

УДК 631.811.98:631.559:633.11

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ И ДОЗЫ ПРЕПАРАТА *Bacillus subtilis* 10-4 НА РОСТОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ПРОДУКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

© 2023 г. С. Р. Гарипова^{1,2,**}, Л. И. Пусенкова^{1,*}, О. В. Ласточкина³, К. А. Федорова^{1,3}, М. А. Дедова¹, О. В. Маркова², В. Д. Матюнина², Р. А. Юлдашев³

¹Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН
450059 Уфа, ул. Р. Зорге, 19, Россия

²Уфимский университет науки и технологий
450076 Уфа, ул. З. Валиди, 32, Россия

³Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН
450054 Уфа, просп. Октября, 71, Россия

*E-mail: l.pusenкова@mail.ru

**E-mail: garipovasvetlana@gmail.com

Поступила в редакцию 06.11.2022 г.

После доработки 22.11.2022 г.

Принята к публикации 15.12.2022 г.

Инокуляция семян сельскохозяйственных культур селекционными штаммами ростстимулирующих бактерий является экологичным, низкзатратным способом повышения их урожайности, но может зависеть от некоторых биотехнологических факторов, влияющих на их физиологическую активность. К ним относятся условия культивирования бактерий и доза внесения препарата. В работе анализировали эффективность инокуляции яровой пшеницы сорта Башкирская 28 разными препаратами штамма *Bacillus subtilis* 10-4: 1 — водной суспензией клеток бактерий, смытых с картофельно-глюкозного агара (КГА), 2 — жидкой культурой, содержащей клетки с экзометаболитами, полученной при культивировании бактерий в картофельно-глюкозном отваре (КГО), 3 — жидкой культурой бактериальных клеток, выросших в бобово-глюкозном отваре (БГО). При этом оценивали ростстимулирующий эффект от внесения высокой дозы (10^8 кл./мл) и малой дозы (10^4 – 10^5 кл./мл) бактерий в инокулюме. При сравнении препаратов, полученных с картофельно-глюкозной среды, выявлено, что положительный ростовой эффект (увеличение числа корней растений пшеницы) вызвали только высокая доза клеток препарата в КГА и обе дозы препарата в КГО, но высокая доза препарата в КГО тормозила прорастание семян до 74% (в контроле 100%). При сравнении препаратов, полученных при культивировании бактерий в КГО и БГО, выявлено, что наилучший ростовой эффект (суммарная длина корней и высота побега) был больше контроля у растений, инокулированных малой дозой препарата в КГО и большой дозой препарата в БГО. Стимулирующий эффект малой дозы препарата в БГО был меньше и распространялся только на корневую систему. Результаты лабораторных экспериментов совпали с эффективностью изученных препаратов в полевых условиях. Применение препарата, полученного в БГО и внесенного в дозе 10^8 кл./мл, и препарата, полученного в КГО и внесенного в дозе 10^5 кл./мл, увеличивало урожай зерна в 1.6–1.7 раза при снижении интенсивности листостебельных болезней на 32 и 11% по сравнению с необработанным контролем. Препарат, полученный в БГО и внесенный в малой дозе, не обеспечил ни прибавки урожая, ни защитного эффекта по сравнению с контролем. Обсуждены возможные причины действия препаратов штамма *B. subtilis* 10-4, связанные с продукцией им фитогормонов в зависимости от состава среды, и с различной адаптивной способностью бактерий при культивировании на богатой и менее богатой азотом средах.

Ключевые слова: инокуляция, концентрация бактерий, пшеница, рост, среда культивирования бактерий, урожайность, эндофитные бактерии

DOI: 10.31857/S0002188123030055, EDN: KNPCCF

ВВЕДЕНИЕ

Применение рост-стимулирующих бактерий (*PGPB*) для повышения стрессоустойчивости и

продуктивности растений пшеницы является сложившейся практикой агробиотехнологии. Особое место среди микробных препаратов зани-

мают средства на основе эндофитных бактерий, которые колонизируют внутренние ткани растений, оказывая на растение-хозяина иммуномодулирующее и стресспротекторное действие [1]. Вклад PGPB в эти процессы связан с их способностью к синтезу веществ с антибиотической активностью, биосурфактантов, сидерофоров, хелаторов, фитогормонов, с участием в реакциях, индуцирующих системную устойчивость растений к заболеваниям и толерантности к абиотическим стрессам [2–4]. Инокуляция эндофитными бактериями может способствовать повышению урожая пшеницы до 43% за счет снижения болезней, увеличения всхожести, выживаемости, улучшению структурных показателей продуктивности растений [5].

Спорообразующие бактерии рода *Bacillus* удобны для защиты растений и стимуляции их роста. Эти бактерии могут быть использованы как протравители посевного зерна с целью профилактики болезней и увеличения всхожести, так и для подавления болезней во время вегетативной фазы роста растений. Они обладают, с одной стороны, высокой выживаемостью спор в неблагоприятных условиях, с другой стороны — способностью к активному росту и синтезу разнообразных физиологически активных соединений [6].

Одним из перспективных эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* является штамм 10-4, который в полевых экспериментах по инокуляции сахарной свеклы [7], картофеля [8], фасоли [9, 10] оказывал положительное влияние на урожай определенных культур и их устойчивость к болезням. Взаимодействие штамма *B. subtilis* 10-4 с растениями пшеницы было ранее исследовано только в лабораторных условиях: при моделировании комбинации засухи и поражения фузариозными (*Fusarium culmorum*) корневыми гнилями на сорте Омская 35 [11], при моделировании засухи на устойчивом и чувствительном к дефициту влаги сортах Экада 70 и Салават Юлаев [12, 13], а также в условиях засоления на сорте Башкирская 26 [14]. В этих экспериментах было продемонстрировано стресспротекторное действие штамма, связанное с его способностью повышать активность антиоксидантных ферментов, снижать уровень развития окислительного стресса и укреплять клеточные стенки растений, повышая их барьерные свойства. Взаимодействие штамма *B. subtilis* 10-4 с сортом яровой пшеницы Башкирская 28 изучено впервые.

Сорт мягкой яровой пшеницы Башкирская 28 был получен индивидуальным отбором из гибридной популяции от скрещивания сортов Омская 20 и Приокская, который в 2005–2007 гг. по

ряду хозяйственных признаков превзошел эталонный сорт Омская 35 [15]. Растения этого сорта формировали более высокий урожай и более крупное зерно и по сравнению с эталонным сортом Симбирцит в условиях дерново-подзолистой почвы в 2011–2012 гг. [16]. В лабораторных условиях растения сорта Башкирская 28 по сравнению с сортом Омская 35 отличались повышенной транспирацией и гидравлической проводимостью как в стрессовых, так и нормальных условиях [17]. В условиях имитации засухи этот сорт формировал максимальное количество проростков в фенофазе кущения и был отнесен к засухоустойчивым генотипам, при этом лабораторная всхожесть зрелых зерновок составила 70% [18].

Известно, что генотип сорта влияет на видовой состав эндофитов [19] и способность к эффективному взаимодействию с сигнальными факторами ассоциированных с ними микроорганизмов [20]. Это обуславливает различную видовую и сортовую отзывчивость растений на бактериальную инокуляцию как эндофитными [21, 22], так и ризосферными рост-стимулирующими бактериями [23]. Имеет значение и природа действующего вещества препарата: биомасса отделенных от культуральной жидкости бактериальных клеток или жидкая культура бактерий вкуче с их метаболитами, или только экзометаболиты бактерий оказывают стимулирующий эффект [24, 25]. Определенный вклад в степень проявления рострегулирующего или биоконтрольного эффекта бактерий может вносить состав культуральной среды [26, 27]. Его влияние может распространяться на удлинение экспоненциальной фазы роста, на конечное количество жизнеспособных клеток и активность синтеза физиологически активных веществ [28]. Понимание конкретных параметров роста и физиологии штамма для оптимизации функциональности инокулянта позволяет достигнуть снижения производственных затрат за счет замены богатых лабораторных сред менее богатыми средами [29]. Важна при этом сопоставимость результатов эффективности препаратов разной рецептуры и доз внесения инокулянта при проведении опытов в лабораторных и полевых условиях [30, 31].

Цель работы — анализ влияния состава питательной среды для культивирования бактерий *B. subtilis* 10-4 и дозы внесения препарата на ростовые характеристики пшеницы сорта Башкирская 28 в лабораторных условиях, а также продуктивность и устойчивость к болезням растений в полевых условиях.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были семена и растения сорта яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Башкирская 28, внесенного в Государственный реестр сортов сельскохозяйственных культур, допущенных к использованию в Республике Башкортостан и Уральском районе в 2016 г. Семена были получены в Чишминском селекционном центре по растениеводству Республики Башкортостан и предоставлены В.И. Никоновым. Штамм *Bacillus subtilis* 10-4 (ВКПМ № 12988) взят из коллекции Башкирского НИИСХ УФИЦ РАН.

Среды готовили согласно руководству [32]. Для получения картофельно-глюкозного отвара (КГО) 200 г очищенного мелконарезанного картофеля заливали 1 л водопроводной воды и кипятили 30 минут. Отфильтрованный отвар доливали до литра, добавляли глюкозу 10 г/л и стерилизовали 30 мин при 1.5 ати. Для получения картофельно-глюкозного агара (КГА) в эту среду добавляли 2% агара. Для получения бобово-глюкозного отвара (БГО) 50 г гороха заливали 1 л воды, варили 30 мин, затем фильтровали, доводили до 1 л, добавляли 10 г глюкозы и автоклавировали 30 мин при 1.5 ати. Выращивание бактерий на агаровых скосах (КГА) проводили в пробирках, инкубировали в термостате при 28°C 72 ч. Культивирование жидкой культуры бактерий на КГО и БГО проводили в колбах Эрленмейера в термостатируемом на водяной бане шейкере (Water bath shaker clpnn type 357, Labawa Poland) при температуре 30°C в течение 72 ч.

Модельную концентрацию бактерий (10^9 кл./мл) создавали по стандарту мутности Тарасевича, заданную плотность клеток бактерий (10^4 – 10^5 и 10^8 кл./мл) получали методом 10-кратных разведений. Гомогенность промежуточных разведений суспензии обеспечивали с помощью прибора Multi-Vortex V-32 (BioSan, Латвия). Контроль концентраций бактериальных клеток в инокулюме проводили путем их прямого подсчета в камере Горяева. Для инокуляции на 2 г (50 семян) вносили 20 мкл бактериальной суспензии в заданной плотности (объем 20 мкл включал рабочий опытный раствор), контроль обрабатывали эквивалентным количеством воды. Семена встряхивали в закрытой чашке Петри в течение 3–5 мин для равномерного распределения инокулюма по их поверхности, раскладывали на влажные фильтры и инкубировали при 22–24°C в темноте. Инокуляцию семян для полевых экспериментов проводили аналогично, задавая необходимую плотность бактерий в препарате методом кратных раз-

ведений, и вносили препарат из расчета 10 л/т семян, включающий рабочий раствор. Испытывали разные формы препаратов: 1 — биомассу бактерий, смытую с твердой питательной среды картофельно-глюкозного агара (КГА) — препарат содержал преимущественно споры бактерий; 2 — жидкую культуру бактерий высокого титра (10^{10} кл./мл), выращенную на картофельно-глюкозном отваре (КГО), содержащую как споры, так и экзометаболиты бактерий; 3 — жидкую культуру бактерий с титром 10^9 кл./мл, выращенную на бобово-глюкозном отваре (БГО), содержащую клетки бактерий, их метаболиты и остатки питательной среды.

Двойной бумажный фильтр укладывали на дно чашки Петри, увлажняли 5 мл воды и раскладывали по 2 г (50–52 зерновки) обработанных семян на равном расстоянии друг от друга в 2-х повторностях. Инкубировали в термостате 3-е сут при температуре 25°C. У 3-суточных проростков измеряли длину побега, суммарную длину всех корней, количество корней, количество проростков.

Полевые эксперименты проводили в 2020 г. на полях Чишминского селекционного центра по растениеводству (Предуральская степная зона Республики Башкортостан). Почва опытного участка — чернозем выщелоченный среднесуглинистый. Содержание гумуса в пахотном слое — 7.4%, pH 6.3. Гидротермический коэффициент (ГТК) этого периода находился в пределах 0.81–1.07, что характеризует климатические условия сезона как умеренно засушливые. Посев проводили механизированно. Закладку полевых опытов, а также учеты и наблюдения осуществляли согласно Методике государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур (1985 г.). Оценку устойчивости к основным болезням проводили, руководствуясь Методическим руководством по учету болезней сельскохозяйственных культур (1985 г.). Площадь делянок 15 м², повторность опыта четырехкратная. Структуру урожая учитывали на площади 1.5 м². Данные статистически обработаны с помощью программы Microsoft Excel. В таблицах представлены средние арифметические. Достоверные различия при $p < 0.05$, определенные по t -критерию Стьюдента, обозначали разными буквами в индексах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение доз и форм препаратов может оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее действие на рост растения. Для оценки этого эффекта семена пшеницы инокулировали бактери-

Таблица 1. Влияние водно-суспензионной и жидко-культуральной форм препаратов *B. subtilis* 10-4 в разных дозах инокуляции на ростовые параметры 3-суточных проростков пшеницы

Форма препарата	Число бактерий в инокулюме, кл./мл	Длина побега, мм	Суммарная длина корней, мм	Число корней, шт./проросток	Энергия прорастания, %
Без обработки	—	22.4 ^a	140 ^a	3.86 ^a	100
Водная суспензия бактерий в КГА	10 ⁴	22.0 ^a	140 ^a	3.96 ^a	94 ^a
	10 ⁸	23.1 ^a	144 ^a	4.30 ^b	92 ^a
Жидкая культура бактерий в КГО	10 ⁴	23.1 ^a	161 ^b	4.33 ^b	96 ^a
	10 ⁸	23.9 ^a	153 ^a	4.19 ^b	74 ^b

Примечание. КГА — картофельно-глюкозный агар, КГО — картофельно-глюкозный отвар, разными буквами индекса обозначены различающиеся средние величины при $p < 0.05$. То же в табл. 2.

ями *B. subtilis* 10-4 в малой (10⁴ кл./мл) и в высокой (10⁸ кл./мл) дозах и в разных формах препарата: водно-суспензионной (смыв клеток бактерий с твердой среды) и жидкой (клетки бактерий с экзометаболитами) культуре. Обработка семян водной суспензией бактерий, выросших на твердой среде КГА, стимулировала увеличение числа корней (на 11%) при внесении препарата в высокой дозе, оставаясь на уровне контроля в малой дозе. Обработка семян клетками штамма вместе с культуральной жидкостью, полученной в КГО, способствовала увеличению числа корней (на 12%) при внесении в обеих дозах. При этом препарат в малой дозе увеличивал на 15% и суммарную длину корней. Высокая доза препарата ингибировала процесс прорастания семян (табл. 1).

Негативное влияние больших доз (10⁹ кл./мл) препаратов *B. subtilis* 26Д и 11ВМ на рост корней и побегов было выявлено в экспериментах с сортами пшеницы Волжская качественная (озимая) и Казахстанская (яровая), тогда как инокуляция их малой дозой бактерий (10⁵–10⁶ кл./мл) вызывала стимулирующий эффект [22].

Различия действия бактерий в водной суспензии и их в жидкой культуре могло быть связано с содержанием фитогормонов в экзометаболитах. Известно, что штамм *B. subtilis* 10-4 продуцировал индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) в концентрации 5.8 мг/л при выращивании на питательной среде LB [14]. В водно-суспензионной форме концентрация гормонов, возможно, была меньше, т.к. часть их могла диффундировать в агар, поэтому оптимальная концентрация достигалась,

возможно, только в препарате с высокой плотностью клеток в инокулюме. Культивирование бактерий в жидкой культуре, вероятно, обуславливало более насыщенную концентрацию фитогормонов в экзометаболитах бактерий за счет высвобождения их в культуральную среду. Не исключено, что именно поэтому малая доза сильнее стимулировала рост проростков пшеницы по сравнению с высокой дозой препарата, в которой концентрация гормона могла превышать оптимальный уровень.

Благоприятный уровень влияния экзогенных ауксинов на рост растений может быть очень узким [33]. На примере взаимодействия экзогенной ИУК с растениями гороха было экспериментально показано торможение роста растений гороха при превышении выявленного порогового уровня ИУК 2 мкг/мл [34]. Мутантный штамм *P. putida* GR12-2/aux1 с продукцией ИУК, в 4 раза превышавшей уровень активности дикого штамма, потерял способность усиливать рост корней проростков канолы в гнотобиотических условиях [35]. Инокуляция растений гвоздики ИУК-продуцирующими бактериями *Klebsiella* SGM81 только в дозах от 10² до 10⁵ КОЕ/мл приводила к фенотипу улучшенного роста корней, тогда как внесение бактерий в дозе 10⁸ КОЕ/мл ухудшали показатели роста корней [36]. Обработка семян нута ИУК-продуцирующими штаммами псевдомонад в высокой дозе приводила к угнетению роста растений так же, как и экзогенная обработка ИУК в концентрации 10 мкМ по сравнению с меньшими концентрациями — 0.5 и 1 мкМ ИУК, которые стимулировали рост корней [37]. При

Таблица 2. Влияние препаратов *B. subtilis* 10-4, полученных при культивировании в жидкой культуре на разных средах, на рост 3-суточных проростков пшеницы

Форма препарата	Число бактерий в инокулюме, кл./мл	Длина побега, мм	Суммарная длина корней, мм	Число корней, шт./проросток	Энергия прорастания, %
Без обработки		22.2 ^a	127 ^a	4.2 ^a	100 ^a
КГО	10 ⁵	27.3 ^b	157 ^c	4.6 ^b	92 ^a
БГО	10 ⁵	24.8 ^a	139 ^b	4.5 ^b	92 ^a
БГО	10 ⁸	28.1 ^b	150 ^c	4.2 ^a	90 ^a

изучении продукции ИУК бактериальными эндофитами корней *Brassica rapa* было выявлено, что конечная концентрация фитогормона напрямую зависела от содержания триптофана в питательной среде и продолжительности культивирования [38]. В экспериментах с *Pantoea* sp. IB-BF было показано, что в зависимости от присутствия белкового компонента (триптон, пептон или дрожжевой экстракт) и условий пониженного содержания азота при повышенном отношении С : N (картофельно-глюкозная среда) содержание ауксина и каротина варьировало от 2 до 21 мкг/мл и от 0.06 до 0.172 ОП₄₆₁/мг сухой биомассы соответственно, при этом в присутствии триптофана 100 мкг/мл зафиксировано достоверное увеличение выхода ИУК на 18% больше по сравнению с уровнем ауксина на среде без триптофана, а секреция каротина существенно возрастала в условиях пониженного содержания азота и повышенного отношения С : N (картофельно-глюкозная среда) [26]. Эти факты свидетельствовали о необходимости прецизионно подбирать дозы внесения бактерий, продуцирующих фитогормоны, а также условия культивирования, способствующие выработке определенного количества фитогормона в среде.

Помимо КГО, традиционной питательной среды для роста бактерий рода *Bacillus*, БГО также используют для культивирования многих видов бактерий [32]. Поэтому был проведен модельный опыт по влиянию на рост корней пшеницы высокой (10⁸ кл./мл) и малой (10⁵ кл./мл) доз препарата *B. subtilis* 10-4, полученного в БГО в сравнении с препаратом в КГО в малой дозе (10⁵ кл./мл) (табл. 2). Все варианты обработок обеспечили увеличение суммарной длины корней 3-суточных проростков пшеницы на 9–23%. Препарат, полученный при выращивании бактерий в БГО и внесенный в большой дозе, оказал такой же эффект

на увеличение суммарной длины корней, как и препарат в КГО в малой дозе. Эти 2 варианта препаратов способствовали также стимуляции роста побега на 23–27%. Малая доза препаратов бактерий, выращенных на обеих средах, стимулировала формирование большего числа корней. Можно предположить, что большая стимуляция роста растений пшеницы при обработке препаратом с высокой плотностью клеток, полученном в богатом аминокислотами БГО, могла быть связана с более высоким уровнем продуцируемых бактериями ауксинов. И, по-видимому, именно такой уровень ИУК соответствовал оптимальной концентрации, которая была получена также и при разбавлении на 3 порядка культуральной среды с бактериями, выращенными в КГО. Более концентрированная доза препарата в КГО (10⁸ кл./мл) угнетала прорастание семян.

Остается невыясненным вопрос, почему при культивировании бактерий в КГО обеспечивалась такая концентрации фитогормонов или других физиологически активных веществ, которые оказывали стимулирующий рост растений эффект при сильном разбавлении? Возможно, недостаток легкодоступного азота в КГО ускорял выход бактерий в споры, что уплотняло клеточную массу бактерий до титра 10¹⁰ кл./мл и создавало возможности для большей концентрации гормона в окружающей среде за счет уменьшения объема клеток. В препарате в БГО, несмотря на такой же 3-суточный срок культивирования, наряду со спорами была высока доля вегетативных клеток, поэтому их плотность в препарате составляла >10⁹ кл./мл.

В обедненной азотом среде бактерии могли усиливать накопление гормона и внутри клеток в качестве преадаптации к переживанию стресса. На такую мысль наводят данные экспериментов с

Таблица 3. Влияние препаратов штамма *B. subtilis* 10-4, приготовленных на разных средах и внесенных в разных дозах, на структуру урожая пшеницы (полевой опыт)

Вариант обработки	Высота растений, см	Число продуктивных стеблей, шт.	Длина колоса, см		Число семян, шт.	Масса, г	
			средняя	суммарная		семян с растения	1000 семян
Контроль	95.1 ^a	1.03 ^a	6.23 ^a	6.37 ^a	19.3 ^a	0.63 ^a	34.1 ^a
КГО 10 ⁵	99.2 ^a	1.37 ^b	6.58 ^a	8.87 ^b	27.4 ^c	1.01 ^b	33.6 ^a
БГО 10 ⁵	83.8 ^b	1.13 ^a	5.42 ^b	5.97 ^a	16.3 ^b	0.59 ^a	33.1 ^b
БГО 10 ⁸	108.5 ^c	1.97 ^c	6.97 ^c	13.5 ^c	37.3 ^d	1.30 ^c	36.3 ^c

Примечание. 10⁵ и 10⁸ – дозы внесения препарата, кл./мл. То же в табл. 4.

Таблица 4. Влияние предпосевной обработки семян разными дозами препаратов *B. subtilis* 10-4, полученными при культивировании в КГО и БГО, на урожайность пшеницы

Вариант обработки	Урожайность, ц/га <i>HCP</i> ₀₅ = 4.5	Прибавка, ц/га	Прибавка к контролю, %
Контроль	24.3 ^a		
КГО 10 ⁵	41.9 ^b	17.6	72.4
БГО 10 ⁵	25.2 ^a	0.9	3.7
БГО 10 ⁸	38.5 ^b	14.2	58.4

Escherichia coli, в которых показано, что перед выходом кривой популяционного роста на плато при снижении концентрации экзогенной глюкозы бактерии кратковременно (10–15 мин) накапливали ~60 мМ связанных с клеткой индолы, в 10 раз превышающие содержание их во внешней среде. Таким образом, бактериальная популяция сэкономила ресурсы задолго до их реального истощения, а клетки бактерий служили депо запасных веществ для последующего активного роста популяции [39]. Не исключено также и то, что ограниченность питания повышала устойчивость бактерий к различным стрессам окружающей среды. Замечено, что по сравнению с родительскими формами, выросшими при нормальном обеспечении питанием, адаптированные к условиям “голодания” меченые по резистентности к рифампицину производные штамма 2С8 характеризовались улучшенной способностью к колонизации ризосферы яблони, что сопровождалось одновременно усилением функций биоконтроля корневой гнили, вызванной *Rhizoctonia* [27].

Для проверки сопоставимости ростостимулирующей способности бактерий в лабораторных условиях с эффективностью соответствующих

препаратов в полевых условиях был заложен полевой опыт. В полевых условиях максимальная продуктивность зерна была обеспечена при обработке препаратом, полученном при культивировании в БГО при внесении в дозе 10⁸ кл./мл: растения существенно отличались от контроля по высоте (на 14%), числу продуктивных стеблей (на 91%), по средней и суммарной длине колоса (на 12 и на 111% соответственно), по числу семян (на 93%), массе семян с растения (на 106%) и массе 1000 семян (на 6%). Следует отметить, что малая доза (10⁵ кл./мл) препарата, полученного в КГО, показала такую же высокую эффективность: по сравнению с контролем увеличилось число продуктивных стеблей (на 33%), суммарная масса колоса (на 39%), число семян (на 42%) и масса семян с растения (на 60%). Малая доза препарата, полученного при культивировании бактерий в БГО, снижала рост растений в высоту, среднюю длину колоса и число семян в колосе, не привела к достоверным отличиям массы семян с растения по сравнению с контролем (табл. 3).

Данные структурного анализа урожая пшеницы хорошо совпали с результатами сбора урожая комбайном (табл. 4). Препарат, полученный в

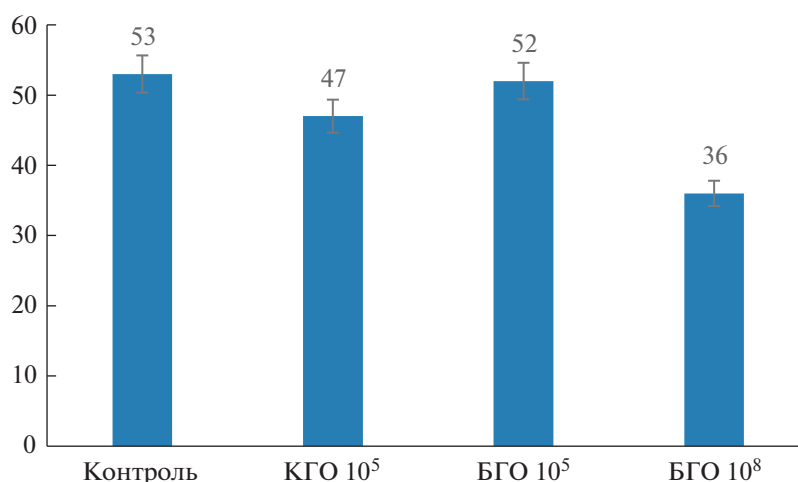


Рис. 1. Интенсивность поражения (%) пшеницы листостебельными болезнями при инокуляции разными биопрепаратами *B. subtilis* 10-4, полученными при выращивании бактерий на средах КГО и БГО и внесенных в разных дозах.

БГО и внесенный в малой дозе, не привел к увеличению урожая по сравнению с контролем. При этом малая доза препарата в КГО и большая доза препарата в БГО обеспечили прибавки урожая зерна более, чем в 1.5 раза.

Анализ фитопатологического состояния посева пшеницы в фазе начала формирования урожая показал, что 100% растений были поражены листостебельными болезнями, при этом интенсивность поражения различалась в вариантах (рис. 1). В вариантах обработки препаратом, полученным в БГО и внесенным в малой дозе, защитный эффект не выявился, тогда как при внесении его в высокой дозе степень поражения болезнями снизилась на 32%. Защитное действие препарата, полученного в КГО и внесенного в малой дозе, было меньшим — снижение интенсивности развития болезней по сравнению с контролем составило 11%. Таким образом, высокая продуктивность растений при обработке препаратами *B. subtilis* 10-4 в БГО в дозе 10⁸ кл./мл и в КГО в дозе 10⁵ кл./мл формировалась не только за счет стимуляции роста растений, но и в результате защиты от болезней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полезные для растений бактерии могут сократить объемы использования агрохимикатов и повысить урожайность и устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессам. Однако, несмотря на положительные результаты, по-прежнему существуют проблемы, связанные с сопоставимым действием препаратов в лабораторных и полевых условиях, а также с правильной ре-

цептурой препаратов, включая эффективные микробные комбинации и другие факторы. Одним из факторов неопределенности является непредсказуемый состав метаболитов, прежде всего фитогормонов, которые накапливаются в среде культивирования бактерий и оказывают разнонаправленное действие на рост растений в зависимости от дозы внесения препарата. Для каждого вида и даже сорта растений оптимумы различаются, что обуславливает необходимость индивидуального определения препаративных форм бактерий. В связи с этим рост и урожай пшеницы сорта Башкирская 28 были оценены в зависимости от использования препаратов штамма *B. subtilis* 10-4, полученных при культивировании на богатой и бедной азотом натуральных средах и внесенных в разных дозах.

Натуральные среды — картофельный и бобовый отвары — отличаются от синтетических сред дешевизной и возможностью использования их при утилизации отходов пищевых производств. Обе среды содержали одинаковое количество глюкозы, но отличались по соотношению C:N. Неожиданным и многообещающим явился эффект стимуляции роста растений при инокуляции низкой дозой бактерий, которые культивировали на картофельной среде, тогда как бобовая среда создавала условия для проявления аналогичной рост-стимулирующей активности бактерий при инокуляции в высокой дозе. Сопоставимость ростовых реакций 3-суточных инокулированных проростков пшеницы с результатами полевых испытаний позволила констатировать успешность примененного метода диагностики эффективности препарата. Эквивалентный ре-

зультат урожайности пшеницы при применении малой дозы препарата, полученного в картофельной среде, и высокой дозы препарата, полученного в бобовой среде, дает обоснование для выбора экономичной и эффективной среды для культивирования бактерий и дозы внесения биопрепарата. Результаты проведенных экспериментов показали, что не только доза бактериальных клеток, но и состав питательной среды для культивирования бактерий может оказывать значимое влияние на эффективность препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oukala N., Aissat K., Pastor V. Bacterial endophytes: The hidden actor in plant immune responses against biotic stress // *Plants*. 2021. V. 10. P. 1012. DOI: [org/https://doi.org/10.3390/plants10051012](https://doi.org/10.3390/plants10051012)
2. Maksimov I.V., Maksimova T.I., Sarvarova E.R., Blagova E.K., Popov V.O. Endophytic bacteria as effective agents of new-generation biopesticides (review) // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. V. 54. № 2. P. 128–140. <https://doi.org/10.1134/S0003683818020072>
3. Lastochkina O.V., Aliniaiefard S., Seifikalhor M., Yuldashev R., Pusenкова Л.И., Гарипова С.Р. Plant growth-promoting bacteria: biotic strategy to cope with abiotic stresses in wheat // *Wheat production in changing environments. Responses, adaptation and tolerance* / Eds. M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M.A. Hossain. Singapore: Springer, 2019. P. 579–614. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6883-7_23
4. Ласточкина О.В. Адаптация и устойчивость растений пшеницы к засухе, опосредованная природными регуляторами роста *Bacillus* spp.: механизмы реализации и практическая значимость (обзор) // *Сел.-хоз. биол.* 2021. Т. 56. № 5. С. 843–867. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.5.843rus>
5. Пусенкова Л.И., Гарипова С.Р., Ласточкина О.В., Юлдашев Р.А. Эффективность инокуляции семян яровой пшеницы эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* 26Д // *Пробл. агрохим. и экол.* 2020. № 3. С. 56–64. <https://doi.org/10.26178/AE.2020.19.55.005>
6. Азизбекян Р.Р. Использование спорообразующих бактерий в качестве биологических средств защиты растений // *Биотехнология*. 2013. № 1. С. 69–77.
7. Ласточкина О.В., Пусенкова Л.И., Юлдашев Р.А., Ильясова Е.Ю., Aliniaiefard S. Физиолого-биохимические ответы растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), зараженных грибом *Alternaria alternata*, на применение микробных препаратов на основе *Bacillus subtilis* // *Сел.-хоз. биол.* 2018. Т. 53. № 5. С. 958–968. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.5.958rus>
8. Пусенкова Л.И., Гарипова С.Р., Ласточкина О.В., Федорова К.А., Мардалини И.С. Влияние эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* на урожай, качество клубней и послеуборочные болезни картофеля // *Агрохим. вестн.* 2021. № 5. С. 73–79. <https://doi.org/10.24412/1029-2551-2021-5-013>
9. Гарипова С.Р., Шаяхметова А.С., Ласточкина О.В., Федорова К.А., Пусенкова Л.И. Влияние инокуляции растений фасоли эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* на рост проростков в модельных опытах и продуктивность в условиях Южного Предуралья // *Агрохим. вестн.* 2020. № 6. С. 48–53. <https://doi.org/10.24411/1029-2551-2020-10085>
10. Иксанова М.А., Гарипова С.Р. Анализ фенологии, роста и продуктивности фасоли сортов Уфимская и Золотистая при инокуляции эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* в условиях Предуралья // *Докл. Башкир. ун-та*. 2021. Т. 6. № 3. С. 152–157. <https://doi.org/10.33184/dokbsu-2021.3.2>
11. Lastochkina O.V., Allagulova C., Fedorova K., Koryakov I., Vladimirova A., Garshina D. Application of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid to improve wheat growth and tolerance under combined drought and *Fusarium* root rot stresses // *Agronomy*. 2020. V. 10. № 9. P. 1343. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091343>
12. Lastochkina O.V., Yuldashev R., Allagulova C., Fedorova K., Avalbaev A., Maslennikova D., Garshina D., Ivanov S., Khafizova R., Bosacchi M. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* modulates physiological responses of two different *Triticum aestivum* L. cultivars under drought stress // *Plants*. 2020. V. 9. № 12. P. 1–20. <https://doi.org/10.3390/plants9121810>
13. Maslennikova D., Lastochkina O. Contribution of ascorbate and glutathione in endobacteria *Bacillus subtilis*-mediated drought tolerance in two *Triticum aestivum* L. genotypes contrasting in drought sensitivity // *Plants*. 2021. V. 10. № 12. P. 2557. <https://doi.org/10.3390/plants10122557>
14. Lastochkina O.V., Pusenкова Л.И., Гарипова С.Р., Юлдашев Р.А., Blagova D., Khairullin R., Babaev M., Aliniaiefard S. Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity // *Plant Physiol. Biochem. J.* 2017. V. 121. P. 80–88. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942817303479>
15. Никонов В.И., Лукманова М.А. Основные направления и результаты селекции яровой пшеницы в Башкирском НИИСХ // *Достиж. науки и техн. АПК*. 2010. № 1. С. 12–14. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=15100800>
16. Коряковцева Л.А., Волкова Л.В., Харина А.В. Сортовые коллекции ВИР как источники ценных свойств в селекции яровой мягкой пшеницы // *Аграрн. наука Евро-Северо-Востока*. 2014. Т. 39. № 2. С. 10–13.
17. Тимергалина Л.Н., Иванов Р.С., Никонов В.И., Иванов И.И. Сравнительная оценка транспирации, роста корней и гидравлической проводимости у растений пшеницы, различающихся по урожайности в условиях засухи // *Экобиотех.* 2020. Т. 3. № 4. С. 734–740.

- <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-4-734-740>
18. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Никонов В.И. Выявление засухоустойчивых генотипов в культуре незрелых зародышей *in vitro* // Вестн. Башкир. ГАУ. 2019. № 4. С. 37–41. <https://doi.org/10.31563/1684-7628-2019-52-4-37-41>
 19. Žiarovská J., Medo J., Kysel M., Zamiešková L., Kac'ániová M. Endophytic bacterial microbiome diversity in early developmental stage plant tissues of wheat varieties // Plants. 2020. № 9. P. 266. <https://doi.org/10.3390/plants9020266>
 20. Valente J., Gerin F., Le Gouis J., Moënné-Loccoz Y., Prigent-Combaret C. Ancient wheat varieties have a higher ability to interact with plant growth-promoting rhizobacteria // Plant Cell Environ. 2020. V. 43. № 1. P. 246–260. <https://doi.org/10.1111/pce.13652>
 21. Гарипова С.Р., Гарифуллина Д.В., Маркова О.В., Уразбахтина Н.А., Хайруллин Р.М. Комплексная биологическая активность *in vitro* эндофитных бактерий, выделенных из клубеньков гороха и фасоли // Изв. Уфим. НЦ РАН. 2015. № 4—1. С. 25–28.
 22. Кураמיшина З.М., Хайруллин Р.М., Смирнова Ю.В. Сортовая отзывчивость *Triticum aestivum* L. на инокуляцию клетками эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* // Рос. сел.-хоз. наука. 2019. № 6. С. 3–6. <https://doi.org/10.31857/S2500-2627201963-6>
 23. Коришунова Т.Ю., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Тимергалин М.Д., Рамеев Т.В., Четверикова Д.В., Феоктистова А.В., Низаева А.А., Четвериков С.П. Бактеризация семян кормовых трав: влияние на прорастание и рост растений // Биомика. 2021. Т. 13. № 2. С. 159–165. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2021-12>
 24. Deivanai S., Bindusara A.S., Prabhakaran G., Bhore S.J. Culturable bacterial endophytes isolated from Mangrove tree (*Rhizophora apiculata* Blume) enhance seedling growth in Rice // J. Nat. Sci. Biol. Med. 2014. V. 5. № 2. P. 437–444. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.136233>
 25. Архипова Т.Н., Кузьмина Л.Ю., Кудоярова Г.Р. Влияние титра микроорганизмов на результаты их ростстимулирующей активности в условиях гетеротрофного питания растений // Экобиотех. 2018. Т. 1. № 2. С. 97–104. <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2018-1-2-97-104>
 26. Гильванова Е.А., Мильман П.Ю. Биосинтез ауксина и каротина PGPR-бактерий *Pantoea* sp. на питательных средах различного состава // Биомика. 2020. Т. 12. № 2. С. 218–223. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2020-12>
 27. Gu Y-H., Mazzola M. Impact of carbon starvation on stress resistance, survival in soil habitats and biocontrol ability of *Pseudomonas putida* strain 2C8 // Soil Biol. Biochem. 2001. V. 33. № 9. P. 1155–1162. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00019-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00019-0)
 28. Teixidó N., Usall J., Torres R. Insight into a successful development of biocontrol agents: Production, formulation, packaging, and shelf life as key aspects // Horticulture. 2022. V. 8. № 4. P. 305. DOI: [org/https://doi.org/10.3390/horticulturae8040305](https://doi.org/10.3390/horticulturae8040305)
 29. O'Callaghan M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. № 13. P. 5729–5746. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7590-9>
 30. Rocha I., Ma Y., Souza-Alonso P., Vosátka M., Freitas H., Oliveira R.S. Seed coating: A tool for delivering beneficial microbes to agricultural crops // Front Plant Sci. 2019. V. 6. № 10. P. 1357. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01357>
 31. Renoud S., Abrouk D., Prigent-Combaret C. Effect of inoculation level on the impact of the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on selected microbial functional groups in the rhizosphere of field maize // Microorganisms. 2022. V. 10. № 2. P. 325. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020325>
 32. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Изд. центр “Академия”, 2005. С. 161, 571–572.
 33. Persello-Cartieaux F., Nussaume L., Robaglia C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions // Plant Cell Environ. 2003. V. 26. P. 189–199. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00956.x>
 34. Иванчина Н.В., Гарипова С.Р., Хайруллин Р.М. Влияние дозы клеток эндофитных штаммов *Bacillus subtilis*, продуцирующих индолил-3-уксусную кислоту, на рост и продуктивность гороха (*Pisum sativum* L.) // Агрохимия. 2018. № 4. С. 39–44. <https://doi.org/10.7868/S0002188118040051>
 35. Xie H., Pasternak J.J., Glick B.R. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* CR12-2 that overproduce indoleacetic acid // Curr. Microbiol. 1996. V. 32. P. 67–71. <https://doi.org/10.1007/s002849900012>
 36. Gang S., Saraf M., Waite C.J., Buck M., Schumacher J. Mutualism between *Klebsiella* SGM 81 and *Dianthus caryophyllus* in modulating root plasticity and rhizospheric bacterial density // Plant Soil. 2018. V. 421. № 1. P. 273–288. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3440-5>
 37. Malik D.K., Sindhu S.S. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: Effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*) // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2011. V. 17. № 1. P. 25–32. <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0041-7>
 38. Shahid A.P., Zahoor A.B. Isolation and characterization of indole-3-acetic acid producing bacterial root endophytes associated with brown sarson (*Brassica rapa* L.) // Int. J. Adv. in Sci. Eng. Technol. 2017. V. 5. № 3. P. 69–74. http://www.iraj.in/journal/journal_file/journal_pdf/6-390-150513318669-74.pdf
 39. Gaimster H., Summers D. Regulation of indole signaling during the transition of *E. coli* from exponential to stationary phase // Plos One. 2015. V. 10. № 9. e0136691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136691>

Influence of Nutrient Medium Composition for Culturing Bacteria and the Dose of *B. subtilis* 10-4 Biologics on Growth Indicators and Productivity of Wheat Plants

**S. R. Garipova^{a,b,##}, L. I. Pusenkova^{a,#}, O. V. Lastochkina^c,
K. A. Fedorova^{a,c}, M. A. Dedova^a, O. V. Markova^b, V. D. Matyunina^b, and R. A. Yuldashev^c**

^a*Bashkir Research Institute of Agriculture – a Separate Structural Subdivision
of the Ufa Federal Research Center of the RAS
ul. R. Zorge 19, Ufa 450059, Russia*

^b*Federal State Budgetary Institution of Higher Education Ufa University of Science and Technologies
ul. Z. Validi 32, Ufa 450076, Russia*

^c*Ufa Institute of Biochemistry and Genetics – a separate structural subdivision of the Ufa Federal Research Center of the RAS
prosp. October 71, Ufa 450054, Russia*

[#]*E-mail: l.pusenkova@mail.ru*

^{##}*E-mail: garipovasvetlana@gmail.com*

Inoculation of crop seeds with selective strains of growth-stimulating bacteria is an environmentally friendly, low-cost way to increase their yield, but may depend on some biotechnological factors affecting their physiological activity. These include the conditions for the cultivation of bacteria and the dose of the drug. The work analyzed the effectiveness of inoculation of Bashkir spring wheat with 28 different preparations of the *Bacillus subtilis* strain 10-4: 1 – an aqueous suspension of bacterial cells washed off potato-glucose agar (PGA), 2 – a liquid culture containing cells with exometabolites obtained by cultivating bacteria in potato-glucose broth (PGB), 3 – liquid culture of bacterial cells grown in legume-glucose broth (LGB). At the same time, the growth-stimulating effect of applying a high dose (10^8 cells/ml) and a low dose (10^4 – 10^5 cells/ml) of bacteria in the inoculum was evaluated. When comparing the preparations obtained from potato-glucose medium, it was revealed that the positive growth effect (an increase in the number of wheat plant roots) was caused only by a high dose of the drug cells in the PGA and both doses of the drug in the PGB, but a high dose of the drug in the PGB inhibited seed germination up to 74% (in the control 100%). When comparing the preparations obtained during the cultivation of bacteria in PGB and LGB, it was revealed that the best growth effect (total root length and shoot height) was greater than control in plants inoculated with a small dose of the drug in PGB and a large dose of the drug in LGB. The stimulating effect of a small dose of the drug in LGB was less and extended only to the root system. The results of laboratory experiments coincided with the effectiveness of the studied drugs in the field. The use of a drug obtained in BGO and administered at a dose of 10^8 cells / ml, and a drug obtained in PGB and administered at a dose of 10^5 cells/ml, increased grain yield by 1.6–1.7 times with a decrease in the intensity of leaf-stem diseases by 32 and 11% compared with the untreated control. The drug obtained in LGB and introduced in a small dose did not provide either an increase in yield or a protective effect compared to the control. Possible causes of the action of *B. subtilis* 10-4 strain preparations related to the production of phytohormones by it, depending on the composition of the medium, and with different adaptive capacity of bacteria when cultured on nitrogen-rich and less nitrogen-rich media are discussed.

Key words: inoculation, bacterial concentration, wheat, growth, bacterial culture medium, yield, endophytic bacteria.