида изучена недостаточно. В связи с этим нами была оценена способность штамма № 4 *A. chroococcum*, выделенного из почвы сельскохозяйственных угодий Нижегородской области (Россия), влиять на всхожесть семян и состояние проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при внесении в первый день эксперимента в питательный раствор различных количеств клеток (от 109 кл/мл (А) до А/256). Все концентрации клеток, кроме наименьшей, вызывали снижение всхожести семян. Низкие концентрации (А/256-А/64) не влияли на биомассу корня проростков, средние концентрации (А/32-А/16) ее увеличивали. При высокой концентрации (А/8) эффект исчезал, а наиболее высокие (А/4-А) вновь повышали этот показатель. В отношении биомассы побега стимулирующий эффект оказывали только концентрации А/2 и А/4. Содержание хлорофиллов и каротиноидов, а также интенсивность липопероксидации при действии *A. chroococcum* не изменялись. Таким образом, изученный штамм способен регулировать прорастание семян и рост корневой системы и побега *T. aestivum*.

© Петрозаводский государственный университет

Получена: 07 ноября 2018 года

Подписана к печати: 17 июня 2019 года

## Введение

Бактерии рода *Azotobacter* относятся к свободноживущим азотфиксаторам почвы (ризобактериям) и способны, как и клубеньковые бактерии растений (ризобии), с помощью нитрогеназного комплекса фиксировать молекулярный азот воздуха, превращая его в ион аммония (Howard, Rees, 2006; Wani et al., 2013; Феоктистова и др., 2016). Бактерии рода *Azotobacter* населяют эктoризосферу (зона почвы с наружной стороны корня) и ризоплану (поверхность корневой системы) различных видов небобовых растений, используя экссудаты корневой системы для питания. В обмен растение получает азот в виде доступных для усвоения соединений, улучшается фосфорное питание растений благодаря растворению труднодоступных почвенных фосфатов в процессе жизнедеятельности ризобактерий, фитогормоны, вырабатываемые ризобактериями, стимулируют рост растений, бактерии рода *Azotobacter* подавляют развитие фитопатогенных грибов и бактерий (Феоктистова и др., 2016). Способность разных штаммов *Azotobacter chroococcum* Beijer. влиять на прорастание семян и развитие проростков различных видов растений изучена недостаточно (Кириченко и др., 2010). Хотя в настоящее время этому вопросу уделяется значительное внимание в связи с поиском эффективных штаммов этого вида с целью использования их для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур (Кириченко, Коць, 2011). Имеются сведения о том, что некоторые штаммы *A. chroococcum* способны вступать в симбиотические отношения с пшеницей мягкой (*Triticum aestivum* L.) (Кириченко, 2016). Однако подобные данные для штаммов *A. chroococcum* почв Нижегородской области являются фрагментарными, в том числе и для выделенного нами из почвы сельскохозяйственных угодий Нижегородского региона штамма № 4. Известно, что бактерии рода *Azotobacter* образуют ассоциации с пектинолитическими и целлюлозоразрушающими бактериями рода *Bacillus*, потребляя продукты разложения полимеров бациллами, снабжая их фиксированным азотом, что приводит к ускорению усвоения полимеров и стимуляции азотфиксации (Феоктистова и др., 2016). В связи с этим при изучении способности *A. chroococcum* непосредственно воздействовать на состояние растений более объективные данные можно получить в условиях эксперимента при

культивировании растений на питательном растворе, поскольку таким образом можно вычленить взаимодействие в системе «растение – *A. chroococcum*» в чистом виде, т. е. без участия других видов почвенных бактерий.

В связи с этим нами впервые была оценена способность штамма № 4 *A. chroococcum*, выделенного из почвы сельскохозяйственных угодий Нижегородской области (Россия), влиять на всхожесть семян и состояние проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при внесении в первый день эксперимента в питательный раствор различных количеств клеток в широком диапазоне значений (от  $10^9$  кл/мл (А) до А/256).

## Материалы

Штамм № 4 *A. chroococcum* был выделен из почвы пахотных земель возле с. Оранки Богородского района Нижегородской области. *A. chroococcum* культивировали на жидкой питательной среде Эшби. В эксперименте использовали семена озимой пшеницы Московская 39.

## Методы

Для исследования были выбраны 9 концентраций бактериальных клеток от  $10^9$  кл/мл (А) до значений, на несколько порядков меньших (А/256) (соседние концентрации различались в 2 раза), поскольку наибольшие исследованные нами концентрации клеток *A. chroococcum* используют для инокуляции семян пшеницы другими штаммами этого вида (Кириченко, 2016). Растения выращивали в течение 8 дней на питательном растворе Кнопа с разным содержанием клеток *A. chroococcum* (опытные группы) или растворе Кнопа (контрольная группа). В чашки опытных групп раствор Кнопа с добавлением *A. chroococcum* вносили только в первый день эксперимента. Далее каждый день добавляли раствор Кнопа во все чашки (контрольные и опытные) без клеток азотфиксатора. Семена пшеницы, раствор Кнопа и чашки Петри не стерилизовали, для того чтобы определить, оказывает ли данный штамм влияние на изучаемые показатели пшеницы в нестерильных условиях, т. к. на практике обработка семян сельскохозяйственных культур различными штаммами *A. chroococcum* проводится перед посевом в почву, что исключает условия стерильности. В каждой группе растения выращивали в 5 чашках Петри (50 семян в каждой чашке) на подложке из фильтровальной бумаги,

смоченной раствором, при 17 ч световом периоде и температуре 17–22 °С.

У семидневных проростков в первом листе определяли интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), уровень хлорофиллов и каротиноидов, а также сырую биомассу корневой системы и побега, всхожесть семян. При изучении биохимических показателей в каждой группе было 10 биологических повторностей (1 биологическая повторность – объединенные фрагменты первого листа 5–6 разных растений данной группы; брали по 2 биологические повторности из каждой чашки). Биомассу корневой системы и побега определяли у 30 растений каждой группы (брали по 6 растений из каждой чашки; 6 растений × 5 чашек = 30). Интенсивность ПОЛ оценивали по содержанию ТБК-активных продуктов липопероксидации, среди которых наиболее массовым является малоновый диальдегид (МДА) (Камышников, 2002). Содержание хлорофиллов и каротиноидов в листе определяли согласно общепринятой методике, для экстрагирования пигментов использовали 80 % ацетон (Шлык, 1971).

Соответствие распределения в выборках изученных количественных признаков нормальному определяли с помощью критерия Шапиро – Уилка (программа Statistica 10). Поскольку в некоторых выборках распределение отличалось от нормального ( $p < 0.05$ ), то для проверки нулевой гипотезы были использованы непараметрические критерии Крускала – Уоллиса и Ньюмена – Кейлса (программа Биостатистика 4.03). Аналогичную процедуру для качественного признака (всхожесть семян) проводили с помощью критерия хи-квадрат (Биостатистика 4.03) с учетом поправки Бонферрони для множественных парных сравнений. На графиках представлены выборочные медианы и их ошибки (количественные признаки), а также доли и их ошибки (всхожесть семян).

## Результаты

Все концентрации изученного штамма *A. chroococcum*, за исключением наименьшей, приводили к снижению всхожести семян *T. aestivum* на 14–30 % по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ) (рис. 1).

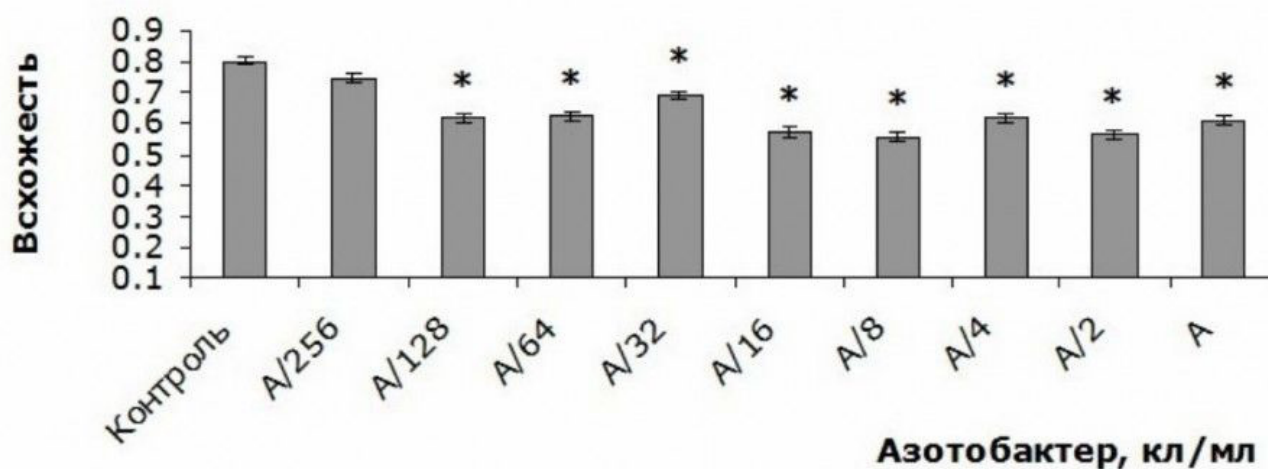


Рис. 1. Всхожесть семян *T. aestivum* при внесении различных количеств клеток *A. chroococcum* в питательный раствор в первый день эксперимента (доля ± ошибка доли): \* – статистически значимые различия по сравнению с данным показателем в контрольной группе при  $p < 0.05$ ; А –  $10^9$  кл/мл

Fig. 1. *T. aestivum* seed germination when adding different amounts of *A. chroococcum* cells to nutrient solution in the first day of the experiment (share ± share error): \* – indicates statistically significant differences compared to this indicator in the control group at  $p < 0.05$ ; A –  $10^9$  c/ml

При этом статистически значимые различия между эффектами разных концентраций не были выявлены ( $p > 0.05$ ).

Низкие концентрации *A. chroococcum* (A/256–A/64) не влияли на массу корневой системы (рис. 2а). Концентрации A/16–A/32 увеличивали данный показатель на 34–38

% относительно контрольного уровня. Однако дальнейшее повышение концентрации до A/8 приводило к исчезновению эффекта. Наиболее высокие концентрации *A. chroococcum* A/4–A вновь увеличивали массу корня проростков *T. aestivum* (на 50–68 % относительно контроля) (см. рис. 2а).

Динамика изменения биомассы побега *T. aestivum* при уменьшении концентрации *A. chroococcum* была очень сходна с изменением данного показателя у корневой системы, о чем свидетельствует сильная положительная корреляция между этими параметрами (по Спирмену:  $r = 0.86$ ;  $p < 0.05$ ). Однако стимулирующий эффект был менее выражен, поэтому его удалось зафиксировать только для концентраций А/2 и А/4. Они приводили к увеличению биомассы побега на 21 и 30 % по сравнению с контролем соответственно. Более низкие концентрации и наиболее высокая из изученных концентраций не влияли на данный показатель (рис. 2б).

Интенсивность перекисного окисления липидов в листе проростков пшеницы при действии всех изученных концентраций *A. chroococcum* не отличалась от контрольного уровня ( $p > 0.05$ ) (данные на рисунках не представлены). Содержание хлорофиллов и каротиноидов у растений всех опытных групп соответствовало контрольному уровню ( $p > 0.05$ ) (данные на рисунках не представлены).

## Обсуждение

Ранее другими авторами показано, что бактерии рода *Azotobacter* способны стимулировать рост корневой системы и побега растений (Феоктистова и др., 2016). Полагают, что ризобактерии, в том числе рода *Azotobacter*, оказывают такой эффект путем синтеза фитогормонов, стимулирующих рост (ауксинов, цитокининов, гиббереллинов) и улучшения азотного и фосфорного питания растений (Феоктистова и др., 2016). Возможно, данный механизм лежит и в основе обнаруженного нами стимулирующего эффекта бактерий в отношении роста пшеницы.

Известно, что в сухом семени в большом количестве находится фитогормон индолил-3-уксусная кислота, которая в высокой концентрации вместе с абсцизовой кислотой семян ингибирует прорастание (Нефедьев и др., 2013). Бактерии рода *Azotobacter* способны синтезировать ауксины, в том числе индолил-3-уксусную кислоту (Феоктистова и др., 2016). Скорее всего, выявленный нами ингибирующий эффект азотфиксирующих бактерий в отношении прорастания семян пшеницы обусловлен действием вырабатываемых ими ауксинов.

Следует отметить, что изменение биомассы побега и корневой системы, выявленное нами у проростков *T. aestivum* при внесении

в питательный раствор различных концентраций клеток *A. chroococcum*, было немонотонным, поскольку наибольшая из исследованных концентраций не влияла на биомассу побега, затем данный эффект появлялся у концентраций А/2-А/4 и исчезал у более низких количеств бактериальных клеток. Биомасса корневой системы также претерпевала немонотонное изменение при снижении концентрации клеток *A. chroococcum*: концентрации А-А/4 увеличивали биомассу, А/8 не влияла, А/16-А/32 увеличивали, А/64-А/256 не влияли (см. рис. 2).

В последние годы широкое распространение получили взгляды о том, что у биосистем широко представлены немонотонные ответы при действии разных факторов среды (Calabrese, Blain, 2005). Так, например, ранее нами установлено, что различные химические загрязнители могут достаточно часто приводить к немонотонным изменениям морфологических и физиолого-биохимических показателей у разных видов растений (Ерофеева, 2014). Подобные данные имеются и для фитогормонов растений, в том числе ауксинов. Показано, что они могут вызывать разнонаправленный эффект либо не оказывать его, в результате чего зависимость «доза – эффект» является немонотонной (Weyers, Paterson, 2001; Calabrese, Blain, 2005).

Известно, что любые стрессовые факторы среды вызывают увеличение продукции активных форм кислорода, что приводит к усилению процесса перекисного окисления в мембранах клеток (Камышников, 2002). На основании наших данных можно сделать вывод, что использованные концентрации *A. chroococcum* не вызывали стрессового состояния у проростков пшеницы.

## Заключение

На основе вышесказанного можно заключить, что изученный штамм *A. chroococcum* способен непосредственно влиять на всхожесть семян и состояние проростков *T. aestivum*. Однако его способность изменять изученные показатели *T. aestivum* зависит от количества клеток азотфиксатора, внесенных в питательный раствор, а также от вида показателя. Так, *A. chroococcum* во всех изученных концентрациях не влиял на биохимические параметры (интенсивность перекисного окисления липидов и содержание хлорофиллов и каротиноидов в листе), снижал всхожесть семян и приводил к увеличению биомассы

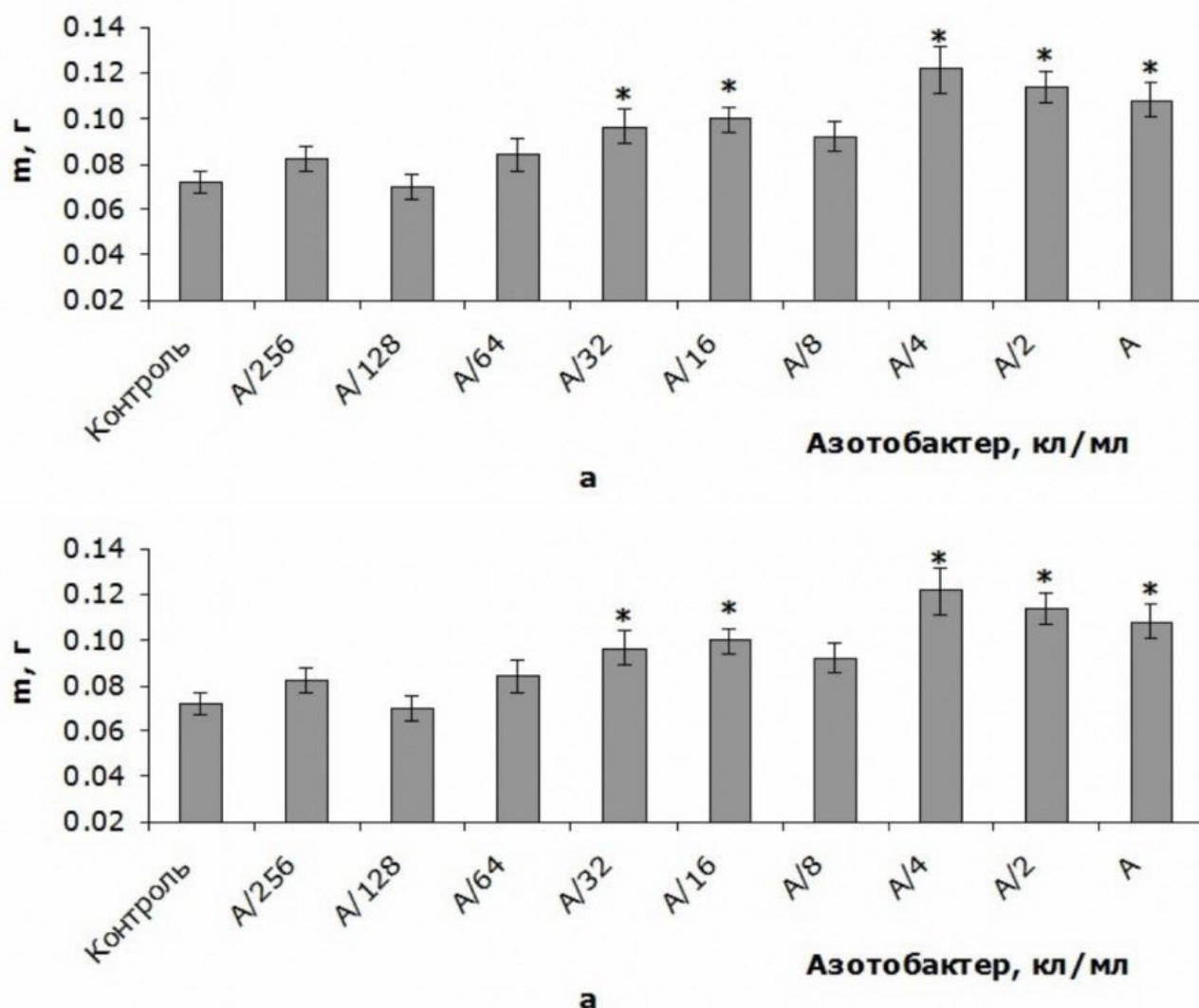


Рис. 2. Сырая биомасса корневой системы (а) и побега (б) *T. aestivum* при внесении различных количеств клеток *A. chroococcum* в питательный раствор в первый день эксперимента ( $Me \pm SMe$ ): \* – статистически значимые различия по сравнению с данным показателем в контрольной группе при  $p < 0.05$ ; А – 109 кл/мл

Fig. 2. Raw biomass of root system (a) and shoot (b) of *T. aestivum* with adding of different amounts of *A. chroococcum* cells to nutrient solution in the first day of the experiment ( $Me \pm SMe$ ): \* – indicates statistically significant differences compared to this indicator in the control group at  $p < 0.05$ ; A – 109 c/ml

проростков. При этом изменение концентрации клеток *A. chroococcum*, вносимых в питательный раствор, вызывало немонотонный ответ для сырой биомассы побега и корневой системы *T. aestivum*. По-видимому, эффекты в отношении всхожести и биомассы преимущественно связаны с воздействием ауксинов, синтезируемых азотфиксатором, поскольку данные фитогормоны способны

стимулировать рост и тормозить процесс прорастания. Кроме того, известно, что зависимость «доза – эффект» для ауксинов может быть немонотонной. Результаты исследования могут послужить основой для развития представлений о специфике биотических отношений между изученными видами, а также совершенствования методов предпосевной обработки семян *T. aestivum*.

## Библиография

- Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике . Минск: Беларусь, 2002. Т. 2. 495 с.
- Кириченко Е. В. Биологическая активность ризосферной почвы пшеницы яровой в ассоциации с бактериями *Azotobacter chroococcum* T79, модифицированными N-ацетил-D-глюкозамином // Мікробіологія і біотехнологія. 2016. № 3. С. 30–42.
- Кириченко Е. В., Коць С. Я. Использование *Azotobacter chroococcum* для создания комплексных биологических препаратов // Биотехнологія. 2011. Т. 4. № 3. С. 74–81.
- Кириченко Е., Титова Л., Коць С. Эффективность бактеризации семян пшеницы яровой новым штаммом *Azotobacter chroococcum*T76 // **Stiinta Agricola**. 2010. **№ 1**. С. 21–24.
- Нефедьева Е. Э., Белопухов С. Л., Верхотуров В. В., Лысак В. И. Роль фитогормонов в регуляции прорастания семян // Известия вузов. Прикладная биохимия и биотехнология. 2013. № 1. С. 61–65.
- Феоктистова Н. В., Марданова А. М., Хадиева Г. Ф., Шарипова М. Р. Ризосферные бактерии // Ученые записки Казанского университета. Сер. Естественные науки. 2016. Т. 158. Кн. 2. С. 207–224.
- Шлык А. А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 154–170.
- Calabrese E. J., Blain R. B. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview // Toxicology and Applied Pharmacology. 2005. Vol. 202. P. 1451–1474.
- Erofeeva E. A. Hormesis and paradoxical effects of wheat seedling (*Triticum aestivum* L.) parameters upon exposure to different pollutants in a wide range of doses // Dose Response. 2014. Vol. 12. No 1. P. 121–135.
- Howard J. B., Rees D. C. **How many metals does it take to fix N<sub>2</sub>? A mechanistic overview of biological nitrogen fixation** // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006. Vol. 103. No 46. P. 17088–17093.
- Wani S. A., Chand S., Ali T. Potential use of *Azotobacter chroococcum* in crop production // Current Agriculture Research Journal. 2013. Vol. 1. No 1. P. 35–38.
- Weyers J. D., Paterson N. W. Plant hormones and the control of physiological processes // New Phytol. 2001. Vol. 152. P. 375–407.

# SEED GERMINATION AND SEEDLING STATE OF WHEAT *TRITICUM AESTIVUM* WHEN EXPOSED TO *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* CELL SUSPENSION

**EROFEEVA**  
Elena Alexandrovna

*Lobachevski State University of Nizhny Novgorod,*  
*ele77785674@yandex.ru*

**RECHKIN**  
Alexander Ivanovich

*Lobachevski State University of Nizhny Novgorod, re-ka@mail*

**SAVINOV**  
Alexander Borisovich

*Lobachevski State University of Nizhny Novgorod, sabcor@mail.ru*

## Key words:

Azotobacter  
*Triticum aestivum*  
pigment  
lipid peroxidation  
growth  
seed germination

**Summary:** To date, the ability of various *Azotobacter* strains to enter into symbiosis with the wheat and regulate its development has not been studied enough. In this regard, we assessed the capacity of strain No. 4 of *Azotobacter chroococcum* isolated from the soil of agricultural land in Nizhny Novgorod region (Russia) to influence the seed germination and the state of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) when various quantities of cells were introduced into the nutrient solution (from 109 cells/ml (A) to A/256) in the first day of the experiment. It was stated that all cell concentrations except for the smallest one caused reduced seed germination. Low concentrations (A/256-A/64) did not affect the wet biomass of seedlings root; medium ones A/32-A/16 increased it. At high concentrations A/8 the effect disappeared, and the highest concentrations A/4-A again increased this parameter. As for the wet shoot biomass, a stimulating effect was caused only by the concentrations A/2 and A/4. Chlorophyll and carotenoids content, as well as the intensity of lipid peroxidation did not change under the action of *A. chroococcum*. Thus, the studied strain of *A. chroococcum* is capable of regulating the germination of seeds and the growth of the root system and shoots of *T. aestivum*.

Received on: 07 November 2018

Published on: 17 June 2019

## References

- Erofeeva E. A. Hormesis and paradoxical effects of wheat seedling (*Triticum aestivum* L.) parameters upon exposure to different pollutants in a wide range of doses, Dose Response. 2014. Vol. 12. No 1. P. 121–135.
- Feoktistova N. V. Mardanova A. M. Hadieva G. F. Sharipova M. R. Rhizosphere bacteria, Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Ser. Estestvennye nauki. 2016. T. 158. Kn. 2. P. 207–224.
- Howard J. B., Rees D. C. [How many metals does it take to fix N<sub>2</sub>? A mechanistic overview of biological nitrogen fixation](#), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006. Vol. 103. No 46. P. 17088–17093.
- Kamyshnikov V. S. Reference book on clinical and biochemical laboratory diagnostics. Minsk: Belarus', 2002. T. 2. 495 p.
- Kirichenko E. Titova L. Koc' S. The bacterization effectiveness of spring wheat seeds with a new strain of *Azotobacter chroococcum* T76, [Stiinta Agricola](#). 2010. No. 1. P. 21–24.
- Kirichenko E. V. Koc' S. Ya. The use of *Azotobacter chroococcum* to create complex biological preparations, *Biotehnologiya*. 2011. T. 4. No. 3. P. 74–81.
- Kirichenko E. V. Biological activity of spring wheat rhizosphere soil in association with *Azotobacter chroococcum* T79 bacteria modified with N-acetyl-D-glucosamine, *Mikrobiologiya i biotehnologiya*. 2016. No. 3. P. 30–42.
- Nefed'eva E. E. Belopuhov S. L. Verhoturov V. V. Lysak V. I. The role of phytohormones in the regulation of seed germination, *Izvestiya vuzov. Prikladnaya biokhimiya i biotehnologiya*. 2013. No. 1. P. 61–65.
- Salabrese E. J., Blain R. B. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the



- hormesis database: an overview, *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005. Vol. 202. P. 1451–1474.
- Shlyk A. A. Determination of chlorophylls and carotenoids in green leaf extracts, *Biohimicheskie metody v fiziologii rasteniy*. M.: Nauka, 1971. P. 154–170.
- Wani S. A., Chand S., Ali T. Potential use of *Azotobacter chroococcum* in crop production, *Current Agriculture Research Journal*. 2013. Vol. 1. No 1. P. 35–38.
- Weyers J. D., Paterson N. W. Plant hormones and the control of physiological processes, *New Phytol*. 2001. Vol. 152. P. 375–407.