

УДК 579.647

БИОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ВСХОЖЕСТИ КОРМО-БОБОВЫХ КУЛЬТУР**И.Э. Смирнова, А.К. Саданов***Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан*

Введение. Главным сдерживающим фактором развития животноводства является недостаточность кормовой базы. В условиях высоких цен на минеральные удобрения, получение полноценных и дешевых кормов возможно путем развития кормопроизводства с использованием кормо-бобовых культур, которые дают большой урожай зеленой массы с высоким содержанием протеина. Основными кормо-бобовыми культурами являются люцерна (*Medicago sativa* L.) и донник (*Melilotus officinalis* (L.) Lam.). Люцерна является главным источником производства кормов для животноводства. Она характеризуется стабильным урожаем, содержит много протеина, каротина, кальция, витамины и других полезных веществ для животных [1]. Другой не менее важной культурой является донник, который недостаточно используется в кормопроизводстве. Донник обладает комплексом ценных хозяйственных и эколого-биологических особенностей: нетребователен к плодородию почв, зимостоек, дает высокий урожай раннего корма в засушливых условиях и является солеустойчивой культурой [2]. Кроме того, донник является признанным растением-фитомелиорантом, что крайне актуально для засоленных почв [3]. Однако при выращивании донника и люцерны существует проблема низкой всхожести семян. Так, часто при высеве донника и люцерны ¼ засеянных полей остается пустыми, что объясняется их низкой всхожестью. Низкая всхожесть связана с присутствием твердокаменных семян, содержание которых доходит до 40–60 % [4]. Такие семена имеют очень плотную и твердую оболочку, препятствующую их всхожести. [5]. При посеве они не дают дружных всходов, что вызывает разреженность посевов и существенно снижает урожайность зеленой массы культур с единицы площади. Для повышения всхожести семян применяют разные способы, наиболее часто используют механическую скарификацию, которая разрушает твердую оболочку семян [6]. Однако механическая скарификация вызывает повреждение зародыша семени, что приводит к его поражению фитопатогенами, загниванию и гибели растений. Целью данного исследования является разработка принципиально нового биологического способа повышения всхожести семян донника и люцерны, основанного на применении целлюлолитических бактерий. Эти бактерии способны синтезировать ферменты целлюлазы, которые частично разрушают твердую оболочку семян, делают ее легкопроницаемой для прорастания и, тем самым, повышают всхожесть культур.

Материалы и методы. Объектом исследования является штамм целлюлолитических бактерий *Bacillus sp.* С-81. Штамм был выделен из целлюлозосодержащих растительных остатков (листовой опад, корешки и др.), собранных в ризосфере здоровых растений люцерны в Алматинской области Казахстана в 2018 году.

Бактерии культивировали на среде Гетчинсона следующего состава (г/л): K_2HPO_4 -1,0, $CaCl_2$ - 0,1, $MgSO_4$ - 0,3, $NaNO_3$ - 2,5, $NaCl$ - 1,0, $FeCl_3$ - 0,01, дрожжевой экстракт - 5,0. Целлюлазную активность бактерий определяли методом Мандельс-Вебера [7].

Определение ферментов целлюлазного комплекса штамма бактерий проводили в соответствии с протоколом ГОСТ Р 55293–2012 [8]. Субстратом для тестирования фермента эндо-1,4-β-эндоглюканазы (ЕС 3.2.1.4) служил раствор Na-КМЦ (Serva, Германия); в качестве субстрата для определения активности целлюобиогидролазы (ЕС 3.2.1.91) использовали хлопковые волокна; для определения β-глюкозидазы (ЕС 3.2.1.21) – целлюбиозу (Sigma-Aldrich, Германия). Активность ферментов выражали в международных единицах – μмоль гидролизованной связи в единицу времени (мин), и относили к весу фермента.

Нитрогеназную активность бактерий определяли ацетиленовым методом [9] Для этого бактерии выращивали на среде Эшби в условиях аэрации до концентрации 10^8 клеток /мл. Ацетилен вводили в сосуды с культурами до концентрации 10 % (по объему). После инкубации культур в течение 1,5 ч в атмосфере ацетилена пробы газа отбирали шприцем по 1 мл из сосуда и определяли наличие этилена на газовом хроматографе “Agilent Technology 7890 В” (США) с пламенно-ионизационным детектором [10].

Витамины группы В определяли микробиологическим методом, основанном на учете интенсивности роста витаминзависимых культур микроорганизмов [11].

Полевые опыты проводили на полях Алматинской области Казахстана. Тип почвы – серозем обыкновенный, агрохимические показатели: гумус – 1,28 %, легкогидролизуемый азот – 63,5 мг/кг почвы, подвижный фосфор – 38,4 мг/кг почвы. Семена люцерны сорта «Карабалыкская-18» и донника сорта «Калдыбанский» перед посевом обрабатывали бактериями С-81 из расчета 200 мл суспензии с титром 1×10^8 кл/мл на 1 кг семян. Обработанные семена высевали порционной сеялкой СК-2 в течение 10–20 ч. Норма высева семян составляла 10–12 кг/га, глубина посева 4–5 см. Контролем служили необработанные семена.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «STATISTICA 10.0» [12].

Результаты и обсуждение. Для повышения всхожести семян кормо-бобовых культур был выделен и отселекционирован штамм целлюлолитических бактерий С-81. Установлено, что клетки штамма С-81 имеют форму палочек, размер клеток – $2,4 \times 0,3 - 4,5 \times 0,5$ мкм. Клетки грамположительные, располагаются поодиночке, парами или короткими цепочками, имеют перетрихальное жгутикование. Овальные споры размером 0,5–0,8 мкм в диаметре расположены центрально, форма клеток при спорообразовании не меняется. Колонии белые или светло-серые, край ровный, диаметром 3–4 мм. Факультативный анаэроб. Рост на синтетических средах хороший, штамм не требует внесения в среду витаминов или других факторов роста. При росте на мясопептонном агаре (МПА) колонии округлые, поверхность и край колоний ровный, цвет белый или светло-серый, колонии непрозрачные, пигмент в среду не выделяется.

Штамм использует для роста следующие углеводы: глюкозу, декстрозу, фруктозу, сахарозу с образованием кислот, арабинозу, галактозу, ксилозу, лактозу, маннит с подщелачиванием среды. Энергично разлагает целлюлозу. Крахмал гидролизует, аммиак, индол и сероводород не образует. Желатину разжижает. Нитраты восстанавливает до нитритов. Дает положительную реакцию на каталазу. Растет на безазотистых средах, фиксирует молекулярный азот атмосферы.

На основе изучения основных культурально-морфологических и биохимических признаков штамм отнесен к роду *Bacillus*. Проведена молекулярно-генетическая идентификация штамма С-81 методом Сенгера. Филогенетический анализ путем сравнения нуклеотидной последовательности штамма с последовательностями 16S rRNA родственных штаммов в базе данных ICBN показал, что в филогенетическом отношении штамм относится к роду *Bacillus* (степень гомологии 98 %) и наиболее близок в виду *B. cereus*.

Исследование состава целлюлазного комплекса бактерий установило, что комплекс состоит из трех ферментов: 1,4-β-эндоглюканаза (ЕС 3.2.1.4), β-глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21) и целлобиогидролаза (ЕС 3.2.1.91). Исследование количественных показателей этих ферментов показало следующее: содержание 1,4-β-эндоглюканазы составляло $8,9 \pm 0,4$ ед./г, β-глюкозидазы – $15,4 \pm 0,8$ ед./г и целлобиогидролазы – $37,2 \pm 1,1$ ед./г.

Проведено изучение целлюлазной и нитрогеназной активности, и способность штамма к синтезу биологически активных веществ, таких как витамины группы В (таблица 1).

Таблица 1 – Целлюлазная и нитрогеназная активность, биосинтез витаминов штаммом *B. sp.* С-81

Штамм	Общая целлюлазная активность, ед./мл	Нитрогеназная активность, мкмоль C ₂ H ₄ /мл/ч	Витамины группы В, мкг/г АСБ*			
			В ₁	В ₃	В ₅	В ₆
С-81	5,4	4,37	18,4	169,9	21,4	15,8
Примечание: $p < 0,01$; АСБ* – абсолютно сухая биомасса						

Установлено, что целлюлазная активность бактерий составляет 5,4 ед./мл, штамм фиксирует молекулярный азот атмосферы и синтезирует витамины группы В: В₁ (пирофосфат тиамин), В₃ (никотиновая кислота), В₅ (пантотеновая кислота) и В₆ (пиридоксальфосфат) (таблица 1).

Полевые опыты, проведенные в течение двух лет (2019–2020 гг.) в Алматинской области, показали высокую перспективность применения биологического метода повышения всхожести семян люцерны и донника (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние штамма *B. sp.* С-81 на их всхожесть семян и урожайность донника и люцерны в полевых условиях

Варианты	Всхожесть, %	Высота растений, см	Густота всходов, шт./м ²	Урожайность зеленой массы, ц/га
Люцерна				
Контроль	52,4	68,3	79,8	128,2
<i>B. sp.</i> С-81	79,8	77,5	167,4	143,4
Донник				
Контроль	49,6	75,3	76,3	115,5
<i>B. sp.</i> С-81	74,6	96,9	153	132,8
Примечание: $p \leq 0,05$				

Из результатов, представленных в таблице 2 следует, что предпосевная обработка семян донника и люцерны штаммом *B. sp.* С-81 увеличила густоту всходов, кустистость растений и повышала урожайность зеленой массы культур. Так, при обработке семян люцерны штаммом С-81 количество всходов составляло 167,4 шт./м², в контроле этот показатель составлял только 79,8 шт./м², высота растений в варианте с обработкой семян люцерны штаммом была 77,5 см, в контроле – 68,3 см. Количество всходов в варианте с обработкой семян донника штаммом *B. sp.* С-81 составляло 153 шт./м², в контроле – 76,3 шт./м², растения донника имели большую высоту растений (96,9 см), чем растения контрольного варианта (75,3 см). Вес зеленой массы донника и люцерны в варианте с инокуляцией семян штаммом значительно увеличился по сравнению с контролем и составлял для донника 132,8 ц/га (контроль – 115,5 ц/га), для люцерны 143,4 ц/га (контроль 128,2 – ц/га).

Заключение. Таким образом, разработан биологический способ повышения всхожести семян кормо-бобовых культур донника и люцерны. Биологический способ основан на применение штамма целлюлолитических бактерий, который способен активно повышать всхожесть, стимулировать рост и развитие культур. Предпосевная обработка семян донника и люцерны штаммом повышает урожайность зеленой массы донника на 17,3 ц/га и люцерны – на 15,2 ц/га.

Механизм действия биологического способа можно объяснить следующим образом: под действием ферментов целлюлаз, продуцируемых бактериями, происходит разрушение клеточных стенок оболочки семян и в ней образуются микротрещины, то есть целлюлазы бактерий частично деградируют твердую оболочку семян (биологическая скарификация), при этом оболочка становится более мягкой для прорастания. Через образующиеся микротрещины ускоряется доступ воды и растворенных в ней минеральных и питательных веществ к зародышу семян, что является дополнительным фактором для повышения всхожести и дальнейшей стимуляции роста и развития проростка. Кроме того, штамм обладает способностью фиксировать молекулярный азот атмосферы и синтезирует витамины группы В, что создает добавочный стимул для роста культур.

Применение биологического способа экологически безопасно и соответствует требованиям охраны окружающей среды. Сам штамм не токсичен, не патогенен и не фитотоксичен. Применение штамма не приводит к загрязнению почвы и нарушению биологического равновесия, так как целлюлолитические бактерии являются полезными представителями микрофлоры почвы, которые участвуют в процессе почвообразования. Использование биологического способа дает возможность избежать применения механических и других способов повышения всхожести семян и химических стимуляторов роста растений, отрицательно влияющих на здоровье почв и нарушающих систему: почва-растение-продукты питания. Производство биомассы целлюлолитических бактерий для биологического способа повышения всхожести кормо-бобовых культур может быть налажено на основе простых и дешевых сред, содержащих в качестве источника углерода пшеничную солому, и не требует использования факторов роста. Способность штамма к спорообразованию обеспечивает его сохранность на длительный период времени в почве, что улучшает ее плодородие в последующие годы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант АР08855656).

Литература

- Волгин В.И., Романенко Л.В., Прохоренко П.Н., Федорова З.Л., Корочкина Е.А. Полноценное кормление молочного скота – основа реализации генетического потенциала продуктивности. М.: РАН, 2018. 260 с.
- Косолапов В.М., Костенко С.И., Пилипко С.В. Направления и задачи селекции кормовых трав в России // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32. № 2. С. 21–24. doi: 10.24411/0235–2451–2018–10205
- Rigal M., Rigal L., Vilarem G., Vandenbossche M., Virginie. Sweet clovers, a source of fibers adapted for growth on wet and saline soils // Journal of Natural Fibers. 2016. Vol. 13(4). P. 410–422. 10.1080/15440478.2015.1029202ff.
- Boe A., Kephart K.D., Berdahl J.D., Peel M.D., Brummer E.C., Xu L., Wu Y. Breeding alfalfa for semiarid regions in the Northern Great Plains: History and additional genetic evaluations of novel germplasm // *Agronomy*. 2020. Vol. 10(11). P. 1686.
- Шатский И.М., Иванов И.С., Переправо Н.И., Золотарев В.Н и др. Селекция и семеноводство многолетних трав в Центрально-черноземном регионе России. Воронеж: ОАО «Воронежская областная типография», 2016. 236 с.
- Jones C.D., Stevens M.R., Jolley Von D., Hopkins B.G., Jensen S.L., Turner D., Stettler J.M. Evaluation of thermal, chemical, and mechanical seed scarification methods for 4 Great Basin lupine species // *Native Plants Journal*. 2016. Vol. 17(1). P. 5–17.
- Zhang D., Lax A.R., Raina A.K., Bland J.M. Differential cellulolytic activity of native-form and C-terminal tagged-form cellulase derived from *Coptotermes formosanus* and expressed in *E. coli* // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2009. Vol. 39. P. 516–522.
- Государственный стандарт ГОСТ Р 55293–2012. Препараты ферментные для пищевой промышленности. Метод определения активности целлюлаз. М.: Стандартинформ, 2014. 14 с.
- Das S., De T.K. Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay // *Methods X*. 2018. Vol. 5. P. 909–914. doi: 10.1016/j.mex.2017.11.010.
- Kaushal M., Kaushal R. Acetylene reductase activity and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria to know efficacy in integrated nutrient management system // *Indian Journal of Biotechnology*. 2015. Vol. 14. P. 221–227.
- Ball G.F.M. Microbiological methods for the determination of the B-group vitamins. In: *Water-soluble Vitamin Assays in Human Nutrition*. Boston, MA: Springer, 1994. P. 317–364. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2061-0_7.
- Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. М.: Stat Soft, 2013. 268 с.