



## БАКТЕРИИ ДЛЯ НИВЕЛИРОВАНИЯ ГЕРБИЦИДНОГО СТРЕССА У РАСТЕНИЙ

Г. Г. Худайгулов\*, С. П. Четвериков

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054 Уфа, ул. пр. Октября 69, \*Email: [bio.logos@yandex.com](mailto:bio.logos@yandex.com)

### Резюме

Выделены и идентифицированы как псевдомонады - бактерии устойчивые в растворах гербицидов. Штаммы способны к синтезу ауксинов, фиксации атмосферного азота и солубилизации фосфатов, могут быть рекомендованы для создания биопрепаратов со свойствами биофунгицида и биоудобрения, и использования в качестве бактериальных антистрессантов по нивелированию гербицидного стресса.

**Ключевые слова:** устойчивость к гербицидам; гербицидный антистрессант; стимуляция роста растений, псевдомонады, биодegradация, деструктор гербицидов

**Цитирование:** Худайгулов Г.Г., Четвериков С.П. Бактерии для нивелирования гербицидного стресса у растений // Биомика. 2020. Т.12(3). С. 337-342. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-21

© Авторы

## BACTERIA MITIGATING HERBICIDAL STRESS IN PLANTS

G.G. Khudaygulov\*, S.P. Chetverikov

Ufa Institute of biology of the Ufa Federal research center of the Russian Academy of Sciences, Russia, 450054, Ufa, prospect Oktyabrya, 69, \*Email: [bio.logos@yandex.com](mailto:bio.logos@yandex.com)

### Resume

Bacteria resistant to herbicide solutions were isolated and identified as *Pseudomonas*. The strains are capable of synthesizing auxins, fixing atmospheric nitrogen and solubilizing phosphates, and can be recommended for creating biological plant protection products with the properties of biofungicide and biofertilizer, and use as bacterial antistressants to mitigate herbicide stress.

**Keywords:** resistance to herbicides; herbicidal stress; stimulation of plant growth

**Citation:** Khudaygulov G.G., Chetverikov S.P. Bacteria mitigating herbicidal stress in plants. *Biomics*. 2020. Vol. 12(3). P. 337-342. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-21 (In Russian)

© The Authors

### Введение

Выращивание культурных растений продуктового назначения, в частности пшеницы, имеет огромное значение для благополучия человечества. При их возделывании большое внимание уделяется устранению конкуренции за питательные вещества, содержащиеся в почве. По этой

причине существует множество различных гербицидов и по объему реализации они занимают лидирующее положение среди химических средств защиты растений [Aktar et al., 2009]. В свою очередь, в качестве реакции на антропогенное воздействие, широкое применение химических средств порождает устойчивые к данным соединениям сорные растения.

Данное явление приводит к тому, что непосредственно «на местах» производитель сельскохозяйственных культур вынужден увеличивать дозы и применять сочетание нескольких гербицидов с разными действующими веществами (ДВ) [Zargar et al., 2019]. Однако, такая обработка может привести к угнетению культурных растений, проявлению «гербицидного стресса», что в свою очередь приводит к увеличению срока вегетации, который в условиях зон с «рискованным земледелием» нежелателен. Помимо вышеперечисленного, применение повышенных доз и комбинаций средств защиты приводит к накоплению химических стрессовых веществ в почве, что несомненно снижает всхожесть и продуктивность возделываемых культур.

Как известно, в ризосфере растений обитает множество микроорганизмов, обладающих набором благоприятных свойств для них. На данной основе создано большое число препаратов. Среди широко используемых возможностей микроорганизмов можно выделить: способность к азотфиксации; растворению фосфатов; синтезу фитогормонов, антимикробных соединений [Sraeren et al., 2009; Bakaeva et al., 2017], конкуренцию за питательные вещества и места колонизации с патогенами [Klopper et al., 2004]. Взаимодействие микроб-растение в условиях стресса тоже представляет научный и практический интерес. Согласно исследований [Rubin et al., 2017], обработка растений бактериальными препаратами в условиях стрессового воздействия наиболее полно проявляет свойства данной группы микроорганизмов. Следует отметить, что подавляющее большинство PGP (Plant Growth-Promoting - способствующие росту растений) – бактерий – представители рода *Pseudomonas*.

Резюмируя вышесказанное, актуальность средств для уменьшения стресса у растений не вызывает сомнений, как с научной, так и с практической точек зрения. Данная тематика является новой в научном сообществе. И по этой причине сообщения о подобных исследованиях скудны и рассматриваются пока на фоне стресса отдельными гербицидами, а в качестве бактериальных антистрессантов рассматриваются бактерии родов *Rhizobium* [Ahemad et al., 2010], *Pseudomonas* [Bourahla et al., 2018], *Azotobacter* [Chennappa et al., 2018]. Цель работы – выделение устойчивых к гербицидам бактерий, обладающих способностью нивелировать у растений индуцированный гербицидами стресс.

#### Материалы и методы

В качестве объектов исследования нами были выбраны культуры микроорганизмов, выделенные из сельскохозяйственных и антропогенно нарушенных почв.

Для выявления бактерий, устойчивых к гербицидам, применяли метод накопительных культур и элективные среды. В качестве основы взяли среду Раймонда [Raymond et al., 1961] с добавлением коммерческих препаратов гербицидов Октапон экстра (2,5 г/л), Флоракс (2,5 г/л), Дикамба (1 г/л), Наномет (1 г/л), Спецназ (1 г/л) или Чисталан (2,5 г/л). Концентрации препаратов в средах соответствовали концентрациям их рабочих растворов. Антагонизм тестировали согласно методике Четверикова [Chetverikov, 2009], суть которой состоит в совместном выращивании фитопатогена (тест-культура) и бактерии. В качестве тест-культур использовали: *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (= *Helminthosporium sativum* Pam., King et Bakke), *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc. BKM F-844, *F. gibbosum* Appel et Wollenw BKM F-848, *F. graminearum* Schwabe BKM F-1668, *F. solani* (Mart) Sacc. BKM F-142, *F. oxysporum* Schltdl BKM F-137, *F. nivale* (Fr.) Ces. Ex Sacc. BKM F-3106, *F. semitectum* BKM F – 1938, *F. avenaceum* BKM F – 132, *Alternaria alternate* (Fr.) Keissl. BKM F-3047, *Rhizoctonia solani* J.G. Kuehn BKM F-895.

Для определения нитрогеназной активности применялся ацетиленовый метод, при котором хроматографически определяют этилен, образовавшийся при воздействии на ацетилен фермента нитрогеназы [Hardy et al., 1973; Коршунова и др., 2013].

Способность штамма к синтезу ИУК определяли с применением метода иммуноферментного анализа по методике, приведенной в статье Бакаевой с соавт. [Bakaeva et al., 2020].

Солюбилизацию фосфатов оценивали по образованию прозрачных зон вокруг бактериальных колоний на среде Пиковской [Pikovskaya, 1948].

#### Результаты и обсуждение

Для выделения штаммов бактерий, устойчивых к воздействию гербицидов, взяли 178 образцов почвы из различных источников, подвергнутых антропогенному воздействию (промышленные площадки предприятий Республики Башкортостан). По результатам скрининга отобрано 11 перспективных с точки зрения применения в сельском хозяйстве штаммов, способных расти в присутствии различных гербицидов и использовать последние в качестве источника углерода и энергии (табл. 1). Гербициды Октапон экстра, Спецназ и дикамба легко ассимилировались отобранными штаммами. Далее представлены гербициды в порядке уменьшения способных к ассимилированию выделенными штамми: в варианте с Флоракс их количество составило 10, с Наномет – 9, с Чисталан использовали 7 штаммов (табл. 1). Из выбранных гербицидов именно Чисталан

## БАКТЕРИИ ДЛЯ НИВЕЛИРОВАНИЯ ГЕРБИЦИДНОГО СТРЕССА

проявлял наибольшую токсичность. В его присутствии в рабочей концентрации выживали только 9 штаммов бактерий. По-видимому, данным свойством этого препарата обусловлена и меньшая вероятность выделения бактерий-деструкторов препарата

Чисталан. При экспозиции с прочими представленными гербицидами все отобранные штаммы сохраняли свою жизнеспособность.

Таблица 1.

Способность штаммов к росту в среде с гербицидами в качестве единственного источника углерода и энергии.

The ability of strains to grow in an environment with herbicides as the only source of carbon and energy

| Изолят<br>Isolate | Гербициды<br>Herbicides |                                    |                    |                    |                       |                    |
|-------------------|-------------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
|                   | Дикамба<br>Dikamba      | Октапон<br>экстра<br>Oktapon extra | Наномет<br>Nanomet | Флоракс<br>Floraks | Чисталан<br>Chistalan | Спецназ<br>Specnaz |
| CH.3.1            | -                       | ++                                 | -                  | +                  | -                     | +                  |
| 12N1              | ++                      | ++                                 | ++                 | ++                 | -                     | +                  |
| CH5%1             | +                       | ++                                 | +                  | ++                 | +                     | +                  |
| <b>CH5%2</b>      | ++                      | ++                                 | ++                 | +                  | +                     | +                  |
| 6CH1              | ++                      | ++                                 | -                  | ++                 | +                     | +                  |
| <b>6CH2</b>       | ++                      | +                                  | ++                 | +                  | ++                    | +                  |
| 5N1               | ++                      | ++                                 | ++                 | ++                 | -                     | +                  |
| ДД4               | +                       | +                                  | +                  | -                  | +                     | +                  |
| <b>DA1.2</b>      | ++                      | ++                                 | ++                 | ++                 | ++                    | +                  |
| Н.ж.              | ++                      | ++                                 | ++                 | ++                 | ++                    | +                  |
| Некр.5            | ++                      | ++                                 | +                  | ++                 | -                     | ++                 |

Примечание: ++ активный рост, + слабый рост, - отсутствие роста.

Note: ++ active growth, + weak growth, - no growth

В рамках исследуемого вопроса, а именно, поиск штаммов для нивелирования гербицидного стресса растений, по набору полезных с данной точки зрения свойств, наиболее перспективные изолятами являются штаммы обозначенные шифрами **DA1.2**, и **CH5%2**, которые идентифицированы как *Pseudomonas*

*protegens* и *P. plecoglossicida*, соответственно. Их характеристики с точки зрения стимуляторов роста и антистрессантов (а именно, нитрогеназная активность, синтез ауксинов, солюбилизация фосфатов) представлены в таблице 2 и на рисунке 1.

Таблица 2.

Свойства потенциальных бактериальных антистрессантов  
Properties of potential bacterial anti-stress substances

| Штамм<br>Strain                        | Нитрогеназная<br>активность, нмоль<br>$C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot ml^{-1}$<br>Nitrogenase activity,<br>$nmol C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot ml^{-1}$ | Синтез ауксинов,<br>нг/мл<br>Synthesis of auxins,<br>ng/ml | Солюбилизация<br>фосфатов<br>Solubilization of<br>phosphates |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <i>P. plecoglossicida</i> <b>CH5%2</b> | 20,7                                                                                                                                           | 323±16                                                     | +                                                            |
| <i>P. protegens</i> <b>DA1.2</b>       | 20,8                                                                                                                                           | 870±44                                                     | +                                                            |

Оба новых штамма проявили способность к синтезу ауксинов, фиксации атмосферного азота и солюбилизации фосфатов. Следует подчеркнуть тот факт, что синтез фитогормонов, в частности, ауксинов,

помимо стимуляции развития корневой системы растений, помогает в борьбе с дефицитом воды и другими стрессами растений [Ahemad et al., 2010; Rubin et al., 2017].

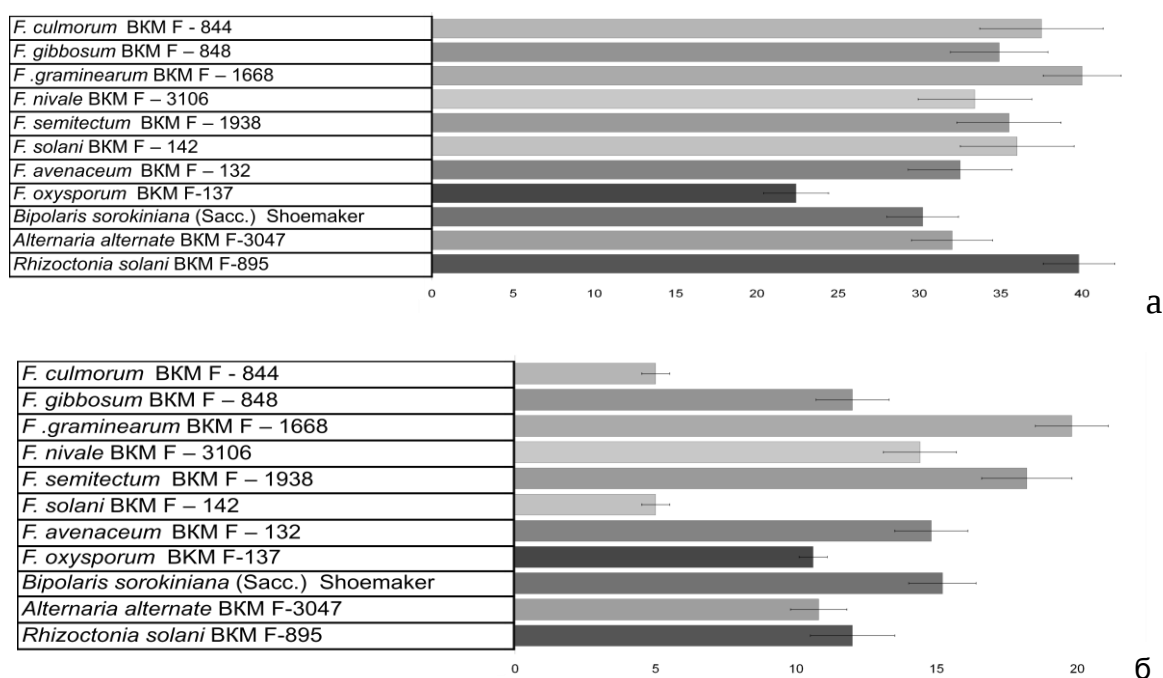


Рис 1. Спектр антагонистической активности потенциальных бактериальных антистрессантов; а - *P. protegens* DA1.2, б - *P. plecoglossicida* CH5%2.  
Spectrum of antagonistic activity of potential bacterial antistressants; а - *P. protegens* DA1.2, б - *P. plecoglossicida* CH5%2.

Изучение антагонистической активности штаммов по отношению к фитопатогенам показало их способность к проявлению фунгицидных свойств. По величине активности они находятся на уровне штаммов псевдомонад, изученных нами ранее [Asabina et al., 2009], но в дополнение к этому, устойчивы и способны расти в средах в присутствии гербицидов на основе малолетучих эфиров 2,4-Д и сульфонилмочевины. Таким образом, по совокупности представленных выше характеристик штаммы *P. protegens* DA1.2 и *P. plecoglossicida* CH5%2 можно рекомендовать для создания биопрепаратов со свойствами биофунгицида и биоудобрения, и использования в качестве бактериальных антистрессантов по нивелированию гербицидного стресса в классических баковых смесях с гербицидами.

Исследование выполнено в рамках Гос. задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А19-119021390081-1.

### Литература

1. Коршунова Т.Ю., Четвериков С.П., Мухаматдярова С.Р., Логинов О.Н. Окислительная и нитрогеназная активность бактерии *Ohrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 // Известия Самарского научного центра РАН. 2013. Т.15, № 3(5). 1637-1640.

2. Ahemad M., Khan M.S. Growth promotion and protection of lentil (*Lens esculenta*) against herbicide stress by Rhizobium species // Ann. Microbiol. 2010. V. 60. P. 735-745. DOI: 10.2478/v10102-009-0001-7  
3. Aktar W., Sengupta, D., Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards // Interdisc. Toxicol. 2009. V. 2. № 1. P. 1-12. DOI: 10.2478/v10102-009-0001-7  
4. Asabina EA, Chetverikov SP, Loginov ON. [Optimization of biosynthesis of phytopathogen growth inhibitors by bacteria of \*Pseudomonas\* genus. Biotechnology in Russia](#). 2009. V. 3. 81-89. DOI: 10.1134/s0026261709040055  
5. Bakaeva M, Kuzina E, Vysotskaya L, Kudoyarova G, Arkhipova T, Rafikova G, Chetverikov S, Korshunova T, Chetverikova D, Loginov O. Capacity of *Pseudomonas* strains to degrade hydrocarbons, produce auxins and maintain plant growth under normal conditions and in the presence of petroleum contaminants. Plants. 2020. V. 9(3): 379. DOI: 10.3390/plants9030379  
6. Bakaeva M., Chetverikov S., Korshunova T., Loginov O. The new bacterial strain *Paenibacillus* sp. IB-1: A producer of exopolysaccharide and biologically active substances with phytohormonal and antifungal activities // Applied Biochemistry and Microbiology. 2017. V. 53. № 2. P. 201-208. DOI: 10.1134/s0003683817020041  
7. Bourahla M., Djebbar R., Kaci Y., Abrous-Belbachir O. Alleviation of bleaching herbicide toxicity by PGPR strain

isolated from wheat rhizosphere *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie* Tom. XXV, Issue: 2, 2018, pp. 74-83. DOI: 10.30892/auog.24

8. Chennappa G., Sreenivasa M.Y., Nagaraja H. *Azotobacter salinestris*: A Novel Pesticide-Degrading and Prominent Biocontrol PGPR Bacteria. In: Panpatte D., Jhala Y., Shelat H., Vyas R. (eds) *Microorganisms for Green Revolution. Microorganisms for Sustainability*, 2018. V. 7. Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-10-6241-4

9. Chetverikov S.P., Loginov O.N. New metabolites of *Azotobacter vinelandii* exhibiting antifungal activity // *Microbiology*. 2009. V. 78. № 4. P. 428–432. DOI: 10.1134/s0026261709040055

10. Hardy RWF, Burns RC, Holsten RD, Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol Biochem*. 1973. V. 5. P. 47–81. DOI: 10.1016/0038-0717(73)90093-x

11. Kloepper J.W., Ryu M., Zhang S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus sp.* // *Phytopathology*. 2004. V. 94. P. 1259–1266. DOI: 10.1094/phyto.2004.94.11.1259

12. Pikovskaya RI, 1948. Mobilization of phosphorous in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 17: 362–370. DOI: 10.1007/bf00545496

13. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // *Develop. Industr. Microbiol*. 1961. V. 2. № 1. P. 23-32. DOI: 10.1038/sj.jim.2900633

14. Rubin R.L., van Groenigen K.J., Hungate B.A. Plant growth promoting rhizobacteria are more effective under drought: a meta-analysis // *Plant and Soil*. 2017. V. 416. P. 309–323. DOI: 10.1007/s11104-017-3199-8

15. Spaepen S., Vanderleyden J., Okon Y. Plant growth promoting actions of rhizobacteria // *Advances in Botanical Research*. 2009. V. 51. P. 283–320. DOI: 10.1016/s0065-2296(09)51007-5

16. Zargar M., Bayat M., Lyashko M., Chauhan B. Postemergence Herbicide Applications Impact Canada Thistle Control and Spring Wheat Yields // *Agronomy journal*. 2019. V. 111. P. 2874-2880. DOI: 10.2134/agronj2019.02.0125

## References

1. Ahemad M., Khan M.S. Growth promotion and protection of lentil (*Lens esculenta*) against herbicide stress by *Rhizobium* species. *Ann. Microbiol*. 2010. V. 60. P. 735–745. DOI: 10.2478/v10102-009-0001-7
2. Aktar W., Sengupta, D., Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisc. Toxicol*. 2009. V. 2. № 1. P. 1-12. DOI: 10.2478/v10102-009-0001-7
3. Asabina EA, Chetverikov SP, Loginov ON. [Optimization of biosynthesis of phytopathogen growth inhibitors by bacteria of \*Pseudomonas\* genus.](#)

[Biotechnology in Russia](#). 2009. V. 3. P. 81-89. DOI: 10.1134/s0026261709040055

4. Bakaeva M, Kuzina E, Vysotskaya L, Kudoyarova G, Arkhipova T, Rafikova G, Chetverikov S, Korshunova T, Chetverikova D, Loginov O, 2020. Capacity of *Pseudomonas* strains to degrade hydrocarbons, produce auxins and maintain plant growth under normal conditions and in the presence of petroleum contaminants. *Plants* 9(3): 379. DOI: 10.3390/plants9030379

5. Bakaeva M., Chetverikov S., Korshunova T., Loginov O. The new bacterial strain *Paenibacillus sp.* IB-1: A producer of exopolysaccharide and biologically active substances with phytohormonal and antifungal activities. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017. V. 53. № 2. P. 201-208. DOI: 10.1134/s0003683817020041

6. Bourahla M., Djebbar R., Kaci Y., Abrous-Belbachir O. Alleviation of bleaching herbicide toxicity by PGPR strain isolated from wheat rhizosphere *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie* Tom. XXV, Issue: 2, 2018, pp. 74-83. DOI: 10.30892/auog.24

7. Chennappa G., Sreenivasa M.Y., Nagaraja H. *Azotobacter salinestris*: A Novel Pesticide-Degrading and Prominent Biocontrol PGPR Bacteria. In: Panpatte D., Jhala Y., Shelat H., Vyas R. (eds) *Microorganisms for Green Revolution. Microorganisms for Sustainability*, 2018. V. 7. Springer, Singapore/ DOI: 10.1007/978-981-10-6241-4

8. Chetverikov S.P., Loginov O.N. New metabolites of *Azotobacter vinelandii* exhibiting antifungal activity. *Microbiology*. 2009. V. 78. № 4. P. 428–432. DOI: 10.1134/s0026261709040055

9. Hardy RWF, Burns RC, Holsten RD. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol Biochem*. 1973. V.5. P. 47–81. DOI: 10.1016/0038-0717(73)90093-x

10. Kloepper J.W., Ryu M., Zhang S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus sp.* *Phytopathology*. 2004. V. 94. P. 1259–1266. DOI: 10.1094/phyto.2004.94.11.1259

11. Korshunova T.Y., Chetverikov S.P., Muhamatdyarova S.R., Loginov O.N. Okislitel'naya i nitrogenaznaya aktivnost' bakterii *Ohrobactrum sp.* IB DT-5.3/2 *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra RAN*. 2013. T.15, № 3(5). 1637-1640.

12. Pikovskaya RI. Mobilization of phosphorous in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*. 1948. V. 17. P. 362–370. DOI: 10.1007/bf00545496

13. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. *Develop. Industr. Microbiol*. 1961. V. 2. № 1. P. 23-32. DOI: 10.1038/sj.jim.2900633

14. Rubin R.L., van Groenigen K.J., Hungate B.A. Plant growth promoting rhizobacteria are more effective under drought: a meta-analysis // *Plant and Soil*. 2017. V. 416. P. 309–323. DOI: 10.1007/s11104-017-3199-8
15. Spaepen S., Vanderleyden J., Okon Y. Plant growth promoting actions of rhizobacteria // *Advances in Botanical Research*. 2009. V. 51. P. 283–320. DOI: 10.1016/s0065-2296(09)51007-5
16. Zargar M., Bayat M., Lyashko M., Chauhan B. Postemergence Herbicide Applications Impact Canada Thistle Control and Spring Wheat Yields // *Agronomy journal*. 2019. V. 111. P. 2874-2880. DOI: 10.2134/agronj2019.02.0125