

## ОЦЕНКА ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* 26 D И *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *THURINGIENSIS* ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН *TRIFOLIUM PRATENSE* L.

© 2014 А.Р. Гаджиев

Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, г. Магадан  
Северо-Восточный государственный университет, г. Магадан

Поступила в редакцию 13.01.2014

Излагаются результаты исследований по оценке ингибирующей активности штаммов *Bacillus subtilis* 26 D и *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Используются параметрические и непараметрические методы анализа. Обосновывается вывод, что энтомопатогенный штамм *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* существенно угнетает рост и развитие прорастающих семян *Trifolium pratense* L.. Штамм *Bacillus subtilis* 26 D не фитотоксичен.

**Ключевые слова:** фитотоксичность, бактерии, *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*, *Bac. subtilis* 26 D, семена, всхожесть, *Trifolium pratense* L., растения.

Спорообразующие бактерии рода *Bacillus* синтезируют большое количество физиологически активных веществ, среди которых особое значение в изучении отводится стимуляторам и ингибиторам роста и развития растений. Так, эндофитный штамм *Bac. subtilis* 26 D продуцирует вещества, оказывающие сильное ингибирующее действие на прорастающие семена *Triticum sp. L.*, а среди энтомопатогенных культур *Bac. thuringiensis*, естественных регуляторов численности насекомых, 92% из 143-х изучавшихся штаммов угнетают рост ее колеоптелей [7; 8].

**Цель исследования:** оценить фитотоксичность штаммов *Bac. subtilis* 26 D и *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* при прорастании семян *Trifolium pratense* L.

*Trifolium pratense* L. широко распространенный вид растений на территории Северного Приохотья. Вид играет огромную роль в образовании растительного покрова: является распространенным медоносом, применяется как декоративная и пастбищная культура, используется для рекультивации нарушенных почв.

Для достижения поставленной цели устанавливалась всхожесть семян *Trifolium pratense* L. и определялась сырая масса проросших семян в контроле и культуральных средах с бациллами.

**Материал и методика исследования.** В качестве материала использовались штаммы *Bac. subtilis* 26 D, *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* и семена *Trifolium pratense* L. (рис. 1).

Ингибирующая активность штаммов оценивалась путем определения *сырой массы проросших семян Trifolium pratense* L. и их всхожести. Под

*Гаджиев Артем Русланович, научный сотрудник лаборатории геоботаники ИБПС ДВО РАН, старший преподаватель кафедры биологии и химии Северо-Восточного государственного университета. E-mail: art1978@bk.ru*

*всхожестью* понимается количество появившихся всходов, выраженное в процентах к количеству высеянных семян [1; 3; 5; 6].

Опыты проводились в 4-х вариантах с 5-ти кратной повторностью. Методика постановки опыта заключалась в следующем. В *первом* контрольном варианте опыта семена *Trifolium pratense* L. по 50 шт. в каждой из 5-ти чашек Петри (всего 250 семян) проращивались четверо суток в термостате при  $t=+25^{\circ}\text{C}$  на дистиллированной воде (5 мл. на одну чашку Петри). Во *втором* контрольном варианте семена проращивались на жидкой питательной среде (ПВМБ - протеино-витаминно-минеральный бульон) так же четверо суток в термостате при той же температуре. В *третьем* и *четвертом* вариантах в течении двух суток штаммы *Bac. subtilis* 26 D и *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* соответственно культивировались в термостате при  $t=+25^{\circ}\text{C}$  на жидких питательных средах (ПВМБ, 5 мл. на чашку Петри). После этого в чашки Петри с культуральной жидкостью добавляли семена *Trifolium pratense* L. по 50 шт. в каждую из 5-ти чашек Петри. Засеянные чашки семенами помещались в термостат с  $t=+25^{\circ}\text{C}$  еще на четверо суток для их проращивания.

По истечении указанного времени во всех чашках Петри подсчитывали число проросших семян и измеряли их вес на электронных весах серии "Highland" Adam HCB 1002. Полученные результаты сравнивали с контролем. Обработка данных производилась с помощью программ "Microsoft Office Excel 2007" и "Statistica 6".

**Результаты и их обсуждение.** Средние арифметические результаты, полученные во всех вариантах опыта, для установленного уровня значимости  $P=0,05$  оказались достоверны (все  $t > t_{\text{таб.}} = 2,78$ ) (табл. 1).



а)

б)

**Рис. 1.** 7-ми суточные колонии бактерий на протеино-витаминно-минеральном агаре (ПВМА): а – *Bacillus subtilis* 26 D; б – *Bac. thuringiensis var. thuringiensis*

**Таблица 1.** Всхожесть и сырая масса проросших семян в контрольных и культуральных средах с *Bac. subtilis* 26 D и *Bac. thuringiensis var. thuringiensis* на 4-ые сутки

Вариант опыта	Всхожесть			Сырая масса проросших семян		
	$M_x [M_x \pm 2,78 \cdot m]$ $P=0,05, (\%)$	m, (%)	t	$M_x [M_x \pm 2,78 \cdot m] P=0,05,$ (г)	m, (г)	t
1	56,4 [43,9; 68,9]	$\pm 4,5$	12,5	0,59 [0,46; 0,73]	$\pm 0,05$	11,8
2	55,2 [46,8; 63,6]	$\pm 3,0$	18,4	0,55 [0,44; 0,67]	$\pm 0,04$	13,8
3	51,6 [36,5; 66,7]	$\pm 5,4$	9,6	0,43 [0,21; 0,65]	$\pm 0,08$	5,4
4	48,8 [37,1; 60,5]	$\pm 4,2$	11,6	0,35 [0,23; 0,46]	$\pm 0,04$	8,8

**Примечание:**  $M_x$  – средняя арифметическая выборки;  $[M_x \pm 2,78 \cdot m]$  – доверительный интервал для  $M_x$ ; m – стандартная ошибка средней; t – достоверность средней арифметической

Всхожесть семян в контрольных средах в первом и во втором вариантах была практически одинаковой:  $56,4 \pm 4,5\%$  и  $55,2 \pm 3,0\%$  соответственно. Разница между вариантами составила  $1,2 \pm 5,4\%$ . Сырая масса проросших семян в первом варианте:  $0,59 \pm 0,05$  г и  $0,55 \pm 0,04$  г во втором, с разницей  $0,04 \pm 0,06$  г или 6,8% (табл. 1, 2).

Вышеприведенные результаты показывают, что жидкая питательная среда в контроле во втором варианте в сравнении с первым для семян не токсична. Так как в опытах с бациллами использовались жидкие питательные среды, то полученные результаты в третьем варианте в дальнейшем сравнивались с контролем во втором варианте.

Всхожесть семян в культуральных средах с *Bac. subtilis* 26 D в третьем и *Bac. thuringiensis var. thuringiensis* в четвертом варианте составила  $51,6 \pm 5,4\%$  и  $48,8 \pm 4,2\%$  соответственно (рис. 2).

Разница между вторым контрольным и третьим вариантом составила  $3,6 \pm 6,2\%$ , а между вторым и четвертым –  $6,4 \pm 5,2\%$  (табл. 2). Сырая масса проросших семян в третьем варианте с *Bac.*

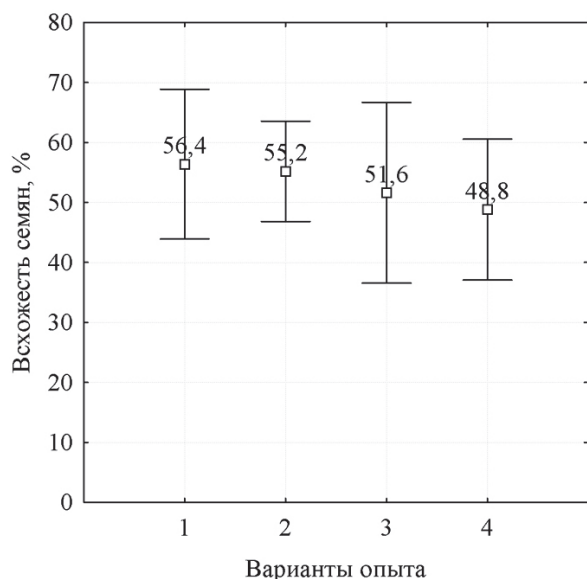
*subtilis* 26 D составила  $0,43 \pm 0,08$  г, а в контроле во втором варианте –  $0,55 \pm 0,04$  г (рис. 3). Разница между вариантами –  $0,12 \pm 0,09$  г (21,8%).

Сырая масса проросших семян в третьем варианте с *Bac. thuringiensis var. thuringiensis* составила  $0,35 \pm 0,04$  г, а в контроле во втором варианте –  $0,55 \pm 0,04$  г. Разница между вариантами –  $0,20 \pm 0,06$  г или 36,4%.

Имеющиеся между вариантами различия проверялись на достоверность статистическими методами анализа с использованием параметрического t - критерия Стьюдента и непараметрического U - критерия Вилкоксона-Манна-Уитни [1; 2; 4; 9; 10; 11, 12].

При проверке статистических гипотез использовались два понятия:  $H_0$  - это нулевая гипотеза о сходстве или отсутствии различий в вариантах и  $H_1$  - альтернативная гипотеза о имеющихся различиях в вариантах опыта.

**Формулировка гипотез.** *Всхожесть семян:* 1)  $H_0$ : разница между вариантами недостоверна, если  $U_{эмп.} \geq U_{кр.}$ , или  $P_{эмп.} > 0,05$ , или  $t_{факт.} \leq t_{таб.}$ .

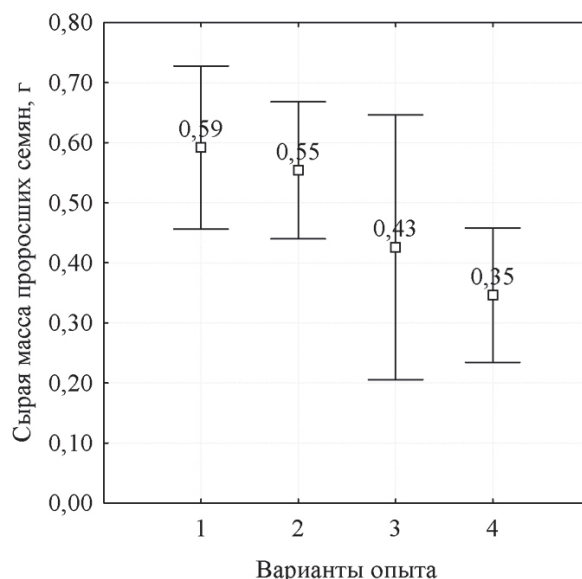


Условные обозначения: □ - средняя арифметическая, (M<sub>x</sub>); — - двусторонний интервал для M<sub>x</sub>, [M<sub>x</sub> ±2,78•m].

Рис. 2. Всхожесть семян *Trifolium pratense* L. в контроле и с бациллами

Штаммы *Bac. subtilis* 26 D и *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* не влияют на всхожесть семян *Trifolium pratense* L.. 2) H<sub>1</sub>: разница между вариантами достоверна, если U<sub>эмп.</sub> ≤ U<sub>кр.</sub>, или P<sub>эмп.</sub> < 0,05, или t<sub>факт.</sub> ≥ t<sub>таб.</sub>. Штаммы *Bac. subtilis* 26 D и *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* влияют на всхожесть семян *Trifolium pratense* L.

Сырая масса проросших семян: 1) H<sub>0</sub>: разница между вариантами недостоверна, если U<sub>эмп.</sub> ≥ U<sub>кр.</sub>, или P<sub>эмп.</sub> > 0,05, или t<sub>факт.</sub> ≤ t<sub>таб.</sub>. Штаммы *Bac. subtilis* 26 D и *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* не ингибируют прорастающие семена *Trifolium pratense* L. 2) H<sub>1</sub>: разница между вариантами достоверна, если U<sub>эмп.</sub> ≤ U<sub>кр.</sub>, или P<sub>эмп.</sub> < 0,05, или t<sub>факт.</sub> ≥ t<sub>таб.</sub>. Штаммы *Bac. subtilis* 26 D и *Bac. thuringiensis*



Условные обозначения: □ - средняя арифметическая, (M<sub>x</sub>); — - двусторонний интервал для M<sub>x</sub>, [M<sub>x</sub> ±2,78•m].

Рис. 3. Сырая масса проросших семян *Trifolium pratense* L. в контроле и с бациллами

var. *thuringiensis* ингибируют прорастание семян *Trifolium pratense* L.

Таким образом, в эксперименте можно констатировать достоверные различия между средними арифметическими в вариантах опыта, если U<sub>эмп.</sub> ≤ U<sub>кр.</sub>, или P<sub>эмп.</sub> < 0,05, или t<sub>факт.</sub> ≥ t<sub>таб.</sub> (табл. 2).

Разница между контрольным вторым и третьим вариантом с *Bac. subtilis* 26 D по всхожести и сырой массе проросших семян *Trifolium pratense* L. оказалась не достоверна. *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* также не повлиял на всхожесть, т.е. нулевая гипотеза осталась не опровергнутой (табл. 2).

Альтернативная гипотеза была принята лишь в четвертом варианте по сравнению с кон-

Таблица 2. Оценка достоверности различий между средними арифметическими в вариантах опыта

Статистические показатели	Варианты опыта					
	Всхожесть			Сырая масса проросших семян		
	1-2	2-3	2-4	1-2	2-3	2-4
U <sub>эмп.</sub> (n <sub>1</sub> = 5; n <sub>2</sub> = 5)	12,0	9,5	6,5	7,5	6,0	1,0
P <sub>эмп.</sub>	0,917	0,531	0,210	0,296	0,175	0,016
Суммарный ранг группы 1	28,0	30,5	33,5	32,5	34,0	39,0
Суммарный ранг группы 2	27,0	24,5	21,5	22,5	21,0	16,0
U <sub>эмп.</sub> ≤ U <sub>кр.</sub> (U <sub>кр.</sub> = 4; P = 0,05)	нет	нет	нет	нет	нет	да
P <sub>эмп.</sub> < 0,05	нет	нет	нет	нет	нет	да
d, (% , г)	1,2	3,6	6,4	0,04	0,12	0,20
md, (% , г)	±5,4	±6,2	±5,2	±0,06	±0,09	±0,06
t <sub>факт.</sub>	0,22	0,58	1,23	0,67	1,33	3,33
t <sub>факт.</sub> ≥ t <sub>таб.</sub> (t <sub>таб.</sub> = 2,31; P = 0,05)	нет	нет	нет	нет	нет	да

Примечание: U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни (эмпирический и критический); P – уровень значимости (эмпирический); d – разница между средними арифметическими в вариантах; md – ошибка разности; t<sub>факт.</sub> и t<sub>таб.</sub> – критерий существенности фактический и табличный по Стьюденту, при этом число степеней свободы равно: v = n<sub>1</sub>+n<sub>2</sub> - 2; v = 5+5-2=8; t<sub>таб.</sub> = 2,31.

тролем, на что указывают различия в показателях сырой массе проросших семян *Trifolium pratense* L..

**Выводы:** Проведенные исследования позволяют достоверно утверждать, что штамм *Bac. subtilis* 26 D не фитотоксичен. Продукты его метаболизма не угнетают развитие семян *Trifolium pratense* L. и не влияют на их всхожесть. Штамм *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* также не влияет на всхожесть семян *Trifolium pratense* L., однако ингибирует их дальнейший рост и развитие, что свидетельствует о фитотоксичности штамма.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Возняковская Ю.М. Микрофлора растений и урожай. Л.: Колос, 1969. С. 187-222.
2. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина, 1973. С. 21-90.
3. Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А. и др. Методы экспериментальной микологии. Справочник. [под ред. В.И. Билай]. Киев: Наукова думка, 1982. С. 322.
4. Зайцев Г.Н. Математика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1990. С.13-15.
5. Зенова Г.М., Степанов А.Л., Лихачева А.А., Манучарова Н.А. Практикум по биологии почв. М.: МГУ, 2002. С. 88.
6. Казеев К.Ш., Колесников С.И., Вальков В.Ф. Биологическая диагностика и индикация почв: методология и методы исследований. Ростов н/Д: Изд-во РГУ, С.170-172.
7. Лукьянцев М.А. Особенности биологической активности эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* Cohn. с различной степенью антагонизма к фитопатогенным грибам: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Саратов, 2010. С. 11-13.
8. Малхасян А.М. Изучение образования ингибиторов и стимуляторов роста растений разными видами аэробных спорообразующих бактерий: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Ереван, 1973. С.9.
9. Малков П.Ю. Количественный анализ биологических данных. Горно-Алтайск: РИО ГАГУ, 2005. С. 28, 29.
10. Петру А., Сэбин К. Наглядная статистика в медицине [пер. с англ]. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. С. 31.
11. Рокшцкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск: Вышэйш. школа, 1973. С. 83, 84.
12. Vasilyev A.V., Khamidullova L.R., Podurueva V.V., Solovuyov S.G. Investigation of toxicity of waste water of "AVTOVAZ" company by using biological testing methods // Safety of Technogenic Environment. 2012. № 2. С. 72-75.

#### EVALUATION OF INHIBITORY ACTIVITY OF THE STRAINS *BACILLUS SUBTILIS* 26 D AND *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *THURINGIENSIS* DURING GERMINATION OF SEEDS OF *TRIFOLIUM PRATENSE* L.

© 2014 A.R. Gadzhiev  
Institute of Biological Problems of the North,  
Far-Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Magadan  
North-eastern State University, Magadan

The article assesses the inhibitory activity of strains of *Bacillus subtilis* 26 D and *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Parametric and nonparametric analyses are used. Entomopathogenic strain of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* significantly inhibits the growth and development of germinating seeds *Trifolium pratense* L. Strain *Bacillus subtilis* 26 D is not phytotoxic.

**Key words:** plant communities, soil, phytotoxicity, bacteria, *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*, *Bac. subtilis* 26 D, seed, germination, *Trifolium pratense* L., plants.