

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РИЗОСФЕРНЫХ И ЭНДОФИТНЫХ ГАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ В КАЧЕСТВЕ МЕХАНИЗМА АДАПТАЦИИ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ К ЗАСОЛЕННЫМ ПОЧВАМ

Дмитренко Григорий Игоревич¹, Плотников Роман Сергеевич¹, Саранчин Евгений Павлович¹
Тюменская область, г. Тюмень, ФГКОУ
«Тюменское президентское кадетское училище»¹

USE OF RHIZOSPHERIC AND ENDOPHYTIC HALOPHILIC BACTERIA AS A MECHANISM FOR ADAPTATION OF CULTURAL PLANTS TO SALINE SOILS

Dmitrenko Grigory Igorevich¹, Plotnikov Roman Sergeevich¹, Saranchin Evgeny Pavlovich¹
Tyumen Region, Tyumen, Federal State Educational Institution of Higher Education Tyumen
Presidential Cadet School¹

Аннотация. В данном исследовании изучалось влияние ризосферных и эндофитных бактерий, выделенных из диких галофитов (*Tripolium pannonicum* и *Hordeum brevisubulatum*), на устойчивость сельскохозяйственных культур (ячменя сорта «Уватский» и подсолнечника сорта «Сибирский 97») к засолению почв. Авторы самостоятельно выделили бактериальные штаммы из корней указанных растений и смогли получить изоляты. Проведена серия опытов и экспериментов по исследованию влияния указанных бактерий на прорастание семян подсолнечника и зерен ячменя в условиях засоления и реальность внедрения эндофитных растений в ткани этих культур. Лабораторные и полевые эксперименты показали, что ризосферные бактерии астры паннонской положительно влияют на рост подсолнечника в условиях солевого стресса, увеличивая длину гипокотыля и снижая потерю биомассы. В то же время бактерии ячменя короткоостистого не оказали положительного эффекта на культурный ячмень. Эндофитные бактерии не проявили значимого защитного действия на ранних стадиях развития растений. Результаты указывают на видоспецифичность взаимодействия бактерий с растениями и необходимость дальнейших исследований для применения их в сельском хозяйстве. Авторам удалось определить род одной из эндофитных бактерий (*Serratia* sp.) с помощью выделения ДНК и секвенирования по Сэнгеру.

Ключевые слова: галофильные бактерии, ризосферные бактерии, эндофитные бактерии, засоление почв, селекция, устойчивость растений к засолению, ячмень, подсолнечник, солончаки, Тюменская область.

Abstract

This study examined the effect of rhizosphere and endophyte bacteria isolated from wild halophytes (*Tripolium pannonicum* and *Hordeum brevisubulatum*) on the resistance of agricultural crops (Uvatsky barley and Siberian 97 sunflower) to soil salinity. The authors independently isolated bacterial strains from the roots of these plants and obtained isolates. A series of experiments was conducted to study the effect of these bacteria on the germination of sunflower seeds and barley grains under saline conditions, as well as the possibility of endophytic plants being introduced into the tissues of these crops. Laboratory and field experiments showed that the rhizosphere bacteria of *Aster pannonica* had a positive effect on the growth of sunflowers under salt stress, increasing the length of the hypocotyl and reducing the loss of biomass. However, the bacteria of *Brome* barley did not have a positive effect on cultivated barley. Endophytic bacteria did not show a significant protective effect on early

Keywords: halophilic bacteria, rhizosphere bacteria, endophytic bacteria, soil salinization, selection, plant resistance to salinization, barley, sunflower, salt marshes, Tyumen Region.

Введение

Тюменская область относится к числу сельскохозяйственных областей с рискованным земледелием. Южные районы области характеризуются зачастую наличием солонцов и солончаков, которые резко снижают возможности выращивания зерновых, зернобобовых и, особенно, овощных культур. В тоже время на засоленных территориях можно встретить большое количество растений приспособленных к росту и развитию в условиях повышенной солености – галофитов. Одним из механизмов адаптации, по мнению ученых [1], является наличие в прикорневой зоне или непосредственно на самих корнях, особых бактерий. Они могут создавать защитную пленку на корнях или нейтрализовать соли в ходе сложных метаболических процессов. Кроме ризосферных бактерий, существует и особая группа живущих внутри тканей растений, эндофитных микроорганизмов. Чаще всего они играют роль либо паразитов, либо симбионтов. Такие бактерии могут оказывать адаптивное влияние на своих хозяев. Стоит отметить, что физиология и биохимия однодольных галофитов значительно отличается от двудольных. Это может оказывать влияние на состав и разнообразие ризосферных и эндофитных бактерий. Поэтому выделение, изучение и возможное внедрение таких микроорганизмов в биотехнологию и сельское хозяйство носит актуальный характер.

Цель работы: изучение влияния галофильных ризосферных и эндофитных бактерий дикорастущих галофитов на культурные виды с/х растений.

Задачи:

1. Рассмотреть влияние ризосферных галофильных бактерий на проблему высокого осмотического давления в корнях растений, обитающих на солончаках.
2. Выделить и получить изоляты ризосферных галофильных бактерий из околокорневой почвы двудольных и однодольных растений.
3. Провести опыты по изучению влияния культур галофильных бактерий на рост и развитие культурных растений.

Объект исследования: ризосферные и эндофитные бактерии из почвы корневых систем растений: Солончаковая Астра Паннонская (*Tripolium pannonicum*) и Ячмень короткоостистый (*Hordeum brevisubulatum*).

Предмет исследования: влияние полученных бактерий на рост и развитие культурных растений в условиях засоления почвы.

Гипотеза: ризосферные и эндофитные бактерии галофильных растений из дикой природы могут образовать сложные консорциумные взаимодействия и с другими видами растений, позволяя им расти в условиях засоления почвы.

Актуальность работы: климатические изменения становятся причиной значительных сдвигов в характеристиках сельскохозяйственных угодий. Одним из вариантов становится все возрастающее засоление почв. Работа направлена на изучение возможности выращивать

культурные растения за счет бактериологической адаптации к повышенной концентрации соли в почвах.

Новизна работы: исследование такого рода пока еще очень незначительны. С растениями, входящими в состав флоры Тюменской области, подобная работа ранее не проводилась.

1. Литературный обзор

В зарубежных изданиях вопросам, посвященным адаптации культурных растений к стрессовым почвенным условиям, связанным с засолением почв, отводится большое внимание. Особая роль в этих исследованиях принадлежит ризосферным галофильным бактериям. Это целая группа микроорганизмов, обитающих на поверхности корней растений-галофитов в солонцовых и солончаковых почвах. Индийские исследователи [1] смогли выделить из ризосферной зоны растения *Phyllanthus amarus* 52 штамма различных бактерий. Методом секвенирования гена 16S р-РНК авторы выяснили, что эти бактерии разделяются на шесть родов: *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinabacillus* и другие. Сходные исследования проводились и американскими учеными [2]. Работая с люцерной в штате Юта, исследователи обнаружили штаммы *Bacillus* и *Halomonas* являющимися эндофитными в трех видах галофитных растений. Но была отмечена специфичность видов галофильных бактерий по влиянию на рост и развитие люцерны. Авторы предполагают, что механизмы воздействия галофильных ризосферных бактерий с растениями солончаков могут быть разными. Некоторые формируют биопленки, которые задерживают воду и питательные вещества и снижают поглощение растениями ионов натрия из почвы. Другие бактерии вызывают изменения в экспрессии генов в растении-хозяине, включая факторы транскрипции. Аналогичные исследования проведены F. Orhan. [3]. Этот исследователь проводил опыты с использованием галофильных бактерий в качестве защиты от засоления почвы на растениях пшеницы используя 18 различных галофильных бактерий. Наиболее удачной в его исследованиях отмечалась концентрация соли NaCl 200мМоль/л. При такой концентрации снижение роста растений без бактерий составило 58,4 %. Разные виды бактерий оказали разное влияние от 10,3 до 33,7 % роста биомассы по сравнению с ухудшением на 58,4 %. Было доказано, что на лучший рост оказывает влияние выделяемой бактериями индолинуксусной кислоты ИУК (ИАА) и некоторых других веществ. Кроме этого, нужно учитывать и способность галофильных бактерий накапливать эндогенные осмолиты, такие как пролин, глицин.

Очень сходные механизмы работы но уже эндофитных бактерий у галофильных растений приводит в своей обзорной работе Аликулов Б.С [4]. Кроме вышеуказанных способов адаптации к солевому стрессу автор отмечает способность эндофитных бактерий вырабатывать особые вещества – галоцины, которые меняют механизмы осморегуляции через ингибирование трансляции и транскрипции отдельных участков ДНК. Также существуют эндофитные бактерии защищающие галофильные растения от патогенов грибкового, бактериального или иного

происхождения. О таких, вырабатывающих биологически активные метаболиты с антимикробными свойствами указывают с своей работе индийские исследователи [5]. Очень интересные результаты по исследованию ферментативной активности эндофитных бактерий и грибов полученных из семян растений Приаралья представлены коллективом авторов под руководством Суяровой Р.А. [6]. Они доказали высокие показатели производства амилаз и невысокие целлюлаз, предположив большую значимость первых при прорастания семян в условиях солевого стресса.

Материалы по галофильным бактериям и использованию их в качестве инокулята для культурных растений многочисленны и очень глубоки по содержанию. Но, зачастую, использование бактерий из ризосферы солончаковых растений носит случайный характер. В условиях солончаков Сибири таких исследований мы не обнаружили. В тоже время, флора, и вероятно, ризосферная микрофлора солончаков Южной Сибири может носить специфичный характер. Например, часто встречающимся злаком является Ячмень короткоосистый (*H. brevisubulatum*). Трофимов И.Т. [7] с соавторами в своей работе предложили метод использования этого вида в интродукции на солончаковых почвах. Другие исследователи [8] Н. Бзюк с соавт., работая с ризосферным микробиомом Ячменя короткоостистого, смогли увеличить устойчивость культурного ячменя сорта Golden Promis к мучнистой росе.

Кроме однодольных растений-галофитов на солончаках Тюменской области часто можно встретить и двудольные. Типичными представителями является Солончаковая астра Паннонская (*Tripolium pannonicum*) [9]. Это, по мнению авторов Плантариума [10], однолетний мезогигрофит и светолюбивый галофит. Изучением ее ризосферных и эндофитных бактерий занимался коллектив из Польши [11]. Им удалось получить коллекцию штаммов ризосферных и эндофитных бактерий из этого растения. Авторы обнаружили преобладание грамположительных бактерий и в ризосфере (90,9%), и в самих корнях (72,7%). Отмечен более широкий спектр метаболической активности у ризосферных штаммов по сравнению с эндофитными. Полученную коллекцию исследователи планировали использовать для изучения адаптации растений к засоленным почвам. Предполагается, что биохимические и метаболические характеристики двудольных и однодольных растений могут быть весьма различны и оказывать большое влияние на состав как эндофитных, так и ризосферных бактерий. Поэтому предполагаемая работа нацелена на изучение влияния таких бактерии даже не по отношению к разным классам, а по отношению к одинаковым семействам.

Нам удалось обнаружить интересные результаты по изучению всхожести, энергии прорастания и биомассы ячменя ярового (*Hordeum vulgare* L.) в Тюменской области [12]. Изучив два сорта ярового ячменя: «Абалак» и «Уватский», исследования показали, что первый менее устойчив на ранних стадиях развития к различным видам засоления. При хлоридном засолении NaCl в концентрации 200 мМоль/л, всхожесть сорта «Уватский» снижалась с 92% в контроле до

38%. Биомасса проростков снижалась со 100% до 52,7%. Авторы, отмечают также, что наибольший ущерб приносило содовое засоление (Na_2CO_3). Важно отметить, что сорт ячменя «Уватский» изучался кандидатом с.-х. наук Ю.И. Серебренниковым [13], как новый сорт многорядного ячменя сибирской селекции в Красноярском крае. Им отмечается экологическая пластичность сорта «Уватский» по массе 1000 зерен. Это отчасти подтверждает возможность растений этого сорта приспосабливаться к изменениям климатических и почвенных условий.

Если по однодольному растению – ячменю, удалось найти информацию связанную с устойчивостью к засолению, то растение сибирской селекции подсолнечник сорта Сибирский-97, на устойчивость к засолению не изучался. Известна работа кандидата с.-х. наук А.Н. Пузикова и кандидата с.-х. наук Ю.Н. Суворовой «Испытание сортов подсолнечника в условиях южной лесостепи Западной Сибири» [14]. Исследуя этот и ряд других сортов подсолнечника в лесостепной зоне Омской области, авторы обнаружили у сорта подсолнечника Сибирский-97 высокую урожайность семян (2,85-3,02 тонн /га) и сбор масла (1314-1441 кг/га) и выделили наиболее хорошую приспособляемость данных сортов для выращивания в лесостепи Сибири.

Таким образом, абсолютной новизной предполагаемые исследования не являются. Но работ именно с галофильными растениями солончаков Тюменской области в направлении селекции растений на устойчивость к засолению мы не обнаружили.

2. Материалы и методы исследования

Исследования проводились в лаборатории химии и биологии Тюменского ПКУ с сентября 2024 года. Часть работы (стерилизация и подготовка сред) была проведена в лаборатории антимикробной резистентности X-Bio. В сентябре были получены образцы корневых систем растений *N. brevisubulatum* и *Aster tripolium* из солончака к северу от районного центра Исетское Тюменской области.

Протокол получения ризосферных бактерий из указанных галофильных бактерий:

1. Делали навеску по 1 г. ризосферной почвы, разводили в 1 мл. 0,1% PBS и активно перемешивали.
2. Высеивали 30 мкл полученной почвенной вытяжки на среду LB с 5% NaCl в чашки Петри.
3. Термостировали при температуре 27-28 C° в течение 2-4 суток.
4. Полученные колонии пересеивали методом уменьшающегося штриха в среду LB с 5% NaCl. Полученные после термостирования изоляты хранили при температуре 4-6 C°.
5. Изоляты разводили в жидкой LB с 5% NaCl в колбах по 100 мл для последующего заселения в грунт.

Для получения эндофитных бактерий сначала проводили стерилизацию корней или участка стебля указанных растений в 70% этиловом спирте (1мин) и, после промывания в стерильной воде, еще 10 мин в 2% растворе гипохлорита натрия. После этого промывали 2-3 раза в

стерильной воде и после высушивания на стерильной бумаге, закладывали в чашки с LB и термостировали, как и в случае с ризосферными бактериями.

В качестве опытных культурных растений были использованы сорт ячменя «Уватский» и сорт подсолнечника «Сибирский 97» полученные из лаборатории кафедры биотехнологии и селекции в растениеводстве ГАУ «Северного Зауралья» Агротехнического института имени Ю.П. Логинова. Семена и зерновки были проверены на всхожесть двукратно по методике государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур [15].

Испытания ризосферных и эндофитных растений проводили сначала в лабораторных условиях (весна 2025 года), а затем и в полевых (лето 2025 года). Для лабораторных исследований использовали стерильный почвогрунт полученный трёхкратным автоклавированием. Его распределяли по небольшим емкостям и высыпали предварительно простерилизованные в белизне и перекиси H₂O₂ (3%) семена и зерна. В качестве контроля использовали стерильную почву, поливаемую обычной кипяченой водой. Вторые образцы поливали 1% водным раствором (0,2М) NaCl. Третьи - опытные образцы поливали 1% NaCl водой и жидкими средами с образцами ризосферных бактерий. При этом, растения подсолнечника поливались бактериями, полученными из ризосферы Астры Паннонской, а Ячменя двурядного - бактериями из Ячменя короткоостистого. В конце опыта фиксировали: всхожесть зерен (семян), общую биомассу корней и надземной части и высоту стеблей. Освещение использовали искусственное под фитолампой. Летом 2025 года были проведены и полевые испытания. На территории частного домохозяйства в Тюмени провели наблюдения за ростом и развитием ячменя (сорт Уватский) под влиянием ризосферных и эндофитных бактерий из Ячменя короткоостистого. Эксперимент с подсолнечником (сорт Сибирский 97) проходил на территории домашнего хозяйства на территории Свердловской области в поселке Полевской. Осенью 2025 года проводили выделение ДНК из бактерии Ar 1 с помощью комплекта HiPure Soil DNA Kit. Секвенирование и идентификация проводилось на базе центра «Евроген» по гену 16s рРНК.

3. Анализ результатов

3.1. Получение ризосферных и эндофитных бактерий из галофильных растений

На территории солончака около районного центра Исетское Тюменской области мы собрали особые галофильные растения: Солончаковая Астра Паннонская (*Tripolium pannonicum*) и Ячмень короткоостистый (*Hordeum brevisubulatum*). Первое относится к семейству Сложноцветные, класс Двудольные, а второе к классу Однодольные, семейство Мятликовые. Их корневые системы вместе с прилегающей почвой взвешивали на весах (1г) и после описанной выше процедуры высеивали PBS вытяжку почвы на питательную среду LB с 5% NaCl (приложение 1). После 2-4 суток термостирования при температуре +28⁰С были получены колонии галофильных ризосферных бактерий. Из Ячменя были получены 3 штамма и названы

соответственно Я1, Я2 и Я3. Из околоразовой почвы Астры паннонской мы получили два штамма: А1 и А2 (приложение 2). В некоторых опытах они были продублированы номерами П1 и П2. Эта группа бактерий использовалась особняком от полученных позже эндоситных бактерий. Для получения последних, после промывания, нарезали стерильными ножницами корни и нижнюю часть стебля этих же образцов растений и, согласно вышеуказанному протоколу, получили стерильные кусочки. После этого высевали их в питательную среду LB без соли. Через 3 суток при температуре +28°C были получены четыре штамма эндоситных бактерий. Три выросли из тканей Астры паннонской (Ар1, Ар2 и Ар3) и один штамм из Ячменя короткостеблого (Яр1). Для проверки их галотолерантности изоляты были посеяны на разные по солености среды: LB и LB с 5% NaCl. Результат показал, что большинство данных эндоситных бактерий негалофильные. Только штамм Ар3 смог расти на соленой среде (приложение 3). Эти бактерии мы проверили на принадлежность по общепринятой методике. Окрасивание, микроскопирование и оценка с помощью 3% КОН показало следующие результаты (таблица 1).

Таблица 1. Результаты качественного анализа эндоситных бактерий*

| Метод/штамм | Ар1 | Ар2 | Ар3 | Яр1 |
|------------------|---------|---------|---------|---------|
| КОН | тянется | тянется | тянется | тянется |
| Окраска по Граму | - | - | - | - |
| форма | кокки | бациллы | кокки | бациллы |

* микрофотографии представлены в приложении 4.

Любопытно, что полученные нами данные противоречат данным из работы польских исследователей [11]. Они выделяли эндоситные бактерии из астры паннонской и отмечали доминирование грамположительных бактерий (72,4% от всех).

В итоге, после всех указанных процедур, мы располагали пятью штаммами ризосферных и четырьмя эндоситных бактерий так или иначе связанных с двудольными и однодольными галофильными растениями.

3.2. Испытания семян и зерновок на всхожесть в различных условиях

Для проведения наблюдений за развитием культурных растений в будущих экспериментах с бактериями, мы решили проверить качество имеющегося семенного материала. Для этого был проведен классический анализ на всхожесть. Взяли по 30 семян подсолнечника (сорт Сибирский 97) и 30 зерновок ячменя двурядного (сорт Уватский). В чашки Петри с подложкой из фильтровальной бумаги налили прокипяченную водопроводную воду и добавили семенной материал. Через три дня фиксировали всхожесть по появлению корней и побегов. Для большей достоверности этот опыт повторили еще раз и получили следующие результаты. Всхожесть ячменя составила $(88,5 + 87)/2 = 84,75\%$. У подсолнечника $(86+90)/2 = 88\%$.

Следующим этапом была проверка всхожести этих же зерен и семян при засоленных условиях. Для это был приготовлен 0,2М р-р NaCl. Две чашки Петри с 10 семенами и 10 зернами поливали обычной прокипячённой водой, а две другие соленой (приложение 5). Соленая вода оказала явное негативное влияние и на всхожесть, и на развитие проростков. Если всхожесть подсолнечника никак не изменилась (90% и в контроле, и на экспериментальной чашке), то ячмень изучаемого сорта явно нельзя считать устойчивым к засолению. Только 30% зерен взошли. На несоленой воде длина корней ячменя варьировала от 3 до 4 см, а в соленой от 1 до 1,5см. В первом случае длина coleoptily составляла от 2 до 4 см, во втором их не было вовсе. На семенах подсолнечника в пресной воде корни были 1-1,5 см длиной, на соленой воде они выросли только до 0,5-0,8см. Можно подытожить, что подсоленная вода (0,2М) негативно отражается на прорастании семян и зерен, но ячмень страдает от этого фактора больше.

Перед испытаниями в почве было решено проверить влияние полученных бактерий на начальное развитие ячменя и подсолнечника. В первую очередь был проведен опыт по влиянию ризосферных бактерий. Для этого все пять штаммов предварительно высеяли в приготовленные жидкие питательные среды LB с 1% концентрацией поваренной соли. Семена в количестве 20 и зерна в количестве 30 штук тщательно промыли и простерилизовали 15% перекисью водорода. В чашки Петри выложили предварительно смоченные бактериальной жидкой субстанцией семена и зерна и оставили при комнатной температуре в темном месте. Контролем были чашки с семенами и зернами политые 1% раствором соленой стерильной воды (приложение 6).

Через трое суток фотографировали полученные результаты и оставили чашки на свет для первичной фотосинтетической активности. Получились следующие наблюдения (рисунок 2). Во всех экспериментальных чашках бактерии оказывали отрицательное воздействие и на подсолнечник, и на ячмень. Рост корней и побегов в контроле явно опережал все опытные образцы. Бактерии A1 и A2 (на фото П1 и П2) на 10 процентов снизили всхожесть семян подсолнечника и замедлили рост корней.



Рис. 2. Проросшие семена подсолнечника и зерна ячменя с ризосферными бактериями (диски политы 0,2М раствором NaCl)

Но рост семядолей у этих растений под влиянием бактерии А2 через 4 суток на свету визуально опередили контроль. Добавление ризосферных бактерий (Я1, Я2 и Я3) к семенам ячменя резко снизило (33-63,3 %) всхожесть в соленой воде. В тоже время, отмечали интересный факт – на корнях с бактериями корневые волоски росли гораздо гуще, чем на контроле (приложение 7). В дальнейшем требуется отдельное исследование о влиянии этих бактерий на рост и развитие первых стадий растений.

Более сложным было провести аналогичный опыт с эндофитными бактериями. Для этого тщательно простерилизованные семена и зерна проращивали в стерильных чашках Петри и при появлении корней заливали жидкими (LB среда) бактериальными суспензиями (рисунок 3). Контролем выступали чашки, заливаемые стерильной пресной водой и бактериальными суспензиями. Важно было понять, проникают бактерии внутрь корней или нет. Удачным индикатором стали бактерии с номером Ap1. Они окрашивали среду вокруг себя в красный цвет и через сутки после внесения к семенам, явно окрасили корни подсолнечника аналогичным образом (рисунок 3). Было проведено дополнительное исследование на предмет заселения корневых тканей эндофитными бактериями. Для этого отрезали корни у ростков подсолнечника зараженного бактерией Ap1 и после внешней стерилизации вырастили на питательной среде LB. Бактерии хорошо выросли и вновь вырабатывали характерный красный пигмент. Через месяц после высадки таких «зараженных» семян мы срезали часть корней и стебля с молодых растений подсолнечника и вновь проверили наличие в тканях штамма Ap1. Бактерия с указанным номером вновь отлично воспроизводилась в чашках Петри (приложение 8).



Рис.3. Внесение бактериальной суспензии и результат окрашивания корней Ap1

Но, оценивая влияние эндофитных бактерий на развитие корней и побегов ячменя и подсолнечника, можно сказать, что ни в одном из опытов не удалось получить положительные результаты. Особенно это проявлялось на ячмене (рисунок 3). То есть на

первых фенологических фазах эти бактерии не оказывали адаптирующего влияния по отношению культурных растений к засолению.

В целом, серия опытов по оценке влияния эндофитных и ризосферных бактерий полученных из дикорастущих галофильных растений показала, что они не помогают растениям справляться с засолением среды, но явного негативного влияния на всхожесть или развитие болезней не оказывают. Вероятнее всего, эти бактерии необходимы растениям для других целей. Но полный ответ мог быть получен только при проведении полноценных опытов с долгосрочным наблюдением и посадкой в почву.

3.3.Лабораторные наблюдения за испытываемыми растениями и бактериями

В весенние месяцы 2025 года были проведены ряд опытов в условиях лаборатории химии и биологии ТПКУ. В первую очередь проверяли влияние ризосферных бактерий на культурные растения, их рост и развитие. В первую очередь была приготовлена стерильная почва. Для этого взяли готовый почвогрунт «Универсальный» и провели трехкратную стерилизацию в автоклаве при температуре 120⁰С. Пластиковый контейнеры для рассады (приложение 9) стерилизовали с помощью 3% перекиси водорода. Семена в количестве 10 штук и зерна (15 штук) указанных выше сортов после стерилизации высевали в каждую ячейку на глубину 1 см. Схема посева представлена в приложении 10. Контроля в каждом из видов растений было три. Первый, это полив семян стерильной пресной водой. Второй поливали стерильной подсолненной водой (0,2М). Для устранения фактора влияния жидкой питательной среды LB было решено полить одну партию семян и зерен стерильным её вариантом, а затем соленой стерильной водой. Через двое суток после высева семян и зерен в почву были залиты жидкие концентраты соответствующих штаммов ризосферных бактерий и после этого делались замеры длины первого настоящего листа у ячменя и первого междоузлия (гипокотилия) у подсолнечника. Через 27 дней опыт был завершен, растения выкопаны и взвешены вместе с корневой системой (приложение 11). Учитывали общую биомассу и сравнивали с контролем (таблица 2).

Анализ наблюдений и табличных данных показал следующее. Стерильная земля оказывала негативное влияние на всхожесть ячменя, снизив этот показатель на 30 и более процентов по сравнению с изначально определенной в чашках Петри (84,75%)(см пункт 3.1). Всхожесть семян подсолнечника осталась без изменений (на уровне 90 и более %).

Таблица 2. Результаты выращивания опытных растений с ризосферными бактериями

| Варианты | Всхожесть, % | Длина листа(ячмень) и междоузлия (подсолнечник), см | Биомасса растений, г | Биомасса растений, % от контроля |
|-------------------------------|--------------|---|----------------------|----------------------------------|
| <i>Ячмень (сорт Уватский)</i> | | | | |
| контроль | 53 | 18,08±0,67 | 9 | 100 |
| 0,2М NaCl | 53 | 16,36±0,48 | 4,5 | 50 |
| Я ₁ | 33 | 15,14±1,35 | 2 | 22,2 |
| Я ₂ | 43 | 15,86±1,44 | 4,6 | 51 |

| | | | | |
|---|------|------------|------|------|
| Я ₃ | 56,7 | 14,32±1,13 | 3,9 | 43,3 |
| LB | 53 | 14,70±0,85 | 4,1 | 45,6 |
| РCt(0,05) | | 2,16 | | |
| <i>Подсолнечник (сорт Сибирский 97)</i> | | | | |
| контроль | 90 | 9,38±0,72 | 21,3 | 100 |
| 0,2М NaCl | 85 | 5,13±0,51 | 12,6 | 59,1 |
| A ₁ | 90 | 9,16±0,67 | 13,7 | 64,3 |
| A ₂ | 100 | 8,19±0,56 | 15,7 | 73,7 |
| LB | 90 | 4,12±0,43 | 10,2 | 47,9 |
| РCt(0,05) | | 1,22 | | |

Соленая почва негативно отразилась на длине первого листа ячменя. Все три изученных штамма бактерий не показали достоверной разницы как между собой, так и другими вариантами с засоленной почвой. Только контрольный образец был достоверно выше всех испытательных случаев. По этому признаку у подсолнечника наблюдалось положительное влияние на рост первого междоузлия (гипокотилия) *ризосферных бактерий A₁ и A₂*. Растения были достоверно выше неинфицированных бактериями образцов и близки к контролю.

Зафиксированная через 27 суток биомасса растений подсолнечника также позволила сделать вывод о положительной роли ризосферных бактерий из прикорневой среды Астры паннонской на развитие подсолнечника. При условиях близкой всхожести, инфицированные бактериями *A₁ (П1) и A₂ (П2) растения потеряли от 27 до 34%* от биомассы контроля. Потери неинфицированных образцов составили 40 и 53 %. Наблюдения за биомассой ячменя в опытах показали отсутствие положительного воздействия ризосферных бактерий из корневой среды Ячменя короткоостистого. Потери составляли от 50 до более 75%. Как и в предыдущих опытах, бактерии из ризосферы ячменя короткоостистого, вероятнее всего, не являются защитниками от повышенной концентрации соли. Напротив, ризосферные растения из околоразвивающей системы Астры паннонской, проявляют положительное адаптивное воздействие на культурное растение подсолнечник сибирской селекции.

3.4. Анализ летних полевых испытаний

Для испытаний полученных бактерий в естественной среде были использованы два участка. Опыт с ячменем проходил на территории Тюмени в частном доме по улице Зеркальная (приложение 12). Для посева приготовили пророщенные зерна ячменя (сорт Уватский) в которые на два часа залили приготовленный ранее жидкий субстрат бактерий: Я1, Я2, Я3 и Яр (ризосферный штамм). После высевали только проросшие зерна на глубину 4-5см и поливали соленой водой (0,2М). Такие поливы совершали периодически, в зависимости от погодных условий. Контроля была два - делянка с зернами без бактерий поливаемыми пресной водой и делянка с зернами без бактерий поливаемая соленой водой. Фиксировали продуктивную кустистость растений и массу 1000зерен. Общее количество поливов соленой водой составило 5 раз за сезон. Данные о количественных значениях опыта с ячменем можно увидеть на рисунке 5. Получить полноценно достоверную картину отличий не удалось. Только на делянке с зернами,

обработанными штаммом Я2, наблюдали достоверно более низкое значение продуктивной кустистости (5,9) по отношению к остальным. Присутствие эндофитного штамма Яр положительно повлияло на количество формируемых колосьев, но этот факт требует дополнительной проверки. В октябре 2025 года удалось полностью собрать урожай ячменя с делянок и проанализировать массу 1000 зерен (приложение 13). Результаты показали значительное превышение по этому показателю зерновок с бактериями Я1 и Я2 против контроля и с пресной и с соленой водой (16,7 и 13г против 9,3 г соответственно). Эти данные кажутся несколько противоречивыми. В работе Серебренникова Ю.И. [13] масса 1000 зерен у этого сорта отмечается на уровне 49-50грамм. Мы предполагаем, что обильные дожди июля 2025 года спровоцировали сильное полегание подопытных растений и это существенно снизило объективность результатов по показателю размера и массы зерновок. Поэтому, в следующем году эксперимент с ячменём нужно будет повторить.

Испытания с семенами подсолнечника проводили на территории частного хозяйства в Свердловской области. Аналогично ячменю, в фальконы с проросшими семенами на 2 часа добавляли штаммы эндофитных бактерий Ар1, Ар2 и Ар3 в виде жидкой суспензии. Высевали только проросшие семена на глубину 5 см в количестве 25 шт в каждую делянку. Контроль аналогичный опыту с ячменем: полив пресной водой и полив соленой водой семян без обработки бактериями.

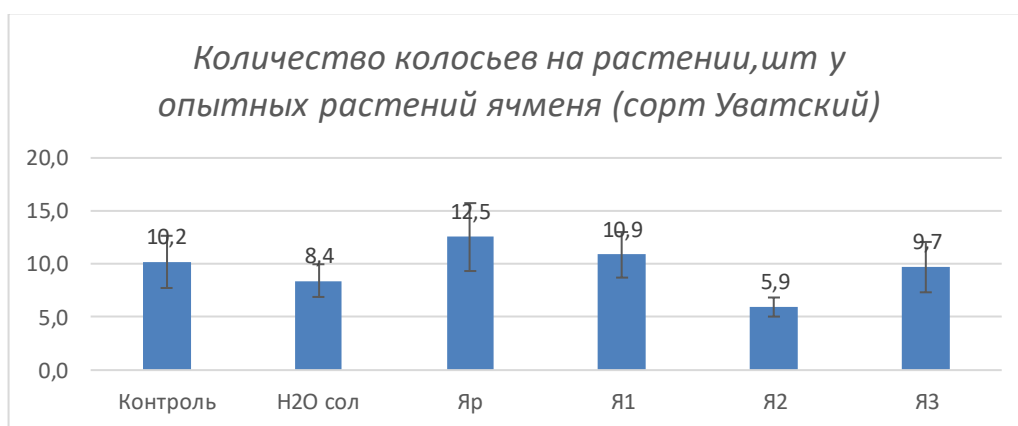


Рис.5. Продуктивная кустистость ячменя (на 03.08.25)

Поливы соленой водой (0,2М) проводились сразу после посева и еще четыре раза за вегетативный период. Фиксировали высоту растений (от корневой шейки до основания корзинки) во время цветения (рисунок 6) и массу 1000 семян. На данный момент полноценных выводов по всем штаммам сделать нам не удалось. Между контрольными делянками и делянкой со штаммом Ар1 статистически значимых различий не обнаружилось. Штаммы Ар2 и Ар3 демонстрируют достоверное отличие от контроля H₂O сол., что даже более важно, чем отличие от контроля с пресной водой. Они также явно положительнее сказываются на росте подсолнечника, чем штамм Ар1.

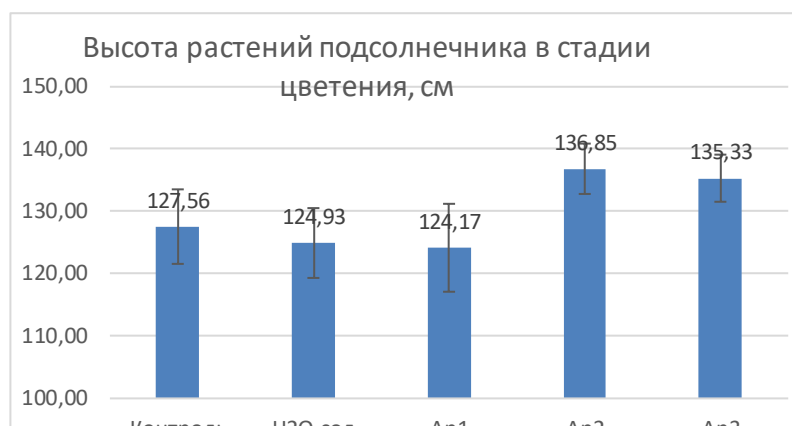


Рис.6. Результаты измерения длины подсолнечника на участке (на 15.08.25)

Учитывая, что штаммы Ap2 и Ap3 разные по форме бактерии (см выше), можно сделать вывод о возможно различном принципе влияния на устойчивость к засолению. В октябре 2025 года нам удалось завершить часть опыта по изучению влияния бактерий на характеристики урожайности. В частности, были получены данные о массе 1000 семян подсолнечника (приложение 14). В контроле с пресной водой масса семян была равна 39,1 г, а в контроле с соленой значительно ниже – 28,3г. Это отчетливо показывает негативное влияние засоления почвы. Из опытных образцов наихудшие показатели у Ap1 (23,1г). Бактерии Ap2 оказали положительный эффект, приблизив массу семян к пресноводному контролю (36,7г). А образец Ap3 показал максимально положительный эффект (47,0г), что на 20% выше контроля с пресной водой и на 66% выше контрольных растений поливаемых соленой водой. Вероятно, полученные нами ранее данные о галофильности именно этого штамма (Ap3), позволяют предположить его позитивное влияние на рост и развитие подсолнечника в условиях засоления. В ноябре 2025 года нам удалось выделить ДНК из бактерии Ap1 с помощью набора HiPure Soil DNA Kit (приложение 15). Полученную ДНК проверили на чистоту в лаборатории антимикробной резистентности и после этого секвенировали ген 16s rPHK на базе лаборатории «Евроген» в г. Москва. По полученной последовательности нуклеотидов с помощью сайта NSBI BLAST мы определили данную эндофитную бактерию как представителя рода *Serratia*.

Выводы:

Проведенные исследования позволили сделать следующие заключения:

1. Из ризосферы и тканей диких галофитов (Ячменя короткоостистого и Астры паннонской) были успешно выделены несколько штаммов ризосферных (5 штаммов) и эндофитных (4 штамма) бактерий. Большинство эндофитных бактерий оказались негалофильными, за исключением одного штамма (Ap3).
2. Ризосферные бактерии, выделенные из двудольного растения (Астры паннонской), продемонстрировали положительный эффект на рост двудольной сельскохозяйственной культуры (подсолнечника сорта «Сибирский 97») в условиях засоления. Они статистически

достоверно увеличили длину гипокотыля и уменьшили потерю биомассы по сравнению с контролем, поливаемым соленой водой.

3. Ризосферные бактерии, выделенные из однодольного галофита (Ячменя короткоостистого), не оказали положительного влияния на устойчивость к засолению у культурного ячменя (сорта «Уватский»). В лабораторных условиях они даже усугубляли негативные эффекты солевого стресса, снижая всхожесть и биомассу растений.
4. Ограниченное влияние на ранних стадиях развития. Ни ризосферные, ни эндофитные бактерии не оказали положительного воздействия на начальные этапы развития растений (всхожесть и развитие проростков) в условиях *in vitro* (в чашках Петри). Это указывает на то, что потенциальный защитный механизм бактерий проявляется на более поздних стадиях онтогенеза растения.
5. Полевые испытания в большинстве случаев не позволили получить однозначных и статистически достоверных результатов для всех штаммов. Однако был выявлен потенциально положительный эффект отдельных эндофитных штаммов (Ар2, Ар3) на рост подсолнечника и ризосферного штамма (Яр) на продуктивность ячменя, что требует повторной проверки и дополнительных исследований. Штамм Ар3 показал улучшение массы 1000 семян подсолнечника на 66% по сравнению с контролем.
6. Проведенное осенью 2025 года выделение ДНК из бактерии Ар1 и секвенирование гена 16s рРНК позволило определить её как представителя рода *Serratia*.

В 2025-26 учебном году планируется продолжение исследований. Собраны образцы другого галофильного растения (Клоповник толстолистный). Из его корневой системы уже удалось извлечь два вида эндофитных бактерий, которые будут задействованы в испытаниях культурных растений семейства Крестоцветные. Со штаммом Ар1 планируется исследование на предмет её возможного влияния на устойчивость к ультрафиолету. Отдельно планируется тщательное исследование бактерий из штамма Ар3. Собрана почва солончака для испытаний различных образцов растений.

Авторы выражают огромную благодарность руководителю кафедры биотехнологии и селекции в растениеводстве Агротехнического института «Северного Зауралья» Першасову Анатолию Юрьевичу и Ваковскому доценту кафедры Фисунову Николаю Владимировичу за любезно предоставленный сортовой семенной материал. Также благодарим сотрудников научной лаборатории антимикробной резистентности X-Bio ТюмГУ за помощь в автоклавировании и приготовлении питательных сред.

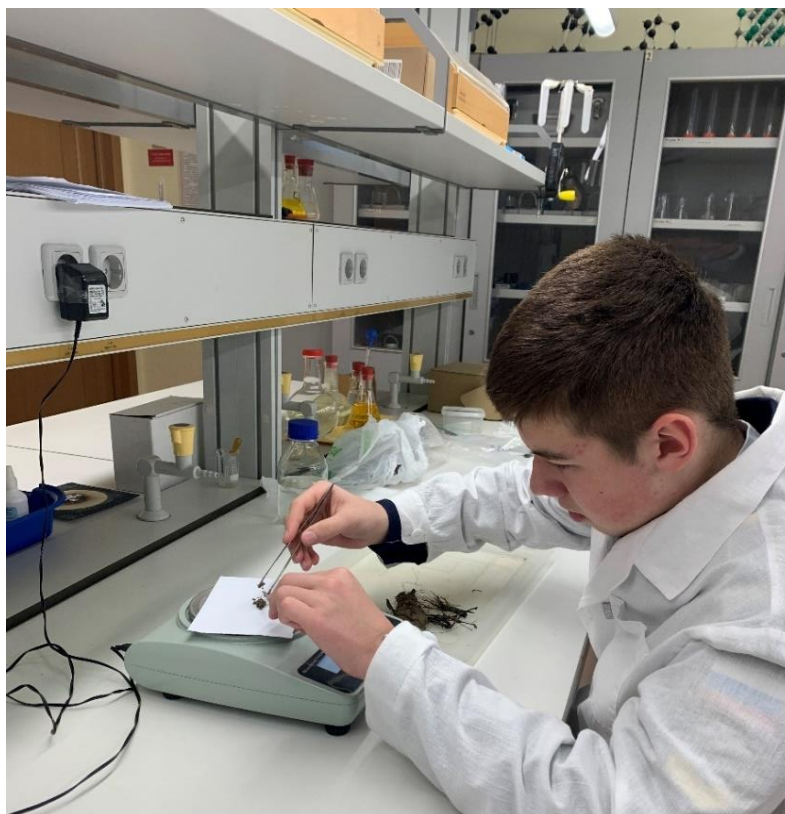
Список источников литературы:

1. Abramak G., Kirtel O., Öner E. T. Fructanogenic halophiles: A new perspective on extremophiles // *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles* / eds. R. Salwan,

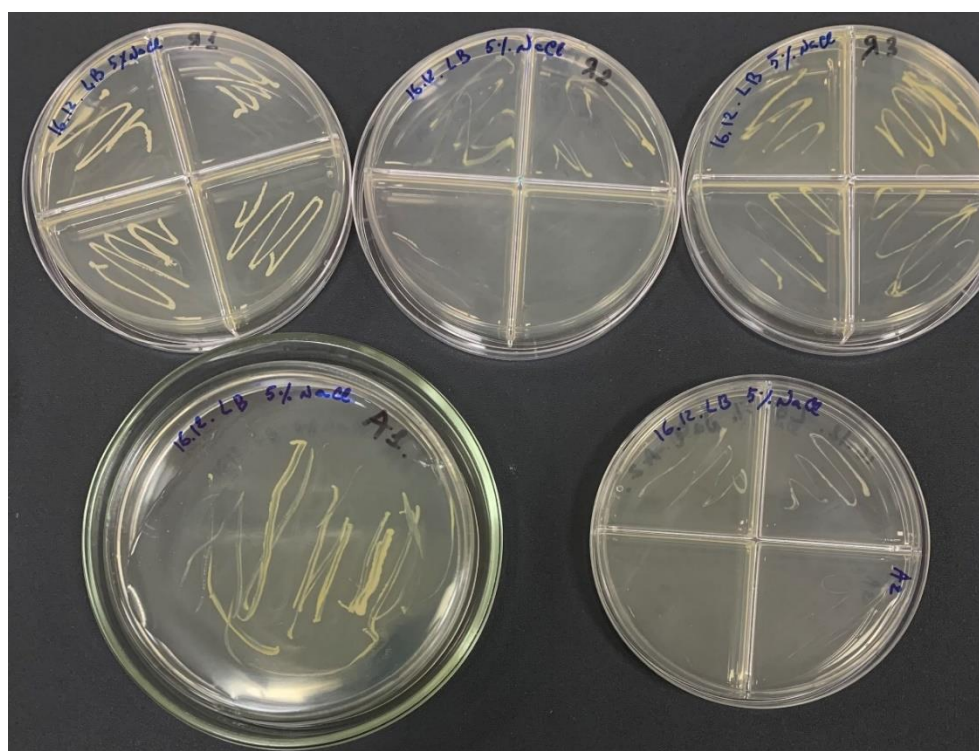
- V. Sharma. London: Academic Press, 2020. P. 123–130. DOI: 10.1016/B978-0-12-818322-9.00009-5. (Электронный ресурс).
2. Kearl J., McNary C., Lowman J. S., Mei C., Aanderud Z. T., Smith S. T., West J., Colton E., Hamson M., Nielsen B. L. Salt-Tolerant Halophyte Rhizosphere Bacteria Stimulate Growth of Alfalfa in Salty Soil // *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. Art. 1849. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01849. (Электронный ресурс).
 3. Orhan F. Potential of halophilic and halotolerant bacteria in accelerating mineralization and improving nitrogen fertilizer efficiency // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016. Vol. 47, № 4. P. 810–814. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.04.001. (Электронный ресурс).
 4. Аликулов Б.С. Механизмы снижения солевого стресса у растений при помощи солеустойчивых бактерий, выделенных из галофитов // *Научное обозрение. Биологические науки*. 2023. № 1. С. 98-104.
 5. Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017 Oct 6;33(11):197. doi: 10.1007/s11274-017-2364-9. PMID: 28986676; PMCID: PMC5686270.
 6. Суярова, Р.А. Галотолерантность и ферментативная активность эндофитов из семян солеустойчивых растений // *Universum: химия и биология: Электрон. научн. журн.* Суярова Р.А. и др., 2023. 12(114). URL: <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/16342> (дата обращения: 01.08.2025).
 7. Трофимов И. Т., Гладков Ю. А., Курсакова В. С., Ельчанинова О. А. Опыт интродукции дикорастущих ячменей на засоленных почвах // *Вестник АГАУ*. 2005. № 3. С. 42-44. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/opyt-introduktsii-dikorastuschih-yachmeney-na-zasolennyh-pochvah> (дата обращения: 13.08.2025).
 8. Bziuk N., Maccario L., Sørensen S. J., Schikora A., Smalla K. Barley Rhizosphere Microbiome Transplantation – A Strategy to Decrease Susceptibility of Barley Grown in Soils With Low Microbial Diversity to Powdery Mildew // *Frontiers in Microbiology*. 2022. Vol. 13. Art. 830905. DOI: 10.3389/fmicb.2022.830905. (Электронный ресурс).
 9. Саранчин Е. П. Астра Паннонская солончаковая (*Trifolium pannonicum*) [Электронный ресурс] // *iNaturalist: наблюдения*. URL: https://www.inaturalist.org/observations?subview=map&taxon_id=170020&user_id=saranchine&verifiable=any (дата обращения: 13.08.2025).
 10. *Trifolium pannonicum* (Jacq.) Dobrocz. // *Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений*. [Электронный ресурс] URL: <https://www.plantarium.ru/page/view/item/39207.html> (дата обращения: 02.01.2025).
 11. Endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Salicornia europaea* L. - community structure and metabolic potential / S. Szymańska, T. Płociniczak, K. Hryniewicz // *Microbiological Research*. – 2016. – Vol. 189. – P. 43–54. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.012> (дата обращения: 11.07.2025). – DOI: 10.1016/j.micres.2016.05.012.
 12. Шахова, О. А. Солеустойчивость сортов ячменя при хлоридном, содовом и сульфатном засолении / О. А. Шахова, Л. И. Якубышина // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета* [Электронный ресурс]. – 2023. – № 4 (102). – С. 61–65. – URL: <https://doi.org/10.37670/2073-0853-2023-102-4-61-65> (дата обращения: 13.08.2025). – DOI: 10.37670/2073-0853-2023-102-4-61-65.

13. Серебренников, Ю. И. Пластичность и стабильность ярового ячменя по урожаю зерна и массе 1000 зёрен / Ю. И. Серебренников // *Агрономия. Вестник НГАУ.* – 2020. – № 2 (55). – С. 50–59.
14. Пузиков, Ю.Н. Испытание сортов подсолнечника в условиях южной лесостепи Западной Сибири / А.Н. Пузиков, Ю.Н. Суворова// *Вестник ОмГА.* – 2016. - № 2 (22). - С.31-37.
15. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. Вып. 2 : Зерновые, крупяные, зернобобовые, кукуруза и кормовые культуры / Гос. комис. по сортоиспытанию с.-х. культур. – М. : [б. и.], 1989. – 195 с.

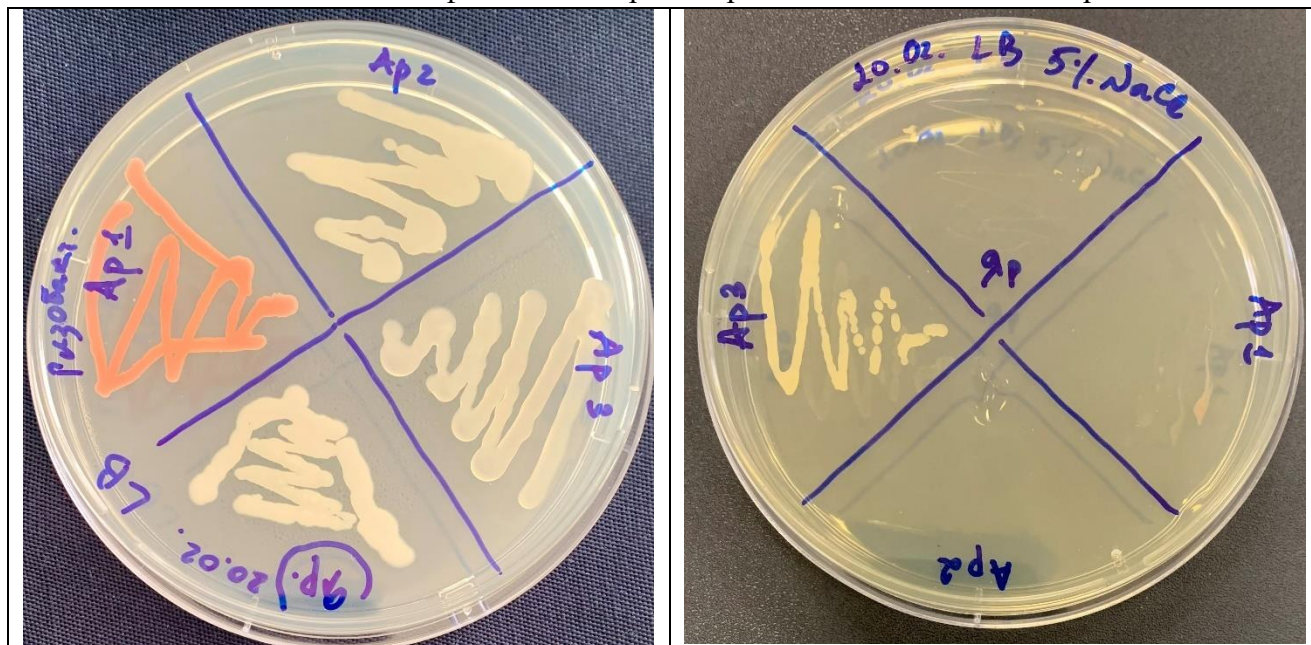
Подготовка ризосферной почвы к высеву бактерий



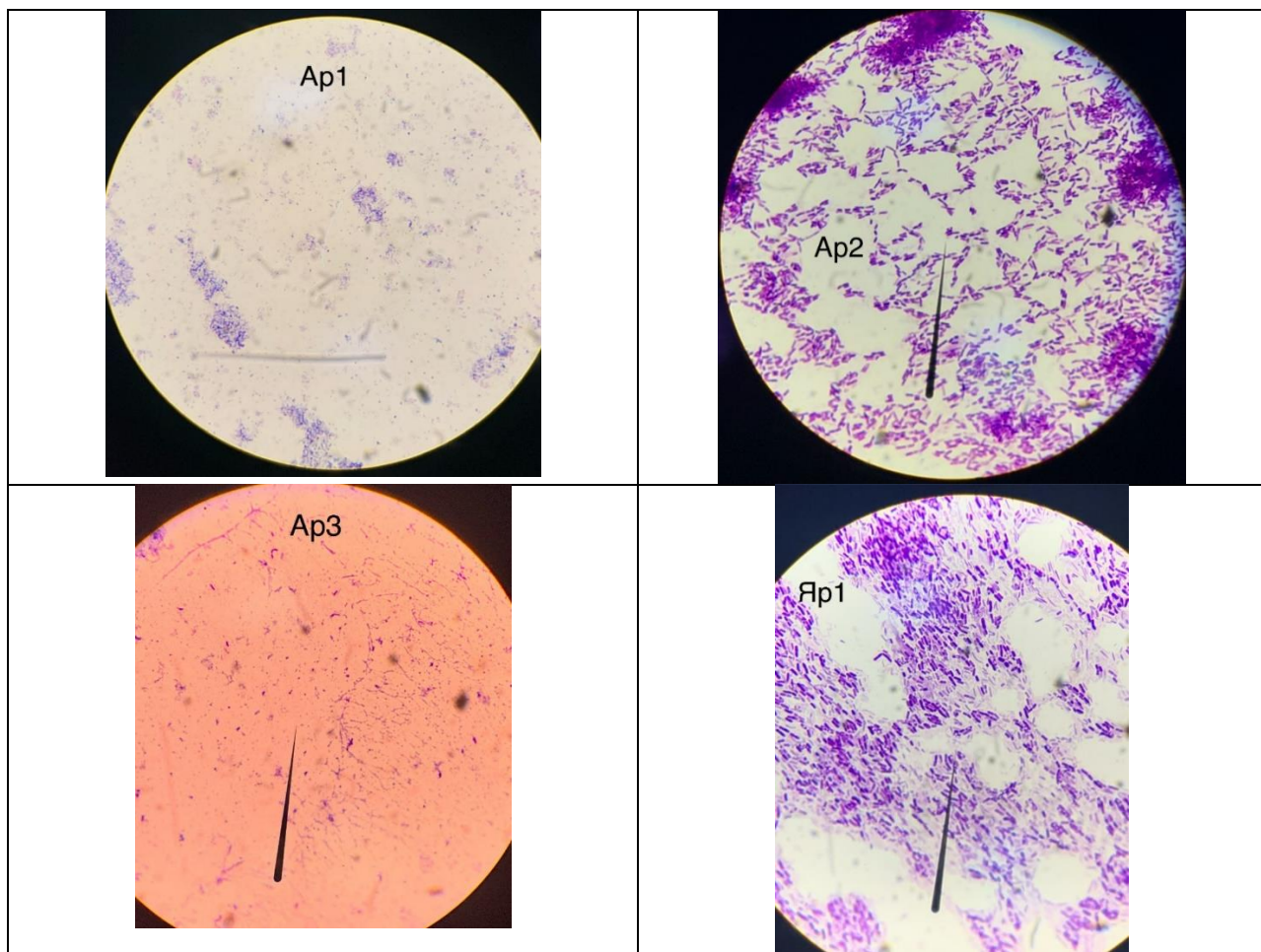
Изоляты штаммов ризосферных бактерий



Развитие эндофитных бактерий на различных по солености средах



Микрофотографии эндофитных бактерий из галофильных растений (x1000)



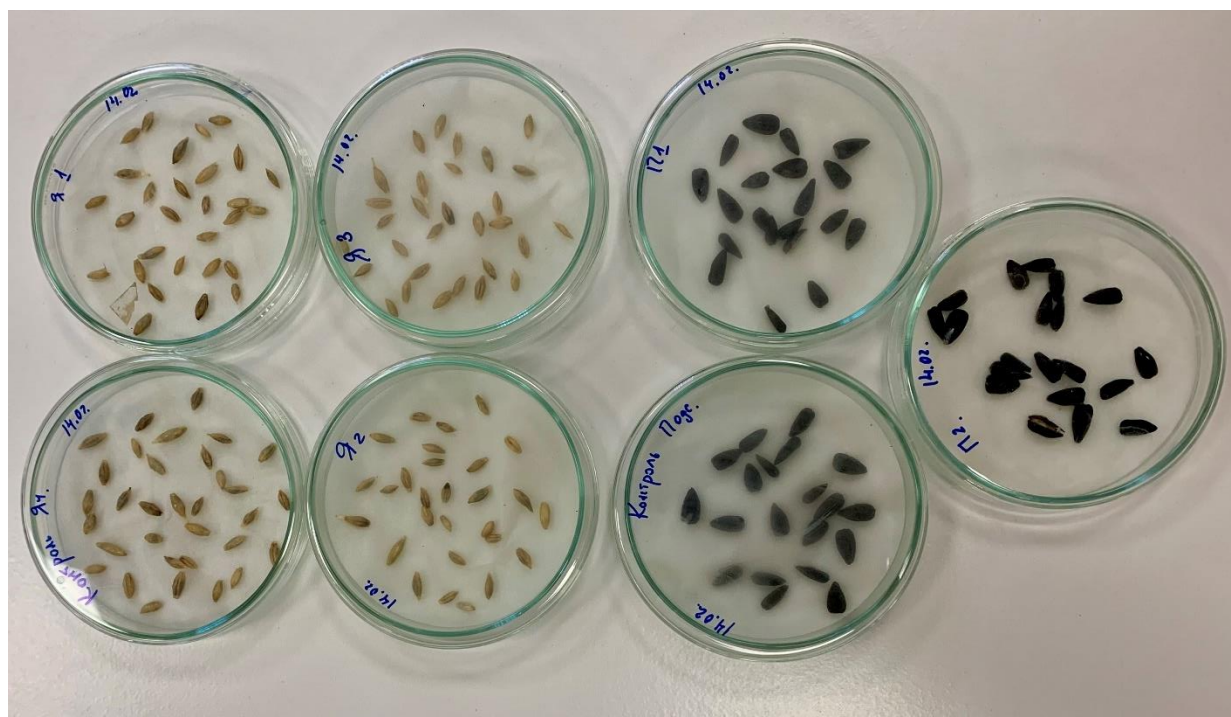
Приложение 5

Опыт на влияние соленой и пресной воды на всхожесть семенного материала



Приложение 6

Опыт с влиянием ризосферных бактерий на первичное развитие растений



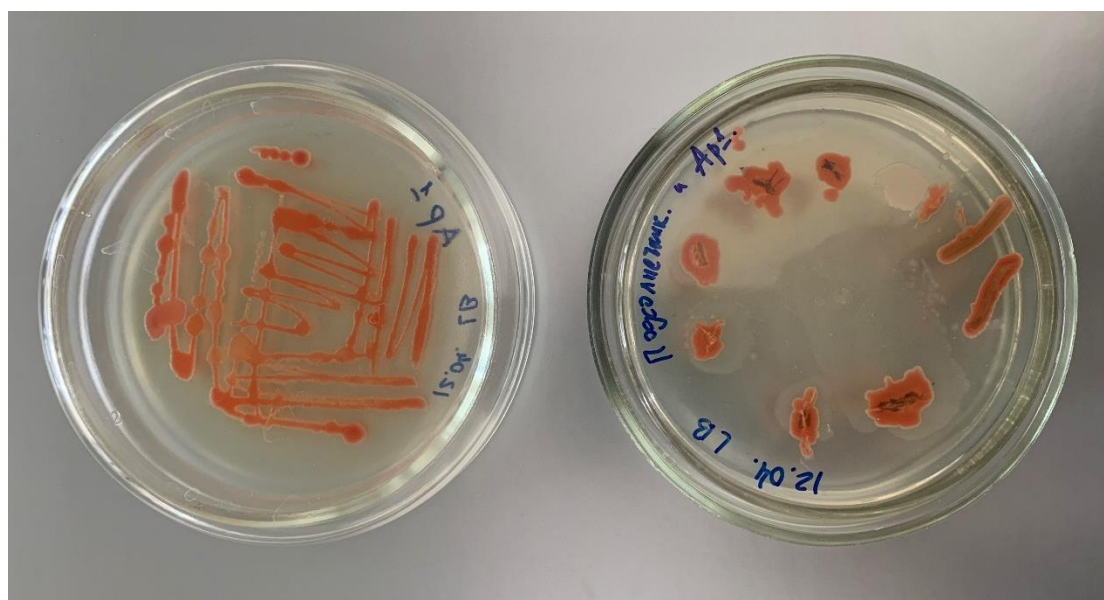
Приложение 7

Размеры корней и развитие корневых волосков на опытных корнях ячменя



Приложение 8

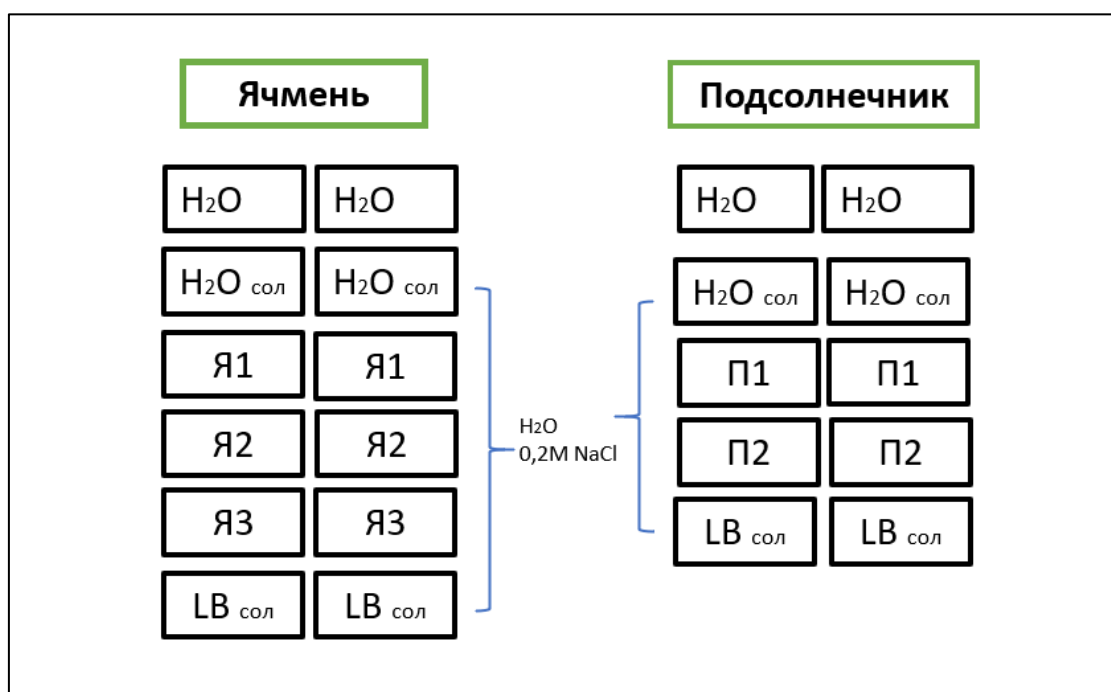
Характерное окрашивание колоний бактерии Ar1. Рост из корней и листьев подсолнечника



Контейнеры с прорастающими побегами ячменя (справа) и подсолнечника



Схема опыта с ризосферными бактериями. П1 и П2 соответствуют А1 и А2.



Растения подсолнечника на 27 день после начала эксперимента



Работа на опытных участках

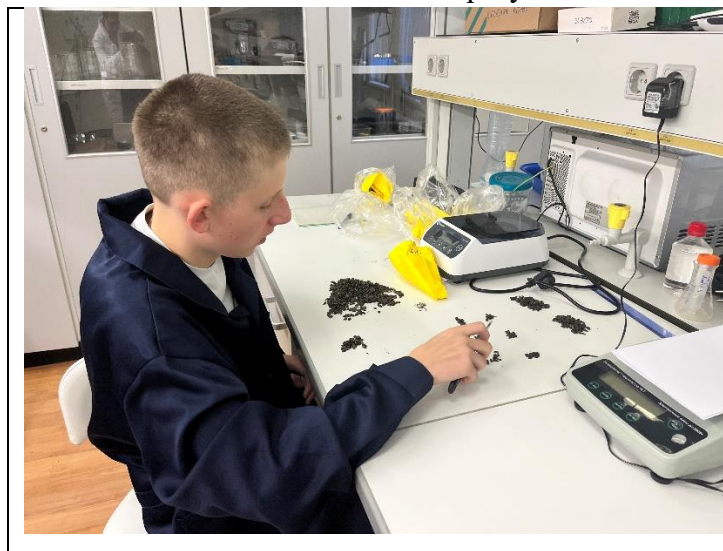


Результаты оценки урожайности ячменя на опытном участке

| ячмень | масса 1000 зерен, г | продуктивная кустистость, шт |
|----------|---------------------|------------------------------|
| Контроль | 9,30 | 11 |
| Конт.сол | 9,30 | 11 |
| Яр | 9,18 | 8 |
| Я1 | 16,70 | 12 |
| Я2 | 13,00 | 12 |
| Я3 | 11,01 | 10 |

Приложение 14

Подсчет и результаты массы 1000 семян подсолнечника



| Образец | Масса 1000 семян,г |
|----------|--------------------|
| Контроль | 39,1 |
| К1 (сол) | 28,3 |
| Ар1 | 23,1 |
| Ар2 | 36,7 |
| Ар3 | 47,0 |

Приложение 15

Набор HiPure Soil DNA Kit

