

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИЙ *Bacillus subtilis* № 2 И ГУМИНОВОГО ПРЕПАРАТА НА ПЛОДООБРАЗОВАНИЕ ПЕРЦА СЛАДКОГО*

В.Н. Пищик,^{1,2} кандидат биологических наук, **Н.И. Воробьев**,² кандидат технических наук,
О.Р. Удалова,¹ кандидат сельскохозяйственных наук,
В.Г. Сурин,³ кандидат физико-математических наук,
Ю.В. Хомяков,¹ кандидат биологических наук,
А.А. Попов,² кандидат сельскохозяйственных наук

¹Агрофизический научно-исследовательский институт,
196660, Санкт-Петербург, Гражданский пр., 14

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3

³Центр междисциплинарных исследований по проблемам окружающей среды,
Санкт-Петербург, наб. Кутузова, 4
E-mail: veronika-bio@rambler.ru

*Исследовали эффективность действия бактерий *Bacillus subtilis* № 2 отдельно и в технологии совместного применения с гуминовым препаратом Стимулайф на урожайность и формирование плодов сладкого перца *Capsicum annuum*. Установлено, что применение этих бактерий приводит к уменьшению коэффициента вариации массы листьев и плодов растений. С помощью граф-анализа выявлена максимальная направленность действия изучаемых препаратов: бактерий – на увеличение количества листьев, Стимулайфа – на сокращение вегетационного периода растений, бактерий + Стимулайфа – на повышение количества плодов на одном растении. Методом факторного анализа показано, что при совместном применении *Bacillus subtilis* № 2 и гуминового препарата возникает негативный синергетический эффект в отношении содержания суммы хлорофиллов (a+b) и продолжительности вегетационного периода. Выявлены сортовые различия в реакциях растений перца на применяемые препараты. Сделан вывод о том, что наряду с непосредственным действием гуминового препарата на растения, его физиологическая активность также может проявляться опосредованно, через активацию синтеза ауксинов PGPR бактериями, находящимися в ассоциативных отношениях с растениями.*

MODE OF ACTION OF BACTERIA *Bacillus subtilis* № 2 AND HUMIC PREPARATION ON FRUIT FORMATION IN SWEET PEPPER

Pishchik V.N.^{1,2}, **Vorobyov N.I.**², **Udalova O.R.**,¹ **Surin V.G.**³,
Khomyakov Yu.V.¹, **Popov A.A.**²

¹Agrophysical Research Institute, 196600, Sankt-Peterburg, Grazhdanskiy pr., 14

²Scientific Institution All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology,
Sankt.-Petersburg, Pushkin, 196608, sh. Podbelsky, 3

³Center for Interdisciplinary Research on Environmental Problems of the Russian Academy of Sciences,
Sankt. Petersburg, nab. Kutuzova, 14
E-mail: veronika-bio@rambler.ru

*The effectivity of action of bacteria *Bacillus subtilis* № 2 and humic preparation Stimulife on yield and fruit formation in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) in technologies of separated and joint use was studied. It was established that the use of bacteria *Bacillus subtilis* № 2 led to a decrease in the coefficient of variation in the mass of the leaves of the pepper plants and the coefficient of variation in the masses of the fruits of the plants. The maximum directivity of action of the preparations studied was revealed with the help of graph analysis. The action of bacteria *Bacillus subtilis* № 2 is directed on increasing the number of leaves of pepper plants, HP Stimulife - on reducing the vegetative period of plants, and joint application – on increasing the number of fruits on a single plant. In factor analysis, it was shown that a negative synergistic effect appeared with respect to chlorophyll (a+b) and the duration of the growth stages when *Bacillus subtilis* № 2 and HP Stimulife were combined used. The variety differences in the reactions of pepper plants to the preparations used were revealed.*

Ключевые слова: бактерии *Bacillus subtilis* № 2, гуминовый препарат Стимулайф, перец сладкий *Capsicum annuum*, коэффициент вариации морфометрических характеристик растений

Key words: bacteria *Bacillus subtilis* № 2, humic preparation Stimulife, sweet pepper *Capsicum annuum*, coefficient of variation of morphometric characteristics of plants

Интерес к применению биологических препаратов на основе стимулирующих рост растений бактерий (PGPR) в растениеводстве связан с возможностью повышения эффективности минерального питания растений и сокращения доз минеральных удобрений [1], а также с защитой культур от патогенов [2]. В связи с положительным действием PGPR на урожайность

возрастают масштабы их использования в сельском хозяйстве различных стран мира [3-5]. Для повышения эффективности PGPR в последнее время ученые предложили применять их совместно с гуминовым препаратом [5], однако, механизм такого действия на растения изучен недостаточно.

Задачей исследования было изучение механизмов

* Работа выполнена по Госзаданию Агрофизического научно-исследовательского института №0667-2019-00013 и Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии № 0664-2019-0025.

действия PGPR и гуминового препарата на растения при совместном применении для разработки экологически безопасной агротехнологии интенсивного выращивания растений.

Методика. Гуминовый препарат Стимулайф – продукт переработки торфа и природный стимулятор роста растений [6]. Он содержит 70-80% гуминовых кислот, 1-2% сухого вещества, 12% общего N, 47% C, 3,5% H, 25-27% O, 0,3% P₂O₅, 0,25% K₂O, а также ауксины в концентрации 4 мг/л. PGPR-бактерии *Bacillus subtilis* №2 способны продуцировать до 15 мг ауксинов/л среды при росте на микробиологических средах с 0,2%-ным триптофаном, обладают цитокининовой активностью.

Вегетационные эксперименты с растениями перца сладкого (*Capsicum annuum* L.) сортов Ермак и Золушка из коллекции ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова проводили в условиях интенсивной светокультуры [7]. В качестве источников света использовали натриевые лампы высокого давления ДНаЗ-400. Интенсивность света в области ФАР составляла 100±10 Вт/м², продолжительность светового периода – 12 ч/сутки первые две недели после появления всходов, затем 14 ч/сутки. Температуру воздуха поддерживали в соответствии с биологическими требованиями культур: в период прорастания семян – 25-26°C, затем 24-26°C днем, 18-20°C – ночью. Относительная влажность воздуха составляла 60-70%. Растения выращивали в металлических сосудах объемом 3 л. В качестве корнеобитаемой среды применяли субстрат агрофит, разработанный в Агрофизическом НИИ [8] на основе верхового торфа низкой степени разложения с минеральными добавками, нейтрализованного до pH 6,2-6,4. На 1 м² вегетационной светоустановки размещали 20 растений в 5-кратной повторности. Подкормку растений осуществляли питательным раствором Кнопа 2 раза в неделю, в остальное время поливали водой. Препаратами обрабатывали листовую поверхность растений в фазы бутонизации и цветения (2 раза в течение вегетационного периода).

Схема опыта включала следующие варианты: 1 – контроль без обработки бактериями и гуминовым препаратом, 2 – обработка гуминовым препаратом, 3 – обработка бактериями, 4 – обработка совместно бактериями и гуминовым препаратом. Рабочая концентрация гуминового препарата составляла 0,1%. Стимулайф был простерилизован для удаления автохтонной микрофлоры при стандартном режиме автоклавирования. Бактерии *Bacillus subtilis* № 2 выращивали на сусло-агаре, затем смывали и гомогенизировали в стерильной воде, их титр для инокуляции растений составлял 4-6•10⁶ КОЕ/мл культуральной жидкости. Численность КОЕ бактерий в филлосфере растений определяли методом посева на твердую питательную среду сусло-агара во время фазы технической спелости растений.

Содержание суммарного хлорофилла (a+b) в листьях определяли в фазе цветения на спектрофотометре *Specol* [9]. Биохимический состав плодов растений изучали в фазе технической спелости [10]. Простой вегетационный индекс, определяющий физиологическое состояние растений, рассчитывали по формуле VI=Rgreen/Rnig с использованием методики, описанной ранее [11].

Графы максимальных коэффициентов корреляции между характеристиками растительно-микробной системы были построены по методике граф-анализа [12]. Весовые коэффициенты влияния факторов внешнего воздействия на морфометрические и биохимические характеристики растений и уровень синергетического влияния вычисляли по программе [13].

Результаты и обсуждение. Выявлены физиологические реакции растений на изучаемые препараты. Эти различия обусловлены механизмом их действия. Бактерии *Bacillus subtilis* № 2 достоверно увеличивали количество плодов (на 2-4 шт.) на одном растении (табл. 1), что подтверждает данные других исследователей [14]. Увеличение численности плодов объясняется фитогормональной активностью бактерий. В то же время средняя масса одного плода достоверно не изменялась по сравнению с контрольным вариантом (табл. 1).

Табл. 1. Изучаемые показатели растений перца в контроле и при обработке препаратами

Показатель	Ермак				Золушка			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Количество плодов, шт./растение	7,8с	7,6с	9,0б	8,8а	10,6с	10,6с	12,8б	14,8а
Средняя масса плодов, г/растение	308d	320с	345b	353а	360d	438с	606b	636а
Средняя масса 1 плода, г	38,5b	40,0а	38,3b	39,9а	32,7d	41,3с	43,3b	45,4а
Масса листьев, г/растение	85b	88b	93а	96а	159с	163с	178b	185а
Количество листьев /растение	42с	43с	45b	47а	74b	74b	76а	77а
Сумма хлорофиллов, мг/г листьев	2,3с	2,6b	3,0а	3,0а	2,4b	3,0а	3,1а	3,1а
VI = Rgreen/Rnig	9,0с	9,2с	9,5b	10а	9,2с	9,6b	9,8b	10,5а
Высота растений, см	27,7d	28,5с	30,3b	32,7а	49,0d	49,7с	68,3b	74,3а
Длина фенофазы, сут	97а	92b	89с	87d	125а	117b	114с	111d
Сумма углеводов в плодах,%	5,2с	5,6b	5,8b	7,1а	5,5с	5,6с	5,8b	6,5а
Аскорбиновая кислота, мг/100 г сырого вещества плодов	71с	72с	75b	90а	59d	63с	70b	79а
Сухое вещество в плодах,%	8,3b	9,0а	8,6с	9,0а	8с	8,3b	8,6а	8,6а

Примечание. 1-4 – варианты опыта. В каждой строке достоверные различия средних измеряемых признаков обозначены буквами алфавита для p<0,05.

Табл. 2. Весовые коэффициенты к факторам: *Bacillus subtilis* № 2 (W_A), Стимулайф (W_B), *Bacillus subtilis* № 2+ Стимулайф (W_{AxB})

Показатель	W_A		W_B		W_{AxB}	
	Ермак	Золушка	Ермак	Золушка	Ермак	Золушка
Количество плодов, шт./растение	0,65	0,61	0,24	0,34	0,23	0,16
Средняя масса плодов, г/растение	0,68	0,68	0,19	0,16	-0,06*	-0,10
Масса листьев, г/растение	0,66	0,68	0,26	0,20	-0,03*	0,06*
Количество листьев /растение	0,65	0,66	0,27	0,24	0,05*	0,11*
Сумма хлорофиллов, мг/г листьев	0,63	0,48	0,25	0,38	-0,28	-0,50
VI= Rnit/Rgreen	0,61	0,56	0,33	0,41	0,20	0,16
Высота растений, см	0,63	0,69	0,29	0,11	0,21	0,12
Длительность вегетации, сут	-0,60	-0,57	-0,33	-0,38	0,23	0,24
Сумма углеводов в сыром веществе плодов	0,52	0,51	0,42	0,40	0,32	0,40
Аскорбиновая кислота, мг/100 г сырого вещества плодов	0,50	0,62	0,39	0,31	0,45	0,18
Среднее значение абсолютной величины коэффициентов	0,61	0,61	0,30	0,29	0,20	0,20

Примечание. Стандартная ошибка для коэффициентов W_A и W_B – 0,03, W_{AxB} – 0,06.
*Коэффициент не отличается от нуля.

При обработке Стимулайфом прибавка урожайности достигалась в основном за счет увеличения средней массы одного плода, что согласуется с выявленным ранее механизмом ускорения поступления питательных веществ гуминового препарата в растение вследствие повышения проницаемости клеточной мембраны [15]. Количество плодов изменялось незначительно. При использовании Стимулайфа достоверно увеличивались количество сухого вещества, сумма сахаров и значительно – содержание аскорбиновой кислоты в плодах (табл. 1). Совместное применение гуминового препарата и бактерий приводило к росту общего количества сахаров и аскорбиновой кислоты. Значение большинства признаков у двух сортов растений перца существенно различалось, что свидетельствует о неодинаковой их чувствительности и реакции на внешние воздействия; при этом уменьшалась продолжительность вегетационного периода сортов Ермак и Золушка соответственно на 10 и 14 дней. Наибольшее сокращение срока вегетации наблюдали при совместном действии обоих препаратов, более отзывчивым на них оказался сорт Золушка (табл. 1).

При применении бактерий уменьшались коэффициенты вариации индивидуальных масс листьев и плодов растений (рис. 1, 2). Коэффициент корреляции между ними у растений сорта Золушка составил 0,9, так же, как и у сорта Ермак. Таким образом, бактерии *Bacillus subtilis* № 2 способствовали оптимизации минерального питания и ассимиляционных процессов в растении. Наши данные согласуются с результатами других исследователей об уменьшении коэффициентов вариации площади листовой поверхности растений пшеницы при внесении микроудобрений [16].

Методом факторного анализа определены величины весовых коэффициентов реакции растений на применяемые препараты (табл. 2). Показано, что индивидуальное воздействие бактерий на растения сортов Ермак и Золушка ($W_A = 0,61, 0,61$) приводит к возрастанию коэффициентов основных морфологических характеристик таких, как масса ($W_A = 0,68, 0,68$) и количество листьев ($W_A = 0,65; 0,66$), высота растений ($W_A = 0,63, 0,69$), а также содержание суммы хлорофиллов

($W_A = 0,63; 0,48$). При этом повышается величина вегетационного индекса – от 9 до 10 и от 9,2 до 10,5, а также содержание суммы хлорофиллов в растениях – от 2,3 до 3,0 и от 2,4 до 3,1 мг/г листьев для растений перца соответственно сорта Ермак и сорта Золушка (табл. 1). При применении бактерий увеличивалось количество листьев (табл. 1).

Возрастание биомассы листьев и содержания суммы хлорофиллов в них привело к формированию большей продуктивности растений – достоверному повышению количества плодов на растении и урожайности перца. Аналогичные результаты мы получили ранее для растений томата [17]. Бактерии *Bacillus subtilis* № 2 также сокращали длительность вегетационного периода растений сортов Ермак и Золушка ($W_A = -0,61$ и $-0,67$). С помощью факторного анализа выявлен негативный синергетический эффект совместного применения Стимулайфа и бактерий, то есть уменьшение данного периода оказывается меньше ожидаемого от суммы индивидуальных воздействий бактерий и гуминового препарата. Это означает, что физиологические процессы в растениях под действием двух препаратов на некоторой стадии конкурируют между собой.

При совместном применении препаратов отмечено уменьшение численности бактерий *Bacillus subtilis* № 2 в филлосфере ($3,2 \cdot 10^4$ КОЕ) в 5,6 раза по сравнению с их индивидуальным внесением ($5,7 \cdot 10^3$ КОЕ). Этот результат согласуется с ранее полученным на растениях салата и с рекомендациями о снижении концентрации гуминового препарата при совместном применении с бактериями *Bacillus subtilis* № 2 [11].

Граф-анализ (рис. 3) позволил получить схему причинно-следственных связей в растительно-микробной системе при действии изучаемых препаратов на морфометрические характеристики растений и продолжительность периода их вегетации. Так, бактерии *Bacillus subtilis* № 2 непосредственно влияли на увеличение массы листьев растений. Действие же Стимулайфа было направлено на ускорение физиологических процессов развития растений и сокращение продолжительности вегетационного периода. При совместном действии препаратов повышалась численность плодов на растении.

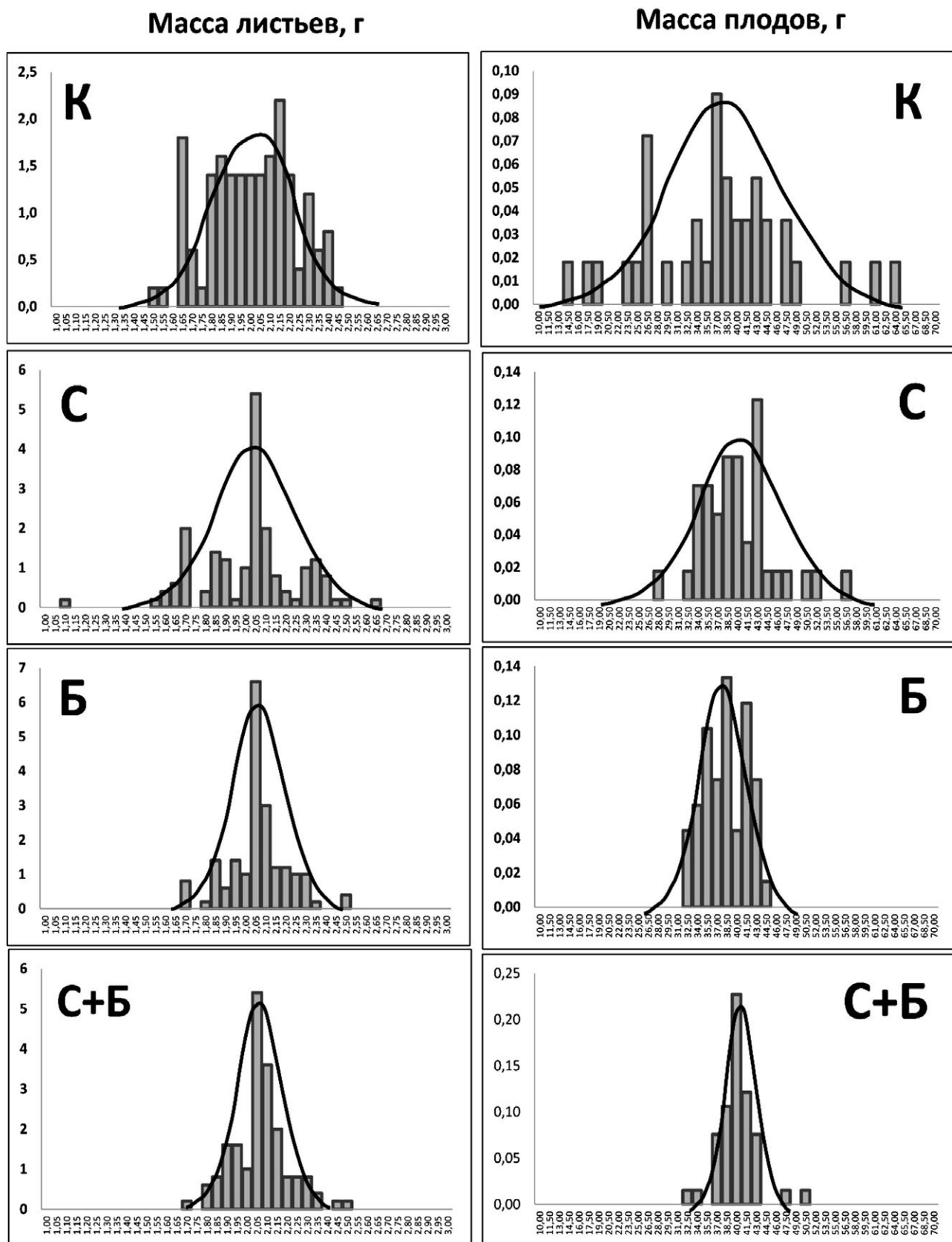


Рис. 1. Плотность распределения масс листьев и плодов растения сорта Ермак в вариантах: К – контроль, С – Стимулайф, Б – *Bacillus subtilis* № 2, С+Б – Стимулайф + *Bacillus subtilis* № 2.

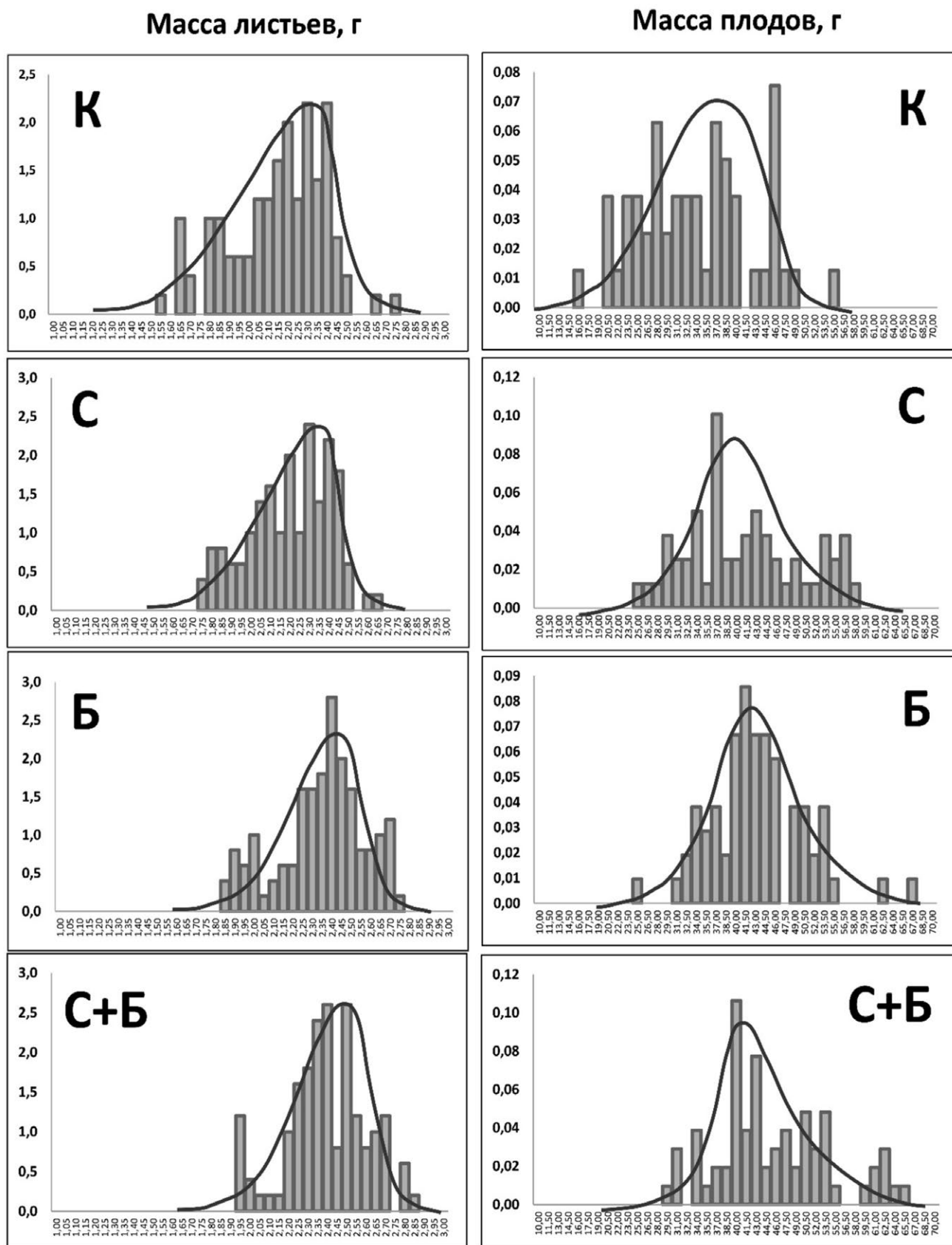


Рис. 2. Плотность распределения массы листьев и плодов растения сорта \Золушка в вариантах: К – контроль, С – Стимулайф, Б – *Bacillus subtilis* № 2, С+Б – Стимулайф + *Bacillus subtilis* № 2.

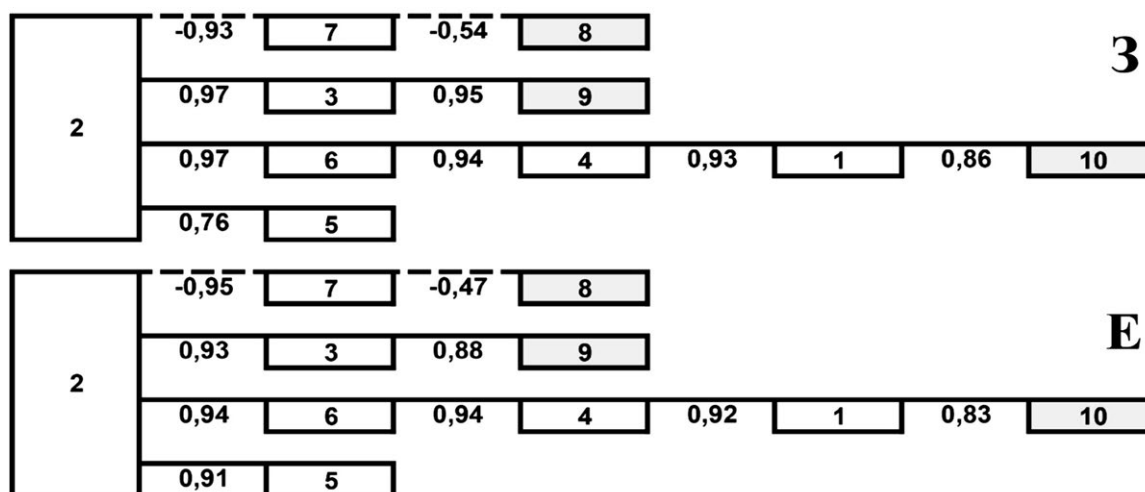


Рис. 3. Граф непосредственных связей между измеряемыми характеристиками растений и действием препаратов. 3 – сорт Золушка; Е – сорт Ермак; 1 – количество плодов, шт./растение; 2 – масса плодов, г/растение; 3 – масса листьев, г/растение; 4 – количество листьев, шт./растение; 5 – сумма хлорофиллов, мг/г листьев; 6 – высота растений, см; 7 – длительность вегетационного периода, сут; 8 – Стимулайф; 9 – *Bacillus subtilis* № 2; 10 – Стимулайф + *Bacillus subtilis* № 2.

Таким образом, выявлен комплекс физиологических ответов растений перца на морфологическом уровне на действие бактерий *Bacillus subtilis* № 2 и гуминового препарата Стимулайф.

Литература.

1. Завалин А.А. Биопрепараты, удобрения и урожай. – М.: ВНИИА, 2005. – 302 с.
 2. Ahetad M., Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. // *J. King Saud Uni. Sci.* – 2014. – V. 26. – P. 1-20.
 3. Чеботарь В.К., Петров В.Б., Шапошников А.И., Кравченко Л.В. Биохимические критерии оценки агрономически значимых свойств бактерий, используемых при создании микробиологических препаратов. // *Сельскохозяйственная биология.* – 2011. – № 3. – С. 119-122.
 4. Кожмяков А.П., Белоброва С.Н., Орлова А.Г. Создание и анализ базы данных по эффективности микробных препаратов комплексного действия. // *Сельскохозяйственная биология.* – 2011. – № 3. – С. 112-115.
 5. Ruzzi M., Aroca R. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. // *Scientia Horticulturae* – V.196. – P. 124-134.
 6. http://www.agrophys.com/Agrophys_files/Stimullife/stimullife.html.
 7. Панова Г.Г., Черноусов И.Н., Удалова О.Р., Александров А.В., Карманов И.В., Аникина Л.М., Судаков В.Л. Научно-технические основы круглогодичного получения высоких урожаев качественной растительной продукции при искусственном освещении. // *Доклады Россельхозакадемии.* – 2015. – №4. С. 17-21.
 8. Ермаков Е.И., Желтов Ю.И., Мильто Н.Е., Кучеров В.И. Почвогрунт для выращивания растений «Агрофит» // *Патент №2081555 РФ.* – БИ №17. – 1997.
 9. Lichtenthaler H.G. Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods Enzymol.* – 1987. – V.148. – 350-382.
 10. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Ме-

тоды биохимического анализа растений. – Л.: Агропромиздат, 3-е изд., 1987. – 430 С.
 11. Pishchik V.N., Vorobyov N.I., Walsh O.S., Surin V.G., Khomyakov Y.V. Estimation of synergistic effect of humic fertilizer and *Bacillus subtilis* on lettuce plants by reflectance measurements // *Journal of Plant Nutrition.* – 2016. – V.39. – №8. – P. 1074-1086.
 12. Воробьев Н.И., Свиридова О.В., Кутузова Р.С. Методические рекомендации по использованию граф-анализа в исследованиях систем, состоящих из биотических и абиотических компонентов. – СПб.: ВНИИСХМ, 2006. – 58 С.
 13. Воробьев Н.И., Проворов Н.А., Пицик В.Н., Свиридова О.В. Программа вычисления уровня синергизма – супрессии в ответной реакции биологических объектов на двухфакторное воздействие // *Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2016618107.* – Регистрация в Реестре программ для ЭВМ 21.07, 2016.
 14. Garcia J.A.I., Probanza A., Ramos B., Palomino M.R., Manero F.J.G. Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper // *Agronomie.* – 2004. – V.24. – №4. – P.169-176.
 15. Varanini Z, Pinton R. Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition / Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P, eds. // In: *The Rhizosphere.* Basel: Marcel Dekker. – 2001. – P. 141-58.
 16. Прохоренко Н.Б., Пахомова В.М., Хабиров Р.Н., Данышина Е.В. Морфологические параметры и урожайность у растений яровой пшеницы сорта Люба при оптимизации минерального питания // *Сельскохозяйственная биология.* – 2008. – № 5. – С. 43-47.
 17. Pishchik V.N., Vorobyev N.I., Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Totolian Areg A., Popov A.A., Khomyakov Y.V., Udalova O.R., Shibanov D.V., Vertebny V.E., Dubovitskaya V.I., Sviridova O.V., Walsh O.S., Shafian S. Impact of *Bacillus subtilis* on tomato plants growth and some biochemical characteristics under combined application with humic fertilizer. // *International Journal of Plant & Soil Science.* 2018. – V.22. – P.1-12.

Поступила в редакцию 02.07.18
 После доработки 12.12.18
 Принята к публикации 15.01.19