

УДК 581.1: 58.02

**ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* НА ПЕРЕКИСНОЕ
ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ *SINAPIS ALBA* ПРИ CD-СТРЕССЕ****¹Курамшина З.М., ¹Смирнова Ю.В., ²Хайруллин Р.М.**¹*Стерлитамакский филиал Башкирского государственного университета,
Стерлитамак, e-mail: kuramshina_zilya@mail.ru;*²*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа*

Изучено влияние предварительной инокуляции семян клетками эндофитных штаммов бактерий *Bacillus subtilis* 26Д и 11ВМ на рост горчицы белой (*Sinapis alba*) и образование малонового диальдегида (МДА) в тканях растений в условиях воздействия ионов кадмия (Cd-стресс). Показано, что растения, инокулированные клетками *B. subtilis*, при Cd-стрессе отличались более высокими показателями биомассы и менее интенсивным накоплением продуктов перекисного окисления липидов, чем необработанные бактериями растения. Пониженное содержание малонового диальдегида в тканях растений, инокулированных клетками бактерий, может свидетельствовать о менее интенсивном развитии окислительного стресса, вызванного ионами Cd. Ростстимулирующий и антистрессовый эффекты *Bacillus subtilis* были более заметны при выращивании растений в почве в вегетационных опытах, чем при росте растений в чашках Петри в водном растворе.

Ключевые слова: *Sinapis alba*, *Bacillus subtilis*, перекисное окисление липидов, Cd-стресс

**EFFECT OF BACTERIA *BACILLUS SUBTILIS* ON THE LIPID PEROXIDATION
OF *SINAPIS ALBA* UNDER CD-STRESS****¹Kuramshina Z.M., ¹Smirnova Y.V., ²Khayrullin R.M.**¹*Sterlitamak Branch, Bashkir State University, Sterlitamak, e-mail: kuramshina_zilya@mail.ru;*²*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa*

The effect of inoculation of white mustard seeds (*Sinapis alba* L.) by cells of endophytic *Bacillus subtilis* (strains 26D and 11VM) on the growth and the formation of malondialdehyde (MDA) in plant tissues under the cadmium ions action (Cd-stress) has been studied. It has been shown that plants inoculated with *B. subtilis* cells, under Cd-stress differed higher rates of biomass and less intense accumulation of lipid peroxidation products than untreated bacteria plants. Reduced the content of malondialdehyde in plant tissues, inoculating by bacterial cells, may be indicative of a less intense development of the oxidative stress caused by the ions Cd. The growth-stimulating and anti-stress effects of *Bacillus subtilis* were more noticeable in plants grown in soil in pot experiments, than during the growth of plants in a petri dish in an aqueous solution.

Keywords: *Sinapis alba*, *Bacillus subtilis*, lipid peroxidation, Cd-stress

В последние десятилетия в промышленно развитых странах увеличивается степень загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами. Кадмий, относящийся к числу токсичных элементов, попадает в экосистемы, главным образом, в результате производства химических продуктов и использования фосфатных удобрений. Его концентрации в почвах угодий могут достигать высоких значений, а сам металл в виде ионов легко ассимилируется растениями [8]. Токсичность кадмия в растительном организме связана с увеличением перекисного окисления липидов (ПОЛ) и изменением антиоксидантной системы растений [5]. Следствием таких процессов могут быть нарушения метаболизма и гибель растений.

В настоящее время все большее значение для повышения устойчивости растений к стрессовым факторам приобретают исследования в области биотехнологий, использующих микроорганизмы. Ранее нами было показано протекторное действие клеток эн-

дофитного штамма *Bacillus subtilis* 26Д на рост подсолнечника *Helianthus annuus* при действии ионов кадмия [3]. В связи с этим интересен вопрос о специфичности такого эффекта и механизмах его проявления, а также роли эндофитных бактерий в развитии окислительного стресса растений, вызванного тяжелыми металлами. **Цель настоящей работы** заключалась в изучении влияния обработки семян *Sinapis alba* клетками *B. subtilis* штаммов 26Д и 11ВМ на рост растений и образование малонового диальдегида (МДА) при стрессе, вызванном ионами кадмия.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили растения горчицы белой (*Sinapis alba* L.). Семена перед посевом промывали мыльным раствором, затем выдерживали 1 мин в 96%-м этаноле, ополаскивали в стерильной дистиллированной воде. В опытах использовали 20-часовую культуру бактерий, растущую на мясопептонном агаре при +37°C. Клетки бактерий отмывали 0,001 М KCl. Суспензию клеток доводили до

необходимой концентрации по оптической плотности. 1 г семян обрабатывали в ламинар-боксе 20 мкл суспензии клеток бактерий с титром 1 млрд/мл.

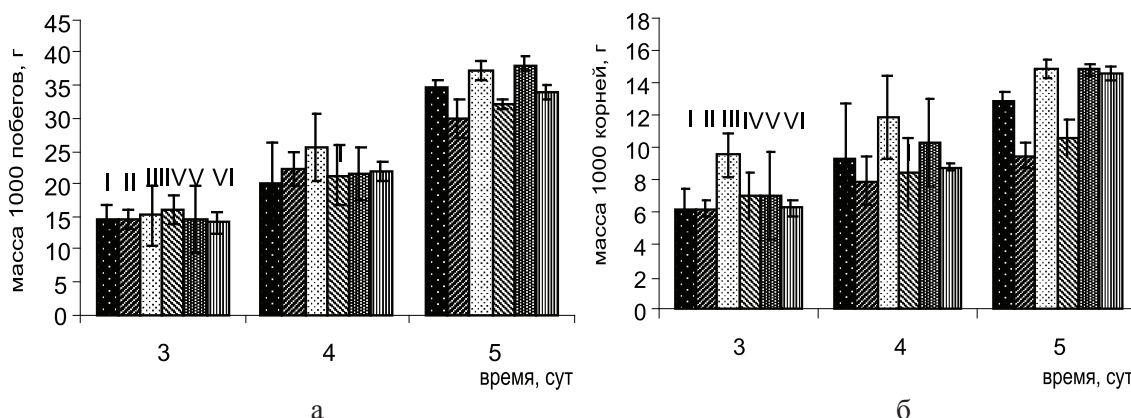
Исследования проводили в чашках Петри и вегетационных сосудах в почве. Инокулированные и контрольные семена выращивали в чашках Петри ($d = 140$ мм, $h = 24$ мм) на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой или раствором $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$. Раствор соли готовили в пересчете на содержание иона металла. В вегетационных опытах использовали чернозем выщелоченный. В варианте с имитацией Cd-стресса после посева семян почву поливали раствором соли, а в контроле – дистиллированной водой. Растения выращивали при температуре 18–20 °С. Размещение вегетационных сосудов меняли каждый день по единой схеме, чтобы обеспечить более равномерную освещенность. В чашках Петри измерение сырой массы и концентрацию МДА проводили на 3, 4, 5 сутки от начала эксперимента; в вегетационных опытах – на 3, 6, 9, 14, 30 сутки.

Содержание МДА измеряли, используя метод Costa с соавторами [6], основанный на образовании окрашенного комплекса между МДА и тиобарбитуровой кислотой (ТБК) при нагревании. Концентрацию МДА определяли при 532 нм с помощью спектрофотометра UNICO 2800, вычитая величину неспецифи-

ческой экстинкции при 600 нм. Содержание МДА рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции, равного $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. В таблицах приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

Результаты исследования и их обсуждение

Интегральным показателем, характеризующим рост растений и его органов в условиях стресса, является биомасса. Сырая масса как побегов, так и корней растений, преобработанных клетками *B. subtilis*, была больше контрольных, что было особенно заметно на пятые сутки выращивания в чашках Петри (рисунок) и на тридцатые – в вегетационных опытах в почве (табл. 1). Так, обработка семян горчицы клетками обоих штаммов *B. subtilis* повышала массу корней в чашках Петри в среднем на 15%, побегов – на 9%. В вегетационных опытах масса побегов растений повышалась при инокуляции семян бациллами на 11%.



Влияние инокуляции семян бактериями *B. subtilis* на рост *S. alba* в присутствии ионов кадмия в чашках Петри:

а – масса побегов; б – масса корней. Варианты опыта: I – контроль; II – растения, обработанные *B. subtilis* 26Д; III – растения, обработанные *B. subtilis* 11 ВМ; IV – Cd 20 мг/л; V – растения, обработанные *B. subtilis* 26Д + Cd 20 мг/л; VI – растения, обработанные *B. subtilis* 11 ВМ + Cd 20 мг/л.

Таблица 1

Сырая масса побегов горчицы, выращенных в почве, загрязненной кадмием (100 растений, г)

Вариант		Сутки				
		3	6	9	14	30
Cd 0 мг/кг	Контроль	3,1 ± 0,5	6,0 ± 0,6	7,2 ± 0,6	8,7 ± 0,7	11,0 ± 0,3
	<i>B. subtilis</i> 26Д	3,2 ± 0,5	6,0 ± 0,5	7,2 ± 0,3	8,8 ± 0,8	12,4 ± 0,2
	<i>B. subtilis</i> 11ВМ	2,9 ± 0,3	5,9 ± 0,2	6,9 ± 0,3	8,8 ± 0,8	12,1 ± 0,2
Cd 10 мг/кг	Контроль	3,8 ± 0,9	5,4 ± 0,6	7,7 ± 0,6	8,1 ± 1,1	10,6 ± 1,1
	<i>B. subtilis</i> 26Д	2,8 ± 0,5	5,7 ± 0,4	8,2 ± 1,0	8,5 ± 1,1	12,4 ± 0,8
	<i>B. subtilis</i> 11ВМ	3,4 ± 0,6	5,9 ± 0,6	8,2 ± 0,3	9,4 ± 0,9	10,8 ± 0,7
Cd 200 мг/кг	Контроль	3,7 ± 0,6	6,3 ± 1,1	7,9 ± 0,9	9,2 ± 1,1	10,1 ± 0,8
	<i>B. subtilis</i> 26 Д	2,7 ± 0,3	6,0 ± 0,3	8,4 ± 0,3	9,3 ± 1,0	12,1 ± 0,5
	<i>B. subtilis</i> 11ВМ	3,6 ± 0,7	6,4 ± 0,7	9,3 ± 1,1	10,5 ± 0,9	11,9 ± 1,0

Ростстимулирующий эффект бактерий, вероятно, связан с тем, что бациллы могут продуцировать фитогормоны подобные вещества [1, 4], а также повышать содержание питательных веществ в доступной для растений форме [2] и подавлять развитие фитопатогенных микроорганизмов [4].

При выращивании горчицы в чашках Петри присутствие ионов кадмия в концентрации 20 мг/л вызывало снижение массы корней на пятые сутки на 34%, а побегов – на 13%. Два изученных штамма бацилл по-разному действовали на рост растений в присутствии ионов кадмия. Обработка семян штаммом *B. subtilis* 26Д не повышала устойчивость проростков к токсичным ионам металла – масса корней при Cd-стрессе также снижалась почти на 30% в сравнении с инокулированными растениями, растущими на контрольной среде без кадмия. В отличие от штамма *B. subtilis* 26Д клетки штамма 11ВМ проявляли четкий протекторный эффект. Масса растений, предобработанных клетками бактерий *B. subtilis* 11ВМ, при Cd-стрессе не отличалась от таковой у контрольных растений, растущих на воде, что свидетельствует о защитном действии клеток этого штамма при действии токсичных ионов металла. Масса побегов растений, предобработанных клетками обоих штаммов бактерий, снижалась при действии кадмия так же, как и в контроле, в среднем на 13%.

В вегетационных опытах при действии ионов кадмия в изученных концентрациях достоверно значимого протекторного эффекта выявить не удалось и можно говорить лишь о тенденции его проявления при обработке семян клетками бацилл.

Известно, что токсическое действие кадмия на растения проявляется в развитии окислительного стресса и образовании активных форм кислорода (АФК). АФК способны инициировать перекисное окисление липидов, в результате чего происходит повреждение мембранных структур. Кроме того, продукты ПОЛ (4-гидроксиалкенилы, малоновый диальдегид и др.) обладают мутагенной активностью и блокируют клеточное деление [7].

Считается, что такой продукт ПОЛ, как малоновый диальдегид (МДА), может быть использован как биологический индикатор развития окислительного стресса растений при токсичном действии кадмия и других металлов [7].

При выращивании горчицы в чашках Петри достоверного влияния бацилл, а также ионов кадмия на содержание МДА в корнях растений выявить не удалось (табл. 2). При анализе этого показателя в побегах трехсуточных растений, предобработанных клетками бактерий, растущих на воде, отмечалась тенденция увеличения содержания МДА в сравнении с контролем. Затем эти различия сглаживались.

Таблица 2

Содержание МДА в растениях горчицы белой при воздействии ионов кадмия в водном растворе, 10^{-5} мМ/г сырого веса

Варианты		Сутки		
		3	4	5
Корни				
Cd 0 мг/л	Контроль	6,6 ± 1,3	6,7 ± 1,1	6,6 ± 0,4
	<i>B. subtilis</i> 26Д	6,4 ± 0,6	6,8 ± 0,6	6,2 ± 0,1
	<i>B. subtilis</i> 11ВМ	5,9 ± 0,8	6,1 ± 0,5	6,1 ± 0,4
Cd 20 мг/л	Контроль	5,8 ± 0,7	6,4 ± 1,5	6,1 ± 0,2
	<i>B. subtilis</i> 26Д	6,1 ± 0,9	7,2 ± 1,2	5,6 ± 0,4
	<i>B. subtilis</i> 11ВМ	5,8 ± 0,7	6,0 ± 0,6	5,8 ± 0,5
Побеги				
Cd 0 мг/л	Контроль	10,7 ± 2,3	13,0 ± 1,9	12,09 ± 0,6
	<i>B. subtilis</i> 26Д	12,0 ± 2,7	11,0 ± 1,9	13,6 ± 0,9
	<i>B. subtilis</i> 11ВМ	14,8 ± 4,4	12,5 ± 2,3	11,5 ± 0,6
Cd 20 мг/л	Контроль	8,3 ± 1,0	9,8 ± 1,6	11,3 ± 0,6
	<i>B. subtilis</i> 26Д	10,6 ± 2,0	8,8 ± 1,5	9,9 ± 0,1
	<i>B. subtilis</i> 11ВМ	9,1 ± 1,6	11,2 ± 2,0	10,3 ± 0,4

При Cd-стрессе в побегах пятисуточных контрольных и предобработанных бактериями, растущих на воде, содержание МДА было выше, чем у растущих в присутствии ионов металла. При этом инокуляция проростков бациллами приводила к снижению уровня МДА в побегах при действии ионов кадмия.

В вегетационных опытах выявлено в среднем двукратное снижение уровня МДА в побегах контрольных растений при содержании ионов металла в концентрации 20 мг/кг и 200 мг/кг почвы. Вероятно, это связано с тем, что гумус черноземных почв способен адсорбировать ионы кадмия в таких концентрациях и, таким образом, не только снижать пресс Cd-стресса, но благо-

приятствовать реакциям растительных клеток, связанным со снижением ПОЛ.

Если в чашках Петри при инокуляции семян клетками бацилл мы смогли выявить лишь тенденцию повышения уровня МДА в сравнении с контрольными растениями, то в вегетационном опыте у трехсуточных растений наблюдали повышенный в 1,8 раза уровень МДА в сравнении с контрольными растениями (табл. 3). Это может быть связано с активным внедрением эндофитов в ткани растений горчицы в этом возрасте и ответной реакцией растительных клеток на этот процесс. Впоследствии в тканях побегов четырнадцати- и тридцатидневных растений, инокулированных бактериями, содержание МДА было ниже, чем у контрольных.

Таблица 3

Содержание МДА в побегах горчицы белой при воздействии ионов кадмия в почве (10^{-5} мМ/г сырого веса)

Вариант		Сутки				
		3	6	9	14	30
Cd 0 мг/кг	Контроль	6,4 ± 0,6	1,9 ± 0,3	2,9 ± 0,2	3,3 ± 0,2	3,5 ± 0,4
	<i>B. subtilis</i> 26Д	6,0 ± 0,6	1,3 ± 0,3	3,0 ± 0,1	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,2
	<i>B. subtilis</i> 11ВМ	5,9 ± 0,2	3,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,2 ± 0,1
Cd 10 мг/кг	Контроль	3,1 ± 0,3	3,0 ± 0,1	3,2 ± 0,5	3,6 ± 0,2	4,3 ± 0,6
	<i>B. subtilis</i> 26Д	4,8 ± 0,9	2,8 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,9 ± 0,2	2,8 ± 0,1
	<i>B. subtilis</i> 11ВМ	5,6 ± 0,8	2,0 ± 0,1	1,4 ± 0,4	3,6 ± 0,7	3,1 ± 0,3
Cd 200 мг/кг	Контроль	3,0 ± 0,4	2,5 ± 0,4	2,4 ± 0,5	3,5 ± 0,6	5,5 ± 0,7
	<i>B. subtilis</i> 26Д	4,4 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,7 ± 0,2	2,3 ± 0,6	3,6 ± 0,2
	<i>B. subtilis</i> 11ВМ	5,3 ± 0,5	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,2	2,5 ± 0,4	3,7 ± 0,2

Аналогичная закономерность проявилась еще раньше – у девятисуточных растений при Cd-стрессе. В тканях побегов инокулированных бактериями растений пониженный в сравнении с контрольными уровень МДА при действии ионов кадмия сохранялся вплоть до тридцати суток (табл. 3).

Заключение

Таким образом, кроме известных рост-стимулирующего эффекта эндофитных штаммов бактерий *Bacillus subtilis* по отношению к растениям, а также фунгицидного по отношению к фитопатогенным грибам [1, 4] нами выявлен протекторный эффект эндофитных бактерий при действии токсичных ионов кадмия. Анализ уровня МДА в тканях растений, указывающий на активность ПОЛ, выявил, что его содержание

в тканях побегов растений горчицы, предобработанных клетками эндофитов и растущих в почве в условиях Cd-стресса, ниже, чем в контрольных. Этот факт раскрывает один из механизмов защитного действия эндофитных штаммов бактерий на растения, который может быть связан со снижением интенсивности развития окислительного стресса и сохранением целостности мембранного аппарата растительных клеток, что важно для проявления их барьерной функции по отношению к ионам токсичного металла.

Список литературы

1. Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Мелентьев А.И., Мартыненко Е.В., Кудоярова Г.Р. Сравнение действия штаммов бактерий, различающихся по способности синтезировать цитокинины, на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 4. – С. 567–574.

2. Егоршина А.А., Хайруллин Р.М., Лукьянцев М.А., Курамшина З.М., Смирнова Ю.В. Фосфат-мобилизующая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их влияние на степень микоризации корней пшеницы // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. – 2011. – Т. 4, № 2. – С. 172–182.

3. Курамшина З.М., Смирнова Ю.В., Хайруллин Р.М. Повышение толерантности проростков подсолнечника *Helianthus annuus*, инокулированных эндофитным штаммом *Bacillus subtilis*, к действию тяжелых металлов. Сообщение 2. Антистрессовая активность эндофита *Bacillus subtilis* 26D при действии тяжелых металлов на растения подсолнечника *Helianthus annuus* // IV Всероссийская научно-практическая конференция «Проблемы экологии Южного Урала»: приложение к 10 номеру (2009 г.) журнала «Вестник ОГУ», 20–21 октября 2009 г. – Оренбург: Оренбургский государственный университет, 2009. – С. 461–463.

4. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus Coch* в агроэкосистемах. – М.: Наука, 2007. – 147 с.

5. Cho U.H., Seo N.H. Oxidative Stress in *Arabidopsis thaliana* Exposed to Cadmium Is due to Hydrogen Peroxide Accumulation // *Plant Science* – 2005. – Vol. 168. – P. 113–120.

6. Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons // *Plant Science* – 2002. – Vol. 162. – P. 939–945.

7. Montiller J.L., Cacas J.-L., Montane M.-H. The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: A tool to scan for oxidative stresses // *Plant Journal* – 2004. – Vol. 40. – P. 439–450.

8. Toppi L.S., Gabbrielli R. Response to Cadmium in Higher Plants // *Environ. Exp. Bot.* – 1999. – Vol. 41. – P. 105–130.

References

1. Arkhipova T.N., Melent'ev A.I., Martynenko E.V., Kudoyarova G.R., Veselov S.Yu. Comparison of effects of bacterial strains differing in their ability to synthesize cytokinins on growth and cytokinin content in wheat plants – *Russian Journal of Plant Physiology*, 2006, Vol. 53, no. 4, pp. 507–513.

2. Egorshina A.A., Khairullin R.M., Lukyantsev M.A., Kuramshina Z.M., Smirnova Y.V. Fosfat-mobilizujushhaja aktivnost' jendofitnyh shtammov *Bacillus subtilis* i ih vlijanie na stepen' mikorizacii kornej pshenicy [Phosphate-Mobilizing Activity of the Endophytic *Bacillus subtilis* Strains and their Effect on wheat Roots Micorrhization Ratio] – *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Serija: Biologija*, 2011, Vol. 4, no. 2, pp. 172–182.

3. Kuramshina Z.M., Smirnova Y.V., Khairullin R.M. IV Vserossijskaja nauchno-prakticheskaja konferencija «Problemy jekologii Juzhnogo Urala». Orenburg: Orenburgskij gosudarstvennyj universitet, 2009, pp. 461–463.

4. Melent'ev A.I. Ajerobnye sporeobrazujushhie bakterii *Bacillus Coch* v agrojekosistemah. Moscow, Nauka, 2007, 147 p.

5. Cho U.H., Seo N.H. Oxidative Stress in *Arabidopsis thaliana* Exposed to Cadmium Is due to Hydrogen Peroxide Accumulation // *Plant Science* 2005. Vol. 168. pp. 113–120.

6. Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons // *Plant Science* 2002. Vol. 162. pp. 939–945.

7. Montiller J.L., Cacas J.-L., Montane M.-H. The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: A tool to scan for oxidative stresses // *Plant Journal* 2004. Vol. 40. pp. 439–450.

8. Toppi L.S., Gabbrielli R. Response to Cadmium in Higher Plants // *Environ. Exp. Bot.* 1999. Vol. 41. pp. 105–130.

Рецензенты:

Карпов Д.Н., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биологии естественнонаучного факультета Стерлитамакского филиала Башкирского государственного университета, г. Стерлитамак;

Зейферт Д.В., д.б.н., доцент кафедры биологии естественнонаучного факультета Стерлитамакского филиала Башкирского государственного университета, г. Стерлитамак.

Работа поступила в редакцию 15.09.2014.