

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ /
BIOTECHNOLOGY OF FOOD AND BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.51.9>

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЦИНК-СОЛЮБИЛИЗИРУЮЩИХ РОСТСТИМУЛИРУЮЩИХ
РИЗОБАКТЕРИЙ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ РОСТА И БИОФОРТИФИКАЦИИ СЕЯНЦЕВ *TRITICUM AESTIVUM*

Научная статья

Малева М.Г.^{1,*}, Борисова Г.Г.², Дарказанли М.³, Собенин А.В.⁴

¹ORCID : 0000-0003-1686-6071;

²ORCID : 0000-0001-6663-9948;

³ORCID : 0000-0002-4254-6410;

⁴ORCID : 0000-0001-5513-5680;

^{1,2,3}Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Российская Федерация

⁴Институт горного дела Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (maria.maleva[at]mail.ru)

Аннотация

Представлены результаты исследования, направленного на оценку влияния двух селективных штаммов Zn-соллюбилизирующих ростстимулирующих ризобактерий (*Pseudomonas* sp. CTF2 и *Bacillus* sp. CTF3) на рост и биологическую ценность семян пшеницы при выращивании их в модельных условиях. Семена пшеницы стерилизовали и инокулировали выращенными на среде Лурия–Бертани штаммами (10^8 КОЕ/мл) в течение 2 часов. Инокуляция ризобактериями повышала надземную биомассу 18-дневных сеянцев (в среднем на 17%), содержание хлорофиллов и каротиноидов (в среднем на 20%), количество растворимых фенолов (в среднем на 18%) и биофильных элементов (N, P, K, Zn, Fe). При этом наиболее значимый эффект ризобактерии оказывали на накопление флавоноидов и железа, увеличивая их содержание в среднем в 1,6 раза. Результаты исследования позволяют рекомендовать использование изученных штаммов в качестве эффективных биоинокулянтов для биофортификации микрозелени.

Ключевые слова: пшеница озимая, биообогащение, фотосинтетические пигменты, фенольные соединения, биофильные элементы.

EFFICIENCY OF ZINC-SOLUBILIZING GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA USING TO IMPROVE
GROWTH AND BIOFORTIFICATION OF *TRITICUM AESTIVUM* SEEDLINGS

Research article

Maleva M.G.^{1,*}, Borisova G.G.², Darkazanli M.³, Sobenin A.V.⁴

¹ORCID : 0000-0003-1686-6071;

²ORCID : 0000-0001-6663-9948;

³ORCID : 0000-0002-4254-6410;

⁴ORCID : 0000-0001-5513-5680;

^{1,2,3}Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

⁴Institute of Mining of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

* Corresponding author (maria.maleva[at]mail.ru)

Abstract

The article presents the results of the study aimed at assessing the effect of two selective strains of Zn-solubilizing growth-promoting rhizobacteria (*Pseudomonas* sp. CTF2 and *Bacillus* sp. CTF3) on the growth and biological value of wheat seedlings in pot-scale experiment. Wheat seeds were sterilized and inoculated with strains grown on Luria-Bertani medium (10^8 CFU/mL) for 2 h. Inoculation with rhizobacteria increased the aboveground biomass of 18-day-old seedlings (by 17% on average), the content of chlorophylls and carotenoids (by 20% on average), the amount of soluble phenols (by 18% on average) and biophilic elements (N, P, K, Zn, Fe). At the same time, the most significant effect of rhizobacteria was on the accumulation of flavonoids and iron, increasing their content by an average of 1.6 times. The results of the study allow us to recommend the use of the studied strains as effective bioinoculants for the biofortification of microgreens.

Keywords: winter wheat, biofortification, photosynthetic pigments, phenolic compounds, biophilic elements.

Введение

В связи с ростом населения все более актуальной становится проблема продовольственной безопасности, одной из составляющих которой является сбалансированное питание [1], [2]. Биообогащение растительного сырья и пищевых продуктов витаминами, антиоксидантами и эссенциальными элементами (биофортификация) является одной из стратегий, нацеленных на устранение их дефицита в рационе человека [3], [4], [5].

В последние годы усилия многих ученых в разных странах направлены на изучение возможностей микробиологической биофортификации сельскохозяйственных культур с использованием ризосферных бактерий, стимулирующих рост растений (от англ. «Plant Growth Promoting Rhizobacteria», PGPR), которые повышают биодоступность макро- и микроэлементов в почве и способствуют обогащению культур биологически активными веществами и биофильными элементами [6], [7], [8], [9].

В настоящее время цинк и железо относят к наиболее важным микроэлементам с точки зрения глобального общественного здравоохранения. Широкое распространение дефицита этих элементов не только в развивающихся, но и развитых странах определяет необходимость разработки эффективных путей обогащения ими рациона питания [3], [7]. В этом контексте использование PGPR, способных растворять недоступные для растений соединения цинка, а также продуцировать сидерофоры, способствующие обогащению растений железом, в качестве ризобактериальных инокулянтов является экономически эффективной и экологически безопасной альтернативой химическим удобрениям [6], [8].

Однако до сих пор микробиологическая биофортификация не получила широкого практического применения, поскольку не все штаммы PGPR обладают нужными положительными качествами и способностью к культивированию.

Цель исследования – оценка эффективности использования двух селективных штаммов Zn-солюбилизирующих PGPR для улучшения роста семян *Triticum aestivum* L. (пшеница мягкая озимая сорт Еланчик) и повышения их биологической ценности.

Методы и принципы исследования

Для оценки влияния Zn-солюбилизирующих ризобактерий на морфофизиологические параметры семян пшеницы и накопление важных нутриентов использовали два селективных штамма PGPR: STF2 – *Pseudomonas* sp. и STF3 – *Bacillus* sp., выделенных из ризосферы *Tussilago farfara* L. (мать-и-мачеха обыкновенная).

Эксперимент включал контрольный вариант (без инокуляции) и два опытных, с инокуляцией предварительно поверхностно простерилизованных семян пшеницы выделенными PGPR-штаммами (10^8 КОЕ/мл) в течение 2 часов.

Семена высаживали на дважды автоклавированный (130 °C) нейтрализованный низинный торфяной субстрат в контейнеры объемом 3 л (по 150 семян в каждый, повторность трехкратная). Растения выращивали в течение 18 дней в фитокамерах при освещенности 180 ± 20 мкмоль/м² с, фотопериоде – 14:10 (день:ночь), температуре – 25 ± 2 °C, после чего побеги отделяли от корней и измеряли сырую и сухую биомассу.

Содержание хлорофиллов *a*, *b* (Хл *a*, Хл *b*) и каротиноидов определяли спектрофотометрически («APEL» PD-303UV, Япония) при 470, 647 и 663 нм после экстрагирования навески свежих листьев в 80% растворе ацетона [10]. Количество растворимых фенольных соединений, в том числе флавоноидов, оценивали после суточного экстрагирования в 80%-ном этаноле. Содержание растворимых фенолов измеряли при 725 нм после реакции с 0,1 Н реактивом Фолина–Чокальтеу [11]. В качестве стандарта использовали галловую кислоту. Количество флавоноидов измеряли при 420 нм после 15-мин реакции с 10%-м раствором AlCl₃ [12], используя в качестве стандарта раствор рутина.

Общее содержание азота (N) и фосфора (P) в побегах пшеницы определяли спектрофотометрически после озонения сухого растительного материала смесью концентрированных серной и хлорной кислот (10:1, по объему). Количество азота измеряли при 400 нм после проведения реакции с реактивом Несслера [13]. Содержание фосфора определяли при 660 нм после проведения реакции с молибдатом аммония в кислой среде [14]. Содержание общего калия (K), цинка (Zn) и железа (Fe) в побегах измеряли на атомно-абсорбционном спектрометре AA240FS (Varian Australia Pty Ltd., Австралия) после озонения 70%-ной азотной кислотой и рассчитывали на грамм сухого веса.

Статистический анализ проводили с использованием Excel 16.0 и Statistica 13.0. Значимость различий между вариантами оценивали с помощью апостериорного критерия Дункана (Duncan's test) для множественного сравнения. На рисунках и в таблице представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки, разными латинскими (строчными и заглавными) буквами обозначены достоверные различия между вариантами при $p < 0,05$.

Основные результаты и обсуждение

Всхожесть семян пшеницы при инокулировании штаммом STF2 составляла 100%, штаммом STF3 – 96%, тогда как в контроле – 94%. По длине семян достоверных различий между вариантами не обнаружено. Заражение семян пшеницы ризобактериями увеличивало сырую биомассу побегов в среднем на 20%, а сухую – на 14% (рис. 1а, б). Аналогичная тенденция была отмечена и другими авторами [6], [7], [9] при изучении влияния разных штаммов Zn-солюбилизирующих PGPR на рост пшеницы.

При инокуляции семян селективными штаммами содержание Хл *a* в листьях возрастало в среднем на 18%, а Хл *b* – на 22% (рис. 1в). Способность некоторых штаммов Zn-солюбилизирующих ризобактерий, принадлежащих роду *Bacillus*, повышать содержание зеленых пигментов у пшеницы была отмечена и другими авторами [6]. Достоверных различий между изученными штаммами по влиянию на накопление Хл *a* и Хл *b* не выявлено. Однако на количество каротиноидов более значимый эффект оказывал штамм STF3, увеличивая его на 24% по сравнению с контролем, в то время как штамм STF2 – на 16% (рис. 1г). Известно, что хлорофиллы и каротиноиды являются активными иммуномодуляторами в организме человека [4]. Кроме того, каротиноиды способствуют образованию витамина А и обладают ярко выраженными антиоксидантными свойствами [5], поэтому увеличение их количества в инокулированных семенах свидетельствует о биофортификационном потенциале изученных штаммов. К важным низкомолекулярным антиоксидантам относятся также фенольные соединения, включая флавоноиды [11], [12].

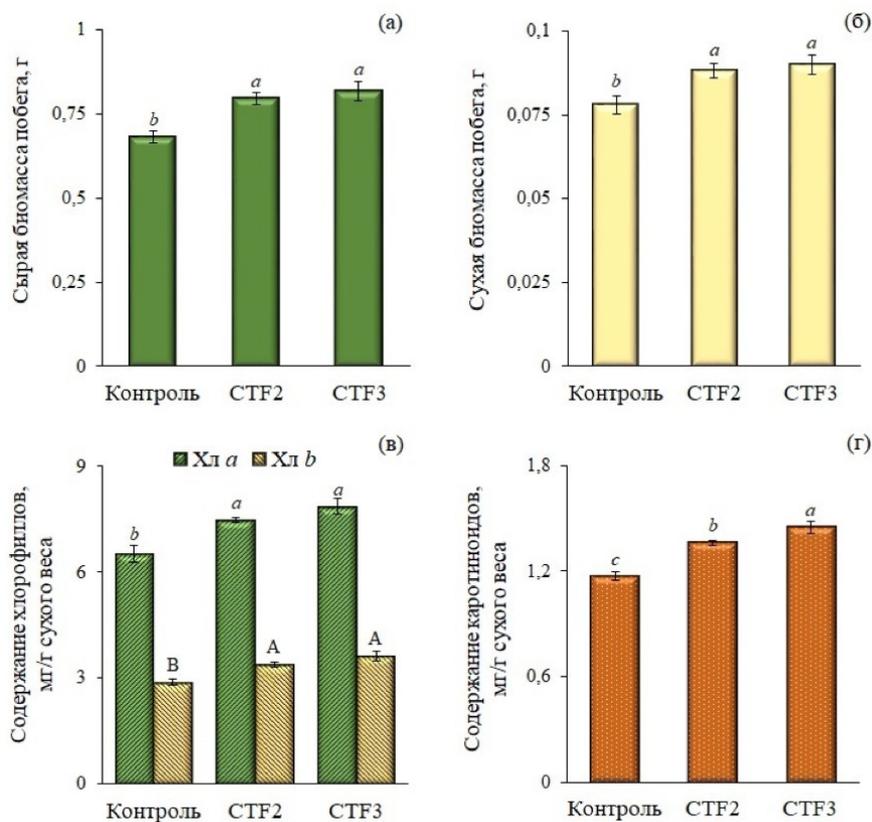


Рисунок 1 - Сырая биомасса (а), сухая биомасса (б) побега, содержание хлорофиллов (в) и каротиноидов (г) в листьях пшеницы

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.51.9.1>

Примечание: Хл – хлорофилл; STF2 – растения, инокулированные *Pseudomonas sp.*; STF3 – растения, инокулированные *Bacillus sp.* Разными (строчными и заглавными) латинскими буквами обозначены достоверные различия между вариантами при $p < 0,05$

Общее содержание растворимых фенолов в листьях пшеницы при инокуляции возрастало в среднем на 18% по сравнению с контролем (рис. 2). При этом в наибольшей степени PGPR влияли на содержание флавоноидов, повышая его в 1,5 раза.

Инокуляция семян STF2 увеличивала содержание азота в побегах на 11% по сравнению с контролем, тогда как STF3 не влиял на его накопление (табл. 1). Оба штамма способствовали повышению количества фосфора и калия в сеянцах (в среднем на 9%). Содержание Zn в побегах инокулированных растений тоже было выше, чем в контроле (в среднем на 14%). Однако наиболее значимый положительный эффект инокуляция оказывала на накопление железа, увеличивая его содержание в сеянцах по сравнению с контролем в среднем в 1,6 раза.

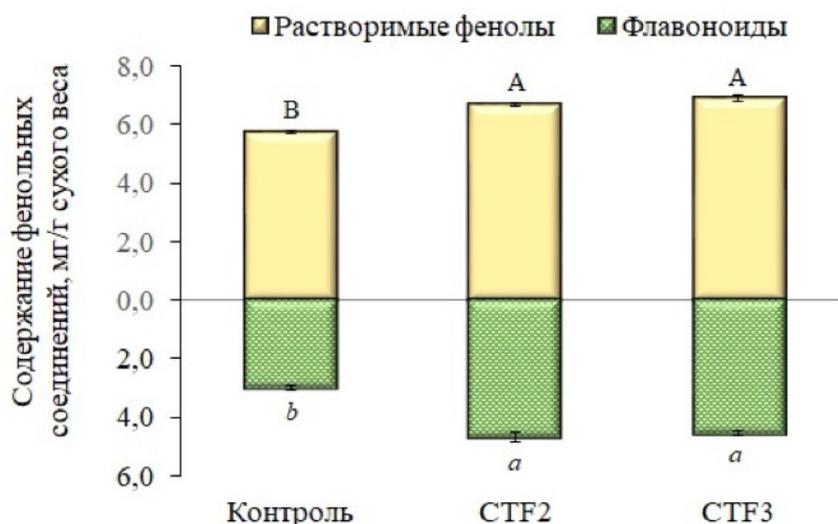


Рисунок 2 - Содержание растворимых фенолов и флавоноидов в листьях пшеницы
DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.51.9.2>

Примечание: STF2 – растения, инокулированные *Pseudomonas* sp.; STF3 – растения, инокулированные *Bacillus* sp. Разными (строчными и заглавными) латинскими буквами обозначены достоверные различия между вариантами при $p < 0,05$

Таблица 1 - Общее содержание азота (N), фосфора (P), калия (K), цинка (Zn) и железа (Fe) в побегах пшеницы, выращенных из инокулированных семян

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.51.9.3>

Вариант	N, мг/г	P, мг/г	K, мг/г	Zn, мкг/г	Fe, мкг/г
Контроль	27,4±0,5 ^b	7,6±0,1 ^b	20,3±0,3 ^b	23,2±0,2 ^b	88,4±1,1 ^c
<i>Pseudomonas</i> sp. STF2	30,4±0,6 ^a	8,5±0,1 ^{ab}	22,4±0,6 ^a	25,2±0,4 ^{ab}	116,2±0,7 ^b
<i>Bacillus</i> sp. STF3	27,5±0,5 ^b	8,3±0,2 ^a	21,6±0,4 ^a	27,9±0,3 ^a	157,3±8,7 ^a

Следовательно, оба штамма продемонстрировали способность обогащать сеянцы пшеницы не только биологически активными веществами, но и биофильными элементами.

Заключение

В результате проведения исследования выявлен положительный эффект инокуляции семян пшеницы Zn-сольобилизирующими PGPR (*Pseudomonas* sp. STF2 и *Bacillus* sp. STF3) на биомассу 18-дневных сеянцев, содержание фотосинтетических пигментов и растворимых фенолов, особенно флавоноидов. Более того, инокуляция способствовала накоплению в сеянцах биофильных элементов (N, P, K, Zn и Fe), что делает эти штаммы перспективными для биофортификации микрозелени.

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00292, <https://rscf.ru/project/23-26-00292/>.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Funding

The work was supported and funded by Russian Science Foundation, Project No. 23-26-00292, <https://rscf.ru/project/23-26-00292/>.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Raut D.A. Enhancing nutrition, crop resilience, and food security through biofortification / D.A. Raut, S. Afrayeem, V. Singh [et al.] // *International Journal of Environment and Climate Change*. — 2024. — Vol. 14 (2). — P. 241–253. — DOI: 10.9734/IJECC/2024/v14i23942.
2. Ofori K.F. Improving nutrition through biofortification – a systematic review / K.F. Ofori, S. Antonello, M.M. English [et al.] // *Frontiers in Nutrition*. — 2022. — Vol. 9: 1043655. — DOI: 10.3389/fnut.2022.1043655.
3. García-Bañuelos M.L. Biofortification – promising approach to increasing the content of iron and zinc in staple food crops / M.L. García-Bañuelos, J.P. Sida-Arreola, E. Sánchez // *Journal of Elementology*. — 2014. — Vol. 19 (3). — P. 865–888. — DOI: 10.5601/jelem.2014.19.3.708.
4. Елисеева Л.Г. Новые направления разработки обогащенных пищевых продуктов для здорового питания / Л.Г. Елисеева, Ю.Д. Белкин, Д.В. Сими́на [и др.] // *Международный научно-исследовательский журнал*. — 2022. — Т. 4 (118). — С. 50–55. — DOI: 10.23670/IRJ.2022.118.4.009.
5. Мамедов М.И. Состав антиоксидантов в плодах *Capsicum* spp. для получения биофортифицированной продукции / М.И. Мамедов, О.Н. Пышная, А.А. Байков [и др.] // *Сельскохозяйственная биология*. — 2017. — Т. 52 (5). — С. 1021–1029. — DOI: 10.15389/agrobiology.2017.5.1021rus.
6. Yadav R.C. Modulation in biofertilization and biofortification of wheat crop by inoculation of zinc-solubilizing rhizobacteria / R.C. Yadav, S.K. Sharma, A. Varma [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. — 2022. — Vol. 13: 777771. — DOI: 10.3389/fpls.2022.777771.
7. Shaikh S. Biofortification of *Triticum aestivum* through the inoculation of zinc solubilizing plant growth promoting rhizobacteria in field experiment / S. Shaikh, M. Saraf // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. — 2017. — Vol. 9. — P. 120–126. — DOI: 10.1016/j.bcab.2016.12.008.
8. Ahmad M. Combating iron and zinc malnutrition through mineral biofortification in maize through plant growth promoting *Bacillus* and *Paenibacillus* species / M. Ahmad, A. Hussain, A. Dar [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. — 2023. — Vol. 13: 1094551. — DOI: 10.3389/fpls.2022.1094551.
9. Ali M. Growth improvement of wheat (*Triticum aestivum*) and zinc biofortification using potent zinc solubilizing bacteria / M. Ali, I. Ahmed, H. Tariq [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. — 2023. — Vol. 14: 1140454. — DOI: 10.3389/fpls.2023.1140454.
10. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes / H.K. Lichtenthaler // *Methods in Enzymology*. — 1987. — Vol. 148. — P. 350–382. — DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
11. Singleton V.L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent / V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos // *Methods in Enzymology*. — 1999. — Vol. 299. — P. 152–178. — DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
12. Chang C.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods / C.C. Chang // *Journal of Food and Drug Analysis*. — 2002. — Vol. 10. — P. 178–182. — DOI: 10.38212/2224-6614.2748.
13. Polley J.R. Colorimetric determination of nitrogen in biological materials / J.R. Polley // *Analytical Chemistry*. — 1954. — Vol. 26. — P. 1523–1524. — DOI: 10.1021/ac60093a039.
14. Fiske C.H. The colorimetric determination of phosphorus / C.H. Fiske, Y. Subbarow // *Biochemical Journal*. — 1925. — Vol. 66. — P. 375–400. — DOI: 10.1042/bj0260292.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Raut D.A. Enhancing nutrition, crop resilience, and food security through biofortification / D.A. Raut, S. Afrayeem, V. Singh [et al.] // *International Journal of Environment and Climate Change*. — 2024. — Vol. 14 (2). — P. 241–253. — DOI: 10.9734/IJECC/2024/v14i23942.
2. Ofori K.F. Improving nutrition through biofortification – a systematic review / K.F. Ofori, S. Antonello, M.M. English [et al.] // *Frontiers in Nutrition*. — 2022. — Vol. 9: 1043655. — DOI: 10.3389/fnut.2022.1043655.
3. García-Bañuelos M.L. Biofortification – promising approach to increasing the content of iron and zinc in staple food crops / M.L. García-Bañuelos, J.P. Sida-Arreola, E. Sánchez // *Journal of Elementology*. — 2014. — Vol. 19 (3). — P. 865–888. — DOI: 10.5601/jelem.2014.19.3.708.
4. Eliseeva L.G. Novye napravleniya razrabotki obogashchennykh pishchevykh produktov dlya zdorovogo pitaniya [New directions for the development of fortified food products for healthy nutrition] / L.G. Eliseeva, Yu.D. Belkin, D.V. Simina [et al.] // *Mezhdunarodnyj nauchno-issledovatel'skiy zhurnal [International Research Journal]*. — 2022. — Vol. 4 (118). — P. 50–55. — DOI: 10.23670/IRJ.2022.118.4.009 [in Russian].
5. Mamedov M.I. Sostav antioksidantov v plodah *Capsicum* spp. dlya polucheniya biofortificirovannoy produktsii [Composition of antioxidants in *Capsicum* spp. fruits for obtaining biofortified products] / M.I. Mamedov, O.N. Pyshnaya, A.A. Baikov [et al.] // *Sel'skokozyajstvennaya biologiya [Agricultural Biology]*. — 2017. — Vol. 52 (5). — P. 1021–1029. — DOI: 10.15389/agrobiology.2017.5.1021rus. [in Russian].
6. Yadav R.C. Modulation in biofertilization and biofortification of wheat crop by inoculation of zinc-solubilizing rhizobacteria / R.C. Yadav, S.K. Sharma, A. Varma [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. — 2022. — Vol. 13: 777771. — DOI: 10.3389/fpls.2022.777771.
7. Shaikh S. Biofortification of *Triticum aestivum* through the inoculation of zinc solubilizing plant growth promoting rhizobacteria in field experiment / S. Shaikh, M. Saraf // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. — 2017. — Vol. 9. — P. 120–126. — DOI: 10.1016/j.bcab.2016.12.008.
8. Ahmad M. Combating iron and zinc malnutrition through mineral biofortification in maize through plant growth promoting *Bacillus* and *Paenibacillus* species / M. Ahmad, A. Hussain, A. Dar [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. — 2023. — Vol. 13: 1094551. — DOI: 10.3389/fpls.2022.1094551.

9. Ali M. Growth improvement of wheat (*Triticum aestivum*) and zinc biofortification using potent zinc solubilizing bacteria / M. Ali, I. Ahmed, H. Tariq [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. — 2023. — Vol. 14: 1140454. — DOI: 10.3389/fpls.2023.1140454.
10. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes / H.K. Lichtenthaler // *Methods in Enzymology*. — 1987. — Vol. 148. — P. 350–382. — DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
11. Singleton V.L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent / V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos // *Methods in Enzymology*. — 1999. — Vol. 299. — P. 152–178. — DOI:10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
12. Chang C.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods / C.C. Chang // *Journal of Food and Drug Analysis*. — 2002. — Vol. 10. — P. 178–182. — DOI:10.38212/2224-6614.2748.
13. Polley J.R. Colorimetric determination of nitrogen in biological materials / J.R. Polley // *Analytical Chemistry*. — 1954. — Vol. 26. — P. 1523–1524. — DOI: 10.1021/ac60093a039.
14. Fiske C.H. The colorimetric determination of phosphorus / C.H. Fiske, Y. Subbarow // *Biochemical Journal*. — 1925. — Vol. 66. — P. 375–400. — DOI: 10.1042/bj0260292.