2017 БИОЛОГИЯ Вып. 4

УДК 631.472.74: 631.46: 631.416.5

А. В. Назаров^{а,b}, Е. С. Корсакова^{а,b}, Л. Н. Ананьина^а, Е. Г. Плотникова^{а,b}

а Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННОГО ЗАСОЛЕНИЯ ПОЧВЫ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ МЯТЛИКА ЛУГОВОГО (*POA PRATENSIS* L.)

Приведены результаты исследований влияния техногенного засоления на бактериальные сообщества ризосферы растений мятлика лугового (*Poa pratensis* L.), произрастающих на территории района промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей (г. Соликамск, Пермский край). Обнаружены изменения в ризосферных сообществах бактерий: снижение численности и увеличение таксономического разнообразия гетеротрофных бактерий; уменьшение доли бактерий — представителей класса *Gammaproteobacteria*; увеличение доли бактерий, принадлежащих к классам *Actinobacteria* (участки 2, 3), *Alphaproteobacteria* (участки 4, 5), *Flavobacteria* (участок 3), *Bacilli* (участки 4, 5); изменение таксономического состава бактериального сообщества. На участках с засоленной почвой в ризосфере доминировали умеренно-галофильные бактерии сем. *Halomonadaceae* (участки 2, 3 и 5) и галофильные бактерии рода *Pseudomonas* (участок 4), что указывает на возможное наличие симбиотических связей между данными бактериями и растениями в условиях засоления.

Ключевые слова: бактериальные сообщества; ризосфера; мятлик луговой; техногенное засоление.

A. V. Nazarov^{a,b}, E. S. Korsakova^{a,b}, L. N. Anan'ina^a, E. G. Plotnikova^{a,b}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation ^b Perm State University, Perm, Russian Federation

MICROBIAL DIVERSITY IN CLAY-SALT SLUDGE OF THE POTASH ENTERPRISE (BEREZNIKI, PERM KRAI)

The results of studies of the effect of technogenic salinization on bacterial communities of rhizosphere plants of meadow grass (*Poa pratensis* L.), growing on the territory of the industrial development area of the Verkhnekamsk salt deposit (Solikamsk, Perm Region). The following changes were observed in the rhizosphere communities of bacteria: a decrease in the number and an increase in the taxonomic diversity of heterotrophic bacteria; decrease in the proportion of bacteria - representatives of the *Gammaproteobacteria* class; an increase in the proportion of bacteria belonging to the classes *Actinobacteria* (sites 2, 3), *Alphaproteobacteria* (sites 4, 5), *Flavobacteria* (sites 3), *Bacilli* (sites 4, 5); change in the taxonomic composition of the bacterial community. Halophilic bacteria of the family *Halomonadaceae* (sites 2, 3 and 5) and of the genus *Pseudomonas* (site 4) dominated the sites with saline soil in the rhizosphere, indicating a possible symbiotic relationship between these bacteria and plants under saline conditions.

Key words: bacterial communities; rhizosphere; meadow grass; technogenic salinization.

В настоящее время около 10% поверхности континентов покрыто засоленными почвами, при этом из-за климатических изменений и антропогенного воздействия на окружающую среду отмечается тенденция к увеличению площади почв с повышенной минерализацией [Лопатовская, Сугаченко, 2010]. Известно, что ризосферные микроорганизмы могут снижать стрессовое воздействие на растения различных факторов, в том числе и засоления [Dimkpa, Weinand, Asch, 2009]. Поэтому исследования ризосферных микробных сообществ при техногенном за-

солении почв важны с теоретической точки зрения, так как дают материал для анализа механизмов функционирования растительно-микробных симбиозов данных экосистем. Кроме того, исследования подобных сообществ могут быть использованы для создания биотехнологий, повышающих продуктивность растений при засолении почв, что определяет практическую важность данной проблемы.

Однако ризосферные бактериальные сообщества растений, произрастающих на засоленных почвах, изучены относительно слабо. Имеющиеся

_

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

исследования охватывают территории с засушливым климатом и прибрежно-морские регионы, где данная проблема стоит наиболее остро [Bharathkumar et al., 2008; Castellanos et al., 2009; Mapelli et al., 2013]. Между тем воздействие техногенного засоления почвы на ризосферные бактериальные сообщества в условиях гумидного климата остается практически не изученным.

Цель исследования – изучить влияние техногенного засоления на бактериальные сообщества ризосферы растений.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись бактериальные сообщества ризосферы растений вида мятлик луговой (*Poa pratensis* L.), доминирующего в растительных сообществах района промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей (г. Соликамск, Пермский край). Четыре участка, с

которых в июле 2013 г. были отобраны образцы засоленных почв, расположены вблизи солеотвалов калийных предприятий СКПРУ1 (участок 5) и СКПРУ2 (участки 2–4). Почвенные образцы с участка 1, имевшего незасоленную почву и находящегося в 1.6 км от ближайшего солеотвала, были отобраны в качестве контрольных (табл. 1).

Почва на всех участках была охарактеризована как дерново-подзолистая суглинистая. Отбор и подготовку почвенных образцов для агрохимического и микробиологического анализов проводили согласно методическим рекомендациям [Методы..., 1991; Практикум..., 2001]. Агрохимический анализ почвы проводился стандартными методами [Практикум..., 2001]. Содержание в почве кальция (Ca²⁺), магния (Mg²⁺), натрия (Na⁺), калия (K⁺) определяли на атомно-абсорбционном спектрометре AA-6300 (Shimadzu, Япония). Основные физикохимические характеристики почвы приведены в табл. 1.

Таблица 1 Географические координаты и агрохимические характеристики исследованных участков

Показатель	Участки					
	1	2	3	4	5	
Координаты уча- стков	59°33'17"	59°33'59"	59°33'55"	59°34'02"	59°37'59"	
	с.ш., 56°44'28" в.д.	с.ш., 56°45'52" в.д.	с.ш., 56°45'60" в.д.	с.ш., 56°46'04" в.д.	с.ш., 56°45'11" в.д.	
рН водный	6.1	8.3	7.4	7.6	7.7	
Ca ²⁺ , мг/кг	56±7	2419±394	895±86	649±102	1186±234	
Mg ²⁺ , мг/кг	23±2	115±20	100±11	95±17	539±68	
Na ⁺ , мг/кг	5±2	5750±278	1315±98	1320±196	1944±189	
K^+ , $M\Gamma/K\Gamma$	7±1	53±7	286±41	577±38	396±43	
P_2O_5 , мг/кг	100±5	113±14	252±26	180±11	118±32	
NO ₃ , мг/кг	10±2	12±3	7±1	26±3	24±2	
NH ₄ ⁺ , мг/кг	10±3	49±4	67±4	16±2	28±3	
Гумус, %	2.4	1.5	1.4	1.2	3.5	

Для учета численности, выделения и культивирования бактерий использовали агаризованную богатую среду Раймонда (БСР) с добавлением в нее (Γ/π) : триптона – 5.0, дрожжевого экстракта – 2.5, NaCl – 50.0 и агара – 15.0 [Розанова, Назина, 1982]. Изоляты для дальнейшего изучения отбирали на основании морфологии колоний (цвет, форма, размер, поверхность, профиль, структура). Штаммы с отличающимися морфологическими признаками пересевались на БСР и далее были использованы для таксономического анализа, основанного на определении нуклеотидных последовательностей гена 16S pPHK. На основании полученных морфологических и генетических данных все штаммы были отнесены к отдельным операционным таксономическим единицам (ОТЕ). Численность бактерий выражали в количестве колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г почвы.

Амплификацию, секвенирование и филогенетический анализ гена 16S рРНК изолированных бактерий выполняли согласно описанию, представленному в работе [Anan`ina et al., 2011].

ленному в работе [Anan`ina et al., 2011]. Секвенирование проводили на приборе Genetic Analyzer 3500XL (Applied Biosystems, США), следуя инструкциям фирмы-производителя.

Таксономическое разнообразие бактериальных сообществ оценивали с использованием индекса Шеннона [Мэггеран, 1992].

Результаты и их обсуждение

На выбранных для исследования участках, расположенных возле солеотвалов (участки 2–5), концентрация Na^+ выше, чем в незасоленной почве (участок 1), в 263.1–1150.0, K^+ – 7.5–81.2, Ca^{2^+} – 11.5–42.7, Mg^{2^+} – в 4.1–23.4 раза (табл. 1).

Результаты проведенной работы показали, что техногенное засоление почвы негативно влияло на численность гетеротрофных бактерий в ризосферной зоне изученных растений. Так, численность бактерий в ризосфере растений, произрастающих на засоленной почве, была в 3.4–8.7 раз меньше,

чем в ризосфере растений, произрастающих на почве без засоления (табл. 2). С другой стороны, образцы ризосферы, отобранные на участке с незасоленной почвой, характеризовались меньшим разнообразием бактерий, чем образцы ризосферы растений, произрастающих на почве с засолением. При этом наиболее высокие значения индекса Шеннона и ОТЕ были выявлены в образцах ризосферы, отобранных на участке 2, почва которого содержала наиболее высокую концентрацию Na⁺ (табл. 2).

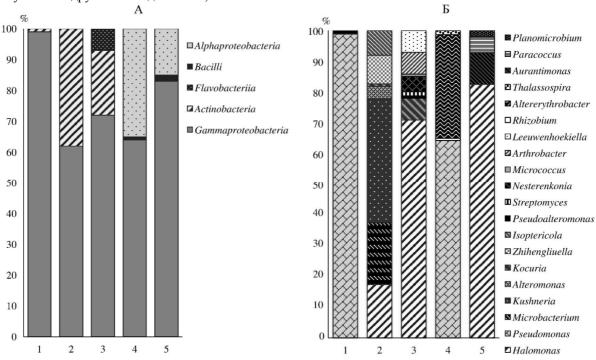
Таблица 2 Влияние техногенного засоления на численность и разнообразие гетеротрофных бактерий в ризосфере растений

Номер	Численность		Количество
участка	бактерий	Шеннона	OTE
1	$(8,4\pm1,5)$ x 10^7	1,47	4
2	$(2,5\pm0,4)$ x 10^7	2,52	10
3	$(1,4\pm0,3)$ x 10^7	1,57	8
4	$(1,4\pm0,5)$ x 10^7	1,49	5
5	$(1,2\pm0,2)$ x 10^7	1,29	4

Полученные нами результаты не противоречат результатам других исследователей, согласно ко-

торым повышенное содержание солей натрия в почве также может оказывать как отрицательное [Ibekwe et al., 2010; Wang et al., 2014], так и положительное [Yang et al., 2016] воздействие на разнообразие бактерий в ризосферных сообществах.

Засоление почвы влияет также и на таксономическую структуру ризосферного бактериального сообщества растений Poa pratensis L. Таксономический профиль бактериального сообщества прикорневой зоны растений незасоленной почвы (участок 1) типичен для большинства изученных ризосферных сообществ и представлен бактериями родов Pseudomonas (класс Gammaproteobacteria) и Microbacterium (класс Actinobacteria), доля которых в общей численности изолированных бактерий составляла 98.8 и 1.2%, соответственно (рисунок). Высокий уровень минерализации влияет на снижение доли в ризосферном бактериальном сообществе представителей класса Gammaproteobacteria и к увеличению доли бактерий, принадлежащих к классам Actinobacteria (участки 2 и 3), Flavobacteria (участок 3), Alphaproteobacteria (участки 4 и 5), Bacilli (участки 4 и 5) (рисунок, A).



Соотношение филогенетических групп бактерий (A – классы, B – роды), основанное на количестве ОТЕ, изолированных из ризосферы *Poa pratensis* L. с участков:

1 – незасоленная почва, 2–5 – засоленная почва

Большинство выделенных из засоленных почв штаммов бактерий (76% штаммов) имели наибольшее сходство по генам 16S рРНК с типовыми галофильными и галотолерантными бактериями, изолированными из экосистем с повышенной соленостью. Так, на участках 2, 3 и 5 в микробных сообществах ризосферы мятлика доминировали умеренно-галофильные бактерии родов *Kushneria* и *Halomonas* семейства *Halomonadaceae* класса *Gammaproteobacteria* [Oren, 2008] (рисунок, Б). На участке 4 так же, как и в варианте с незасоленной почвой, в ризосфере доминировали представители

рода Pseudomonas (класс Gammaproteobacteria), однако они были наиболее близки по нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК к морской галофильной бактерии Pseudomonas xanthomarina KMM 1447^T [Romanenko et al., 2005]. Изученные ризосферные микробные сообщества имеют определенное сходство по таксономической структуре с бактериальными сообществами ризосферы клубнекамыша морского (Bolboschoenus maritimus) и бескильницы болотной (Puccinellia limosa), произрастающих на берегах соленых озер национального парка Кишкуншаг в Венгрии [Borsodi et al., 2015], а также с ризосферными сообществами бактерий солероса шишковидного (Salicornia strobilacea) с солончаков, расположенных на юге Туниса [Mapelli et al., 2013]. Особенностью данных ризосферных бактериальных сообществ являлось доминирование бактерий сем. родов Halomonadaceae (виды Halomonas, Kushneria), а также высокая доля в численности представителей классов Actinobacteria и Bacilli.

Заключение

Таким образом, обнаружены следующие изменения в микробном сообществе ризосферы мятлика лугового под действием техногенного засоления вблизи солеотвалов, образованных при разработке Верхнекамского месторождения солей (Пермский край): снижение численности и увеличение таксономического разнообразия гетеротрофных бактерий; уменьшение доли бактерий - представителей класса Gammaproteobacteria; увеличение доли бактерий, принадлежащих к классам Actinobacteria (участки 2, 3), Alphaproteobacteria (участки 4, 5), Flavobacteria (участок 3), Bacilli (участки 4, 5); изменение таксономического состава бактериального сообщества. На участках с засоленной почвой в ризосфере доминировали умеренно-галофильные бактерии сем. Halomonadaceae (участки 2, 3 и 5) и галофильные бактерии рода Pseudomonas (участок 4), что указывает на наличие возможных симбиотических связей между данными бактериями и растениями в условиях засоления.

Нуклеотидные последовательности генов 16S pPHK 31 штамма бактерий, выделенных из ризосферы мятлика лугового, депонированы в базе данных GenBank под номерами КС992726-28, KF010924, KF010926-28, KJ659914, KJ669363, KJ669366-71, KJ679338-53.

Библиографический список

Лопатовская О.Г., Сугаченко А.А. Мелиорация почв. Засоленные почвы. Иркутск, 2010. 101 с. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. 303 с.

- *Мэггеран* Э. Экологическое разнообразие и его измерение. М.: Мир, 1992. 173 с.
- Практикум по агрохимии / под ред. В.Г. Минеева. М.: Изд-во МГУ, 2001. 689 с.
- Розанова Е.П., Назина Т.Н. Углеводородокисляющие бактерии и их активность в нефтяных пластах // Микробиология. 1982. Т. 51. С. 324–348.
- Anan'ina L.N. et al. Naphthalene-degrading bacteria of the genus *Rhodococcus* from the Verkhne-kamsk salt mining region of Russia // Antonie van Leeuwenhoek. 2011. Vol. 100, Iss. 2. P. 309–316.
- Bharathkumar S. et al. Characterization of the predominant bacterial population of different mangrove rhizosphere soils using 16S rRNA genebased single-strand conformation polymorphism (SSCP) // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2008. Vol. 24. P. 387–394.
- Borsodi A.K. et al. Diversity and ecological tolerance of bacteria isolated from the rhizosphere of halophyton plants living nearby Kiskunság soda ponds, Hungary // Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica. 2015. Vol. 62. P. 183–197.
- Castellanos T. et al. Search of environmental descriptors to explain the variability of the bacterial diversity from maize rhizospheres across a regional scale // European Journal of Soil Biology. 2009. Vol. 45. P. 383–393.
- Dimkpa C., Weinand T., Asch F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions // Plant, Cell and Environment. 2009. Vol. 32. P. 1682–1694.
- *Ibekwe A.M.* et al. Bacterial diversity in cucumber (*Cucumis sativus*) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron // Soil Biology and Biochemistry. 2010. Vol. 42. P. 567–575.
- Mapelli F. et al. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with Salicornia growing in Tunisian hypersaline soils // BioMed Research International. 2013. Vol. 2013. P. 1–13.
- *Oren A.* Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity // Saline Systems. 2008. Vol. 4, Iss. 2. P. 1–13.
- Romanenko L.A. et al. Pseudomonas xanthomarina sp. nov., a novel bacterium isolated from marine ascidian // The Journal of General and Applied Microbiology. 2005. Vol. 51, № 2. P. 65–71.
- Wang H. et al. Diversity of rhizosphere bacteria associated with different soybean cultivars in two soil conditions // Soil Science and Plant Nutrition. 2014. Vol. 60. P. 630–639.
- Yang H. et al. Salinity altered root distribution and increased diversity of bacterial communities in the rhizosphere soil of Jerusalem artichoke // Scientific Reports. 2016. V. 20687, № 6. P. 1–10.

References

- Lopatovskaya O.G., Sugachenko A.A. *Melioraciya* počv. *Zasolennye počvy* [Land reclamation. Saline soils]. Irkutsk, 2010, 101 p. (In Russ.).
- Zvyagintsev D.G., ed. *Metody počvennoj mikrobiologii i biochimii* [Methods of soil microbiology and biochemistry]. Moscow, MSU Publ., 1991, 303 p. (In Russ.).
- Maggeran E. *Ekologičeskoe raznoobrazie i ego iz-merenie* [Ecological diversity and its dimension]. Moscow, Mir Publ., 1992, 173 p. (In Russ.).
- Mineev V.G., ed. *Praktikum po agrochimii* [Workshop on agrochemistry]. Moscow, MSU Publ., 2001, 689 p. (In Russ.).
- Rozanova E.P., Nazina T.N. [Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their activity in oil reservoirs]. *Mikrobiologiya* V. 51 (1982): pp. 324-348. (In Russ.).
- Anan'ina L.N., Yastrebova O.V., Demakov V.A., Plotnikova E.G. Naphthalene-degrading bacteria of the genus Rhodococcus from the Verkhne-kamsk salt mining region of Russia. *Antonie van Leeuwenhoek* V. 100, Iss. 2 (2011): pp. 309-316.
- Bharathkumar S., Kumar R., Paul D., Prabavathy V.R., Nair S. Characterization of the predominant bacterial population of different mangrove rhizosphere soils using 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism (SSCP). World Journal of Microbiology and Biotechnology V. 24 (2008): pp. 387-394.
- Borsodi A.K., Bárány Á., Krett G., Márialigeti K., Szili-Kovács T. Diversity and ecological tolerance of bacteria isolated from the rhizosphere of halophyton plants living nearby Kiskunság soda ponds, Hungary. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica* V. 62 (2015): pp. 183-197.
- Castellanos T., Dohrmann A.B., Imfeld G., Baumgarte S., Tebbe C.C. Search of environmental descriptors to explain the variability of the

- bacterial diversity from maize rhizospheres across a regional scale. *European Journal of Soil Biology* V. 45 (2009): pp. 383-393.
- Dimkpa C., Weinand T., Asch F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment* V. 32 (2009): pp. 1682-1694.
- Ibekwe A.M., Poss J.A., Grattan S.R., Grieve C.M., Suarez D. Bacterial diversity in cucumber (Cucumis sativus) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron. *Soil Biology and Biochemistry* V. 42 (2010): pp. 567-575.
- Mapelli F., Marasco R., Rolli E., Barbato M., Cherif H., Guesmi A., Ouzari I., Daffonchio D., Borin S. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with Salicornia growing in Tunisian hypersaline soils. *BioMed Research International* V. 2013 (2013): pp. 1-13.
- Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* V. 4, Iss. 2 (2008): pp. 1-13.
- Romanenko L.A., Uchino M., Falsen E., Lysenko A.M., Zhukova N.V., Mikhailov V.V. Pseudomonas xanthomarina sp. nov., a novel bacterium isolated from marine ascidian. *The Journal of General and Applied Microbiology* V. 51 N 2 (2005): pp. 65-71.
- Wang H., Wang S.D., Jiang Y., Zhao S.J., Chen W.X. Diversity of rhizosphere bacteria associated with different soybean cultivars in two soil conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* V. 60 (2014): pp. 630-639.
- Yang H., Hu J., Long X., Liu Z., Rengel Z. Salinity altered root distribution and increased diversity of bacterial communities in the rhizosphere soil of Jerusalem artichoke. *Scientific Reports* V. 20687 N 6 (2016): pp. 1-10.

Поступила в редакцию 06.09.2017

Об авторах

Назаров Алексей Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

ORCID: 0000-0003-4753-4061 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; nazarov@iegm.ru; (342)2808431

доцент кафедры ботаники и генетики растений ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» 614099, Пермь, ул. Букирева, 15

About the authors

Nazarov Alexey Vladimirovich, candidate of biology, senior researcher of laboratory of molecular microbiology and biotechnology Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS.

ORCID: 0000-0003-4753-4061 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; nazarov@iegm.ru; (342)2808431

associate professor of the Department of botany and plant genetics

Perm State University.

15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990

Корсакова Екатерина Сергеевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии

ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

ORCID: 0000-0002-6907-7562

614081, г. Пермь, ул. Голева, 13;

korsakovaekaterina08@gmail.com; (342)2808431

доцент кафедры ботаники и генетики растений ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Ананьина Людмила Николаевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии

ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

ORCID: 0000-0003-4721-2863

614081, Пермь, ул. Голева, 13;

ludaananyina@mail.ru; (342)2808431

Плотникова Елена Генриховна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

ORCID: 0000-0002-0107-0719 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; peg el@mail.ru; (342)2808431

профессор кафедры ботаники и генетики растений

ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» 614099, Пермь, ул. Букирева, 15

Korsakova Ekaterina Sergeyevna, candidate of biology, junior researcher of laboratory of molecular microbiology and biotechnology Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS.

ORCID: 0000-0002-6907-7562 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; korsakovaekaterina08@gmail; (342)2808431

associate professor of the Department of botany and plant genetics

Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990

Anan'ina Lyudmila Nikolaevna, candidate of biology, researcher of laboratory of molecular microbiology and biotechnology Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS.

ORCID: 0000-0003-4721-2863 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; ludaananyina@mail.ru; (342)2808431

Plotnikova Elena Genrikhovna, doctor of biology, leading researcher of laboratory of molecular microbiology and biotechnology
Institute of Ecology and Genetics of
Microorganism UB RAS.

ORCID: 0000-0002-0107-0719 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; peg_el@mail.ru; (342)2808431

professor of the Department of botany and plant genetics

Perm State University.

15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990