

ВЛИЯНИЕ СОЛЕТОЛЕРАНТНЫХ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА ПАСТБИЩНЫЕ ТРАВЫ, РАСТУЩИХ НА ЗАСОЛЕННЫХ ПОЧВАХ

И.Э. Смирнова, Г.Б. Баймаханова, Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина, Я.У. Рахметова

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан

Введение. Исторически и традиционно Казахстан является территорией пастбищного животноводства. Однако в Казахстане, как и во всем мире, наблюдается устойчивая тенденция к засолению пастбищных земель, что связано с прежде всего с потеплением климата, которое приводит к увеличению скорости испарения воды с поверхности почв, орошением пастбищ минерализованной водой, а также с неблагоприятными методами ведения пастбищного хозяйства [1]. Большая часть пастбищных экосистем серьезно нарушена, ряд ценных видов кормовых трав исчезают, почвы сильно истощаются. Так, в Казахстане, в 2022 году 33,4 % пастбищ находились в плохом состоянии, 26,2 % – в очень плохом состоянии, в 2023 году очень плохое состояние пастбищ было выявлено уже на 40 % угодий [2]. В настоящее время, общая площадь деградированных пастбищных земель в Казахстане составляет более 22,0 млн га, из них на засоленные пастбища приходится 31,3 % [3]. Засоление почв существенно влияет на продуктивность культур и является одним из самых разрушительных абиотических стрессов, так как отрицательно воздействует как на почвы угодий, так и урожайность кормовых трав. Показано, что засоленные почвы, прежде всего отрицательно влияют на азотное питание растений, поскольку снижают эффективность поглощения и использования азота из почвы растениями и, тем самым, сдерживают, а иногда и полностью прекращают их рост и развитие [4].

Бактерии, стимулирующие рост растений (PGPB – Plant Growth Promoting Bacteria), играют положительную роль в улучшении роста растений и повышают их продуктивности посредством различных механизмов [5]. Они способны влиять на растения, помогая поглощению питательных веществ посредством продукции фитогормонов (ауксин, гиббереллины, цитокинины), АСС-деаминазы (аминоциклопропанкарбоксилат деаминаза) и увеличивая доступность азота почвы [6,7]. Практическое использование азотфиксирующих солетолерантных бактерий, присутствующих в засоленных почвах, предлагает многообещающий подход к улучшению роста растений, особенно в стрессовых условиях окружающей среды. Растения, инокулированные такими бактериями, показали более высокую устойчивость к воздействию различных типов стресса, в том числе, и солевого [8].

Цель работы – изучение влияния солетолерантных азотфиксирующих бактерий на рост пастбищных трав в условиях солевого стресса.

Материалы и методы. Объектами исследований служили выделенные и идентифицированные ранее солетолерантные свободноживущие азотфиксирующие бактерии. Бактерии были выделены из почв двух засоленных пастбищ в Илийском районе Алматинской области. Тип почв – серозем обыкновенный, содержание гумуса низкое – 0,9–1,1 %, легкогидролизуемого азота – 58,2 мг/кг почвы, подвижного фосфора – 21,4 мг/кг почвы и подвижного калия – 460 мг/кг почвы. Сбор почвы проводили с глубины 10–20 см. Анализ водной вытяжки почв показал, что почва одного пастбища относится к средnezасоленным, с содержанием солей 0,389 % и значением pH 8,9, второго поля – к сильнозасоленным, с содержанием солей 1,051 %, значение pH 9,2. По содержанию ионов HCO_3^- (0,015 %) почвы пастбищ относятся к слабощелочным.

Для смягчения солевого стресса у луговых трав использовали два штамма солетолерантных азотфиксирующих бактерий, выделенных из образцов засоленных почв, приведенных выше. Идентификация бактерий классическими и молекулярно-генетическими методами показала, что один штамм относится к роду *Azotobacter*, вид *Azotobacter chroococcum* Az37, второй – к роду *Agrobacterium*, вид – *Agrobacterium* sp. Azg28. Род *Azotobacter* характеризуется как свободноживущие, аэробные, азотфиксирующие, гетеротрофные, грамотрицательные бактерии, класс γ -Proteobacteria.

Род *Agrobacterium* – это грамотрицательные, аэробные палочки, расположены одиночно или в парах, спор не образуют, подвижны за счет перитрихальных жгутиков, относятся к семейству *Rhizobiaceae*, классу α -Proteobacteria, способны фиксировать атмосферный азот.

В опытах использовали семена основных луговых трав, произрастающих в естественных травостоях высокопродуктивных пастбищ Алматинской области Казахстана. В состав травосмеси входили злаковые травы: тимофеевка луговая (*Phleum pratense* L.), овсяница луговая (*Festuca pratensis* L.) и райграс многолетний (*Lolium perenne* L.), в соотношении 1:1:1.

Для изучения влияния бактерий на рост трав в условиях засоления почвы, семена были стерилизованы [9]. Стерилизованные семена были инокулированы суспензией бактерий с титром 1×10^8 КОЕ/мл в течение 2 часов при температуре 23 °С, из расчета 5 мл суспензии на 1 г семян. Далее семена были высеяны в сосуды на 250 мл с засоленной почвой по 1 г семян на сосуд. Тип почвы – серозем обыкновенный, содержание гумуса 0,86 %, легкогидролизуемого азота – 58,6 мг/кг, подвижного фосфора – 24,8 мг/кг и подвижного калия – 468,7 мг/кг. Общее содержание солей 1,058 %, значение pH 9,2. Через 30 дней после постановки опыта, растения убирали, высушивали корни и стебли до постоянного веса, определяли их сухую массу и осуществляли микробиологический и биохимический анализ почвы. Эксперименты проводили в климатической камере (Memmert HPP 750 Constant Climate Chamber, Германия). Световой день – 9 ч, температура 25 °С, освещенность: холодный белый свет – 6500 К, теплый свет 2700 К; ночной режим – 15 ч; температура 18 °С, влажность – 68 %. Исследования проводили в трехкратной повторности.

Общее количество микроорганизмов в образцах почвы оценивали высевом на питательный агар [10], численность азотфиксирующих микроорганизмов – на среде Эшби [11]. Активность дегидрогеназы в почве анализировали путем восстановления хлорида 2, 3, 5 – трифенилтетразолия (ТТС) до трифенилформазана (ТФФ) [12]. Общий азот и сырой протеин в растениях определяли на приборе Turbotherm TT-125M («Gerhardt», Germany) в соответствии с протоколом, прилагаемом к прибору.

Статистическую значимость полученных результатов анализировали с использованием пакета программ STATISTICA 10.0, ver. 6.0 [13]. Различия считались значимыми при $p < 0,05$, а значения представлены как среднее значение (М) $\pm$ стандартное отклонение ($\pm$ SEM) [14].

Результаты и обсуждение. Изучение влияния инокуляции бактерий на микробиологические характеристики почвы показали высокий положительный воздействие на ее микрофлору. В таблице 1 приведены данные по влиянию бактерий на общее микробное число, численность азотфиксирующих микроорганизмов и активность дегидрогеназы почвы.

Таблица 1 – Влияние азотфиксирующих бактерий на микрофлору засоленной почвы и активность дегидрогеназы

Варианты опыта	ОМЧ*, КОЕ/г почвы	Азотфиксаторы, КОЕ/г почвы	Дегидрогеназа, ед. ОП
Исходная почва (контроль)	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^3$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^2$	$0,14 \pm 0,01$
Почва+ <i>Az. chroococcum</i> Az37	$(3,9 \pm 0,2) \times 10^5$	$(3,6 \pm 0,1) \times 10^3$	$0,94 \pm 0,3$
Почва+ <i>Agrobacterium</i> sp. Azg28	$(4,8 \pm 0,2) \times 10^5$	$(4,1 \pm 0,2) \times 10^3$	$0,97 \pm 0,4$

Примечание: ОМЧ * – общее микробное число; $p < 0,05$; $n = 5$

Из данных таблицы 1 следует, что инокуляции солетолерантных азотфиксирующих бактерий *Az. chroococcum* Az37 и *Agrobacterium* sp. Azg28 в условиях солевого стресса увеличила общее количество микробов в почве на два порядка – с 10^3 КОЕ/г почвы (исходная почва) до 10^5 КОЕ/г почвы. Кроме того, установлено, что при внесении бактерий количество азотфиксаторов повысилось на порядок и составило для *Az. chroococcum* Az37 и *Agrobacterium* sp. Azg28 – $3,6 \times 10^3$ КОЕ/г почвы и $4,1 \times 10^3$ КОЕ/г почвы, соответственно. Через 30 дней после инокуляции активность фермента дегидрогеназы в почве увеличилась в 6,7–6,9 раз. Следует отметить, что среди почвенных ферментов, дегидрогеназа является одним из основных биохимических показателей почвы, так как это фермент считается индикатором биологических окислительно-восстановительных процессов почвы, мерой интенсивности микробиологического разложения веществ и показателем микробиологической активности почв. Приведенные результаты свидетельствуют о высоком положительном влиянии инокуляции бактерий на микрофлору почв и ее ферментативную активность.

Рядом авторов установлено, что инокуляция *A. chroococcum* повышает устойчивость растений к засолению за счет увеличения содержания в растениях растворимых сахаров, белков и аминокислот и

стимулирует рост корней и стебля растений [15,16]. Также показано, что бактерии рода *Agrobacterium* можно использовать в качестве биоудобрения для улучшения роста и урожайности культур при различных стрессах. Установлено, что основной причиной положительного воздействия *Agrobacterium* на растения является выработка фитогормонов, которые влияют на растения, способствуя усвоению воды и почвенных элементов [17].

Проведенные нами исследования по влиянию азотфиксирующих бактерий на развитие пастбищных трав показало, что они существенно улучшают их рост в условиях солевого стресса. На рисунке 1 приведены результаты влияния бактерий *A. chroococcum* и *Agrobacterium* sp. на рост и развитие трав.

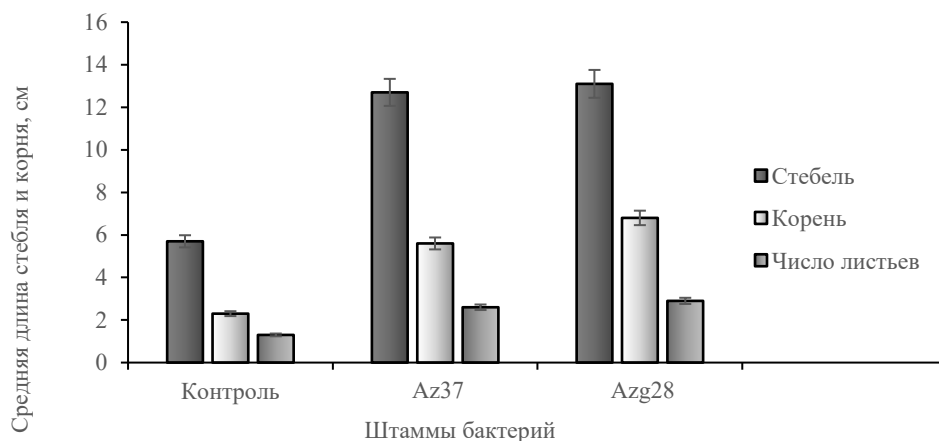


Рисунок – Влияние солетолерантных азотфиксирующих бактерий на рост и развитие пастбищных трав

Из результатов, приведенных на рисунке следует, что инокуляция семян солетолерантными азотфиксирующими бактериями положительно влияет на рост и развитие растений при солевом стрессе. При этом, длина стебля растений увеличилась в среднем в 2,2–2,3 раза, корня – в 2,4–2,9 раза, число листьев возросло в 2,0–2,2 раза по сравнению с контролем. Можно сказать, что солетолерантные азотфиксирующие бактерии *Az. chroococcum* Az37 и *Agrobacterium* sp. Azg28 стимулируют рост и развитие пастбищных трав и потенциально могут стать бактериями, стимулирующими рост растений на засоленных почвах.

Известно, что именно только за счет деятельности бактерий, органические соединения азота почвы превращаются в минеральные – аммонийные соли, нитраты и нитриты, которые затем легко усваиваются растениями. Поэтому исследовали способность солетолерантных азотфиксирующих бактерий влиять на содержание азота в растениях. Полученные результаты, приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние азотфиксирующих бактерий на урожайность и содержание азота в растениях

Варианты опыта	Урожайность сухой массы, г/сосуд	Азот, %	Сырой протеин, %
Контроль	4,1 ± 0,1	0,11 ± 0,001	0,69 ± 0,001
<i>A. chroococcum</i> Az37	8,7 ± 0,1	0,17 ± 0,002	1,06 ± 0,003
<i>Agrobacterium</i> sp. Azg28	8,9 ± 0,2	0,19 ± 0,003	1,20 ± 0,004

Примечание: $p < 0,01$; $n = 5$

Из данных таблицы 2 следует, что инокуляция семян бактериями *Az. chroococcum* Az37 и *Agrobacterium* sp. Azg28 повышает урожайность пастбищных трав в 2,1–2,2 раза. При этом, количество азота и содержание сырого протеина в сухой биомассе растений возросла в 1,5–1,7 раза, что свидетельствует о положительном влиянии бактерий на развитие растений и частичном снижении солевого стресса у них.

Заключение. Таким образом, исследовано влияние солетолерантных азотфиксирующих бактерий на пастбищные травы в условиях солевого стресса. Установлено высокое положительное воздействие этих бактерий на рост, развитие и урожайность пастбищных трав, растущих на засоленных почвах. Показано, что применение этих бактерий вносит значительный вклад в общее поглощение азота травами. Также, установлено, что азотфиксирующие бактерии активируют микрофлору почв и почвенные процессы (ферментативная активность). В целом можно сделать вывод, что инокуляция солетолерантными азотфиксирующими бактериями, помогает растениям противостоять абиотическим стрессам, таким как засоленность почв и их применение имеет большой потенциал для поддержания растений в стрессовых условиях на засоленных почвах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан, в рамках грантового проекта AP23487733.

Литература

1. Abdel Latif A.A.H., Alhmad M.F.A., Kordrostami M., Abo-Baker, A. – B.A. – E., Zakir A. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* or *Azotobacter chroococcum* reinforces maize growth by improving physiological activities under saline conditions // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2020. – Vol. 39. – P. 1293–1306. <https://doi.org/10.1002/ldr.2780>.
2. Оралмагамбетов Б. Деграляция пастбищ: площадь неиспользуемых пахотных земель в Казахстане выросла втрое за год // *Аграрный сектор*. – 2023. – № 7. С. 1–2.
3. Буянов С. Почему казахстанским фермерам не хватает пастбищ. – URL: <https://eldala.kz/specproekty/15498-pochemu-kazahstanskim-fermeram-ne-hvataet-pastbishch> (дата доступа 27.03.2024).
4. Tarolli P., Luo J., Park E., Barcaccia G., Masin R. Soil salinization in agriculture: Mitigation and adaptation strategies combining nature-based solutions and bioengineering // *iScience*. – 2024. – Vol. 27(2). – e108830. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.108830>.
5. Smirnova I., Sadanov A., Baimakhanova G., Faizulina E., Tatarkina L. Phosphate solubilizing salt tolerant bacteria promoting the growth of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) on salt soils // *The Open Agriculture Journal*. – 2023. – Vol. 17. – e187433152302140. DOI: 10.2174/18743315-v17-230223-2022-42.
6. Rafique E, Mumtaz MZ, Ullah I, Rehman A, Qureshi KA, Kamran M, Rehman MU, Jaremko M, Alenezi MA. Potential of mineral-solubilizing bacteria for physiology and growth promotion of *Chenopodium quinoa* willd // *Frontiers in Plant Science*. – 2022. – Vol.13. – e1004833. doi: 10.3389/fpls.2022.1004833.
7. Timofeeva A.; Galyamova M.; Sedykh S. Prospects for using phosphate-solubilizing microorganisms as natural fertilizers in agriculture // *Plants*. – 2022. – Vol. 11. – P. 2119. <https://doi.org/10.3390/plants11162119>.
8. Hryniewicz K, Patz S, Ruppel S. *Salicornia europaea* L. as an underutilized saline-tolerant plant inhabited by endophytic diazotrophs // *Journal of Advanced Research*. – 2019. – Vol. 19. – P. 49–56. doi: 10.1016/j.jare.2019.05.002.
9. Lindsey B.E., Rivero L., Calhoun C.S., Grotewold E., Brkljacic J. Standardized Method for High-throughput Sterilization of *Aralidopsis* Seeds // *Journal of Visualized Experiments*. – 2017. – Vol. 128. – e56587. doi: 10.3791/56587.
10. Веслополова Е.Ф. Микрометод определения численности колониеобразующих микроорганизмов // *Микробиология*. – 1995. – Т. 64, № 2. – С. 279–284.
11. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: МГУ. 1991. – 304 с.
12. Хазиев Ф.Х. Ферментативная активность почв. – М.: Наука, 2012. – 134 с.
13. Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA 10.0, ver. 6. – М.: Горячая линия-Телеком, 2016. – 288 с.
14. Gomez-de-Mariscal E., Guerrero V., Sneider A. et al. Use of the p-values as a size-dependent function to address practical differences when analyzing large datasets // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – e20942. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00199-5>.
15. Van Oosten M.J, Di Stasio E., Cirillo V., Silletti S. et al. Root inoculation with *Azotobacter chroococcum* 76A enhances tomato plants adaptation to salt stress under low N conditions // *BMC Plant Biology*. – 2018. – Vol.18(1). – P. 205. doi: 10.1186/s12870-018-1411-5.
16. Gamalero E, Glick BR. Recent advances in bacterial amelioration of plant drought and salt stress // *Biology (Basel)*. – 2022. – Vol.11(3). – P. 437. doi: 10.3390/biology11030437.
17. Фунг Т.М., Манучарова Н.А., Степанов А.Л., Поздняков Л.А. и др. *Agrobacterium tumefaciens* – ассоциативная азотфиксирующая бактерия // *Вестник Московского Ун-та, сер. почвоведение*. – 2015. – № 3. – С. 50–55.