

СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ И НИТРОГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СВОБОДНОЖИВУЩИХ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

И.Э. Смирнова, А.К. Саданов, Г.Б. Баймаханова, Я.У. Рахметова

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

Введение. Увеличение площади засоленных почв представляют собой серьезную угрозу сельскому хозяйству. Засоление почв связано с несколькими причинами, одной из которых является изменение климата - повышение общей температуры воздуха приводит к увеличению испарения воды из почвы и, тем самым, повышает ее засоленность [1]. Другой причиной является уменьшение доступности пресной воды и использование минерализованных вод для полива. В настоящее время масштабы засоления почв продолжают возрастать. По оценке ФАО (Food and Agriculture Organization of the United Nations) из-за засоления во всем мире к 2050 году потеря пахотных земель составит 50 % [2].

Засоление почвы является серьезным абиотическим стрессом, который отрицательно влияет на растения [3]. Соленой стресс существенно снижает эффективность поглощения растениями основных питательных элементов почвы, таких как азот, фосфор и калий. Азот является одним из основных питательных элементов растений и необходим для биосинтеза нуклеиновых кислот, ферментов, фитогормонов, белков и хлорофилла, его нехватка отрицательно сказывается на продуктивности агрокультур [4]. Недостаток потребления почвенного азота растениями из-за засоления отрицательно влияет на их азотное питание, сдерживает или полностью прекращает их рост [5]. Кроме того, присутствие солей в почве, снижает использование азота, внесенного с минеральными удобрениями [6].

Казахстан является территорией пастбищного животноводства, однако большая часть пастбищных почв сильно засолена. По данным статистики общая площадь деградированных пастбищ Республики составляет более 22,0 млн. га, из них на засоленные пастбища приходится 31,3% [7]. При засолении ухудшается структура почвы, что отрицательно влияет на ее аэрацию и водопроницаемость, уменьшается накопление гумуса, все эти процессы приводят к исчезновению ценных кормовых культур пастбищ и снижению продуктивности пастбищ [8]. Одним из путей повышения их продуктивности является использование микроорганизмов, которые присутствуют в ризосфере растений и обладают полезными для них свойствами. Ризобактерии играют важную роль в стимуляции роста растений посредством широкого спектра механизмов [9]. К таким процессам относятся способность микробов к повышению устойчивости растений к абиотическим стрессам, увеличение доступности питательных веществ, продукция фитогормонов и сидерофоров, производство летучих органических соединений и метаболитов для предотвращения болезней растений и другие [10,11]. Однако, основными из них является биологическая фиксация азота, синтез фитогормонов и повышение доступности питательных веществ почвы [12]. Свободноживущим азотфиксирующим бактериям, присутствующим в ризосфере растений, принадлежит ведущая роль в фиксации азота в прикорневой зоне растений и обогащении растений биологическим азотом. Вклад этих бактерий в обогащение почвы азотом очень высок и достигает до 300 кг N₂/га в год [13].

Однако не все свободноживущие азотфиксирующие бактерии способны развиваться и снабжать растения дополнительным азотом на засоленных почвах. Поэтому, проблема поиска солеустойчивых штаммов, способных развиваться и фиксировать азот атмосферы в условиях солевого стресса весьма актуальна. Практическое использование таких бактерий в сельском хозяйстве, предлагает многообещающий подход к улучшению роста растений в условиях солевого стресса.

Цель исследования - изучение солеустойчивости и способности свободноживущих азотфиксирующих бактерий фиксировать азот атмосферы в условиях высокого солевого стресса.

Материалы и методы. Объектами исследований служили свободноживущие азотфиксирующие бактерии, выделенные из сильнозасоленных почв пастбищ Юго-востока Казахстана (Алматинская область Илийский район). Содержание солей в водной вытяжке сильнозасоленных почв составляло 3,2-5,8%, значение pH 9,2. По содержанию ионов HCO₃⁻ почвы относятся к высокощелочным. Такие почвы вызывают щелочной токсикоз растений, что негативно отражается на их развитие.

Для исследования устойчивости штаммов бактерий к солевому стрессу, бактерии выращивали на жидкой среде Эшби с разными концентрациями NaCl в среде: 100, 250 и 500 ммоль/л.

Культивирование проводили при 28°C 180 об/мин в течение трех суток. Рост бактерий регистрировали на спектрофотометре (PD-303, “ApeI”, Japan) по оптической плотности при 540 нм. Оценку роста проводили по шкале: - полное отсутствие роста; + наличие роста, добавление + указывает на интенсивность роста.

Изучение азотфиксирующей активности бактерий проводили с использованием ацетиленового метода на газовом хроматографе “Agilent Technology 7890B” (USA) [14]. Бактерии выращивали на среде Эшби при 28°C на шейкере 180 об/мин в течение 5 суток. Суспензию бактерий с концентрацией 1×10^8 кл/мл переносили в стеклянные флаконы (125 мл), из которых удаляли 10% воздуха, заменяли его 10% ацетилена (об. /об). Бактерии инкубировали в течение 90 мин. при 25°C. Количество образованного этилена (C_2H_4) измеряли на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором. Количество образовавшегося этилена рассчитывали путем измерения концентрации C_2H_4 в образце, которую определяли по высоте пика образца относительно пика C_2H_4 эталонного стандарта [15].

Статистическую значимость полученных результатов анализировали с помощью программы STATISTICA 10.0, ver. 6.0 [16]. Различия считались значимыми при $p < 0,05$, а значения представлены как среднее значение (M) \pm стандартное отклонение (\pm SEM) [17].

Результаты и обсуждение. Для изучения способности азотфиксирующих бактерий к росту в условиях засоленности создавали солевой стресс путем внесения NaCl в среду Эшби в концентрациях 100, 250 и 500 ммоль/л. В таблице 1 приведены результаты активности роста 19 наиболее устойчивых штаммов азотфиксирующих бактерий.

Таблица 1 - Изучение солеустойчивости штаммов азотфиксирующих бактерий

Штаммы	Концентрация NaCl, ммоль/л		
	100	250	500
Az3/2	+++	+	-
Az3/9	++	++	+
Az3/23	+++	++	+
Az3/28	++++	+++	++
Az3/29	++++	+++	++
Azp6	+++	+	-
Azp6/2	++++	+++	++
Az22	++++	+++	++
Az24	+++	++	++
Az24/4	+++	-	-
Az32	++	-	-
Az32/8	++	+	-
Az38	++	-	-
Az38/9	++	-	-
Az42/6	++	-	-
Az43/3	++	-	-
Az46/3	++	-	-
Az48/4	++	-	-
Az57/5	++	-	-

Примечание: - отсутствие роста; + наличие роста; дополнительный + указывает на интенсивность роста бактерий

Из данных таблицы 1 следует, что не все штаммы азотфиксирующих бактерий, выделенные из сильнозасоленных почв, обладали высокой солеустойчивостью. Установлено, что при концентрации 100 ммоль/л NaCl росли практически все штаммы, при концентрации 250 ммоль/л NaCl рост обнаружен у 10 штаммов, однако у некоторых штаммов он был крайне скудным. При концентрации 500 ммоль/л NaCl способность к росту отмечали только у семи штаммов Az3/9, Az3/23, Az3/28, Az3/29, Azp6/2, Az22, Az24. Эти штаммы были отобраны как наиболее солеустойчивые.

При практическом применении свободноживущих азотфиксирующих бактерий в сельском хозяйстве на засоленных почвах, одним из важных показателей является их способность фиксировать молекулярный азот атмосферы. С этой целью исследовали нитрагеназную активность бактерий и их способность накапливать биомассу при высоком солевом стрессе. Для этого бактерии выращивали

на жидкой среде Эшби с концентрацией NaCl 500 ммоль/л. В таблице 2 представлены данные по накоплению биомассы и нитрогеназной активности у семи штаммов бактерий, показавших наиболее высокие результаты по солеустойчивости.

Таблица 2 - Биомасса и нитрогеназная активность азотфиксирующих бактерий

Штаммы	Биомасса АСБ*, г/л	Нитрогеназная активность, ммоль C ₂ H ₄ /мл/ч
Az3/9	2,52±0,1	5,41±0,09**
Az3/23	1,45±0,1	3,56±0,1
Az3/28	2,81±0,08	4,19±0,2
Az3/29	2,61±0,1	4,94±0,08**
Azp6/2	2,75±0,2	5,27±0,3
Az22	2,43±0,1	4,71±0,2
Az24	1,47±0,07	4,65±0,08**

Примечание: *АСБ - абсолютно сухая биомасса; уровень доверительной вероятности $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Из данных таблицы 2 следует, что исследуемые штаммы активно фиксируют азот атмосферы при высокой степени засоленности, о чем свидетельствуют высокие показатели нитрогеназной активности и продукция биомассы, которая варьировала от 1,45 до 2,75 г/л. Наиболее высоким накоплением биомассы и нитрогеназной активностью характеризовались три штамма Az3/28, Az3/29, Azp6/2. Эти штаммы были отобраны как наиболее эффективные для разработки биоудобрения, применяемых на засоленных почвах.

Заключение. Засоленность почвы, резко снижается продуктивность пастбищ, так как из-за избыточного накопления токсичных ионов в прикорневой зоне растений, засоление вызывает задержку роста, а иногда и гибель растений [18]. Кроме того, засоленность почв препятствует доступности основных элементов питания из почвы, в частности, азота. В настоящее время все больше внимание уделяется смягчению последствий засоления путем применения ризосферных бактерий, способствующих росту растений, одними из которых являются свободноживущие азотфиксирующие бактерии.

Из засоленных почв пастбищ Юго-востока Казахстана были выделены свободноживущие азотфиксирующие бактерии. Изучена их солеустойчивость и установлено, что только семь штаммов бактерий обладали высокой солеустойчивостью Az3/9, Az3/23, Az3/28, Az3/29, Azp6/2, Az22, Az24 и могли развиваться при высоком солевом стрессе. Очень важным свойством бактерий является способность активно фиксировать азот атмосферы при высокой засоленности. В наших исследованиях мы показали, что не так много бактерий, выделенных из засоленных почв, способны фиксировать азот при высоком солевом стрессе. Об этом свидетельствуют показатели нитрогеназной активности и продукция биомассы. Установлено, что только три штамма Az3/28, Az3/29, Azp6 характеризовались высокой способностью к фиксации азота и активным ростом при высокой степени засоления. На основе эти штаммов возможна разработка биоудобрения для поддержания роста и развития растений на засоленных почвах.

Результаты наших исследований позволяют сделать вывод, что применение солетолерантных свободноживущих азотфиксирующих бактерий имеет большой потенциал для устойчивого сельского хозяйства на засоленных почвах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан, в рамках грантового проекта AP23487733 «Разработка рациональной технологии для повышения плодородия деградированных засоленных почв пастбищ Юго-востока Казахстана».

Литература

1. 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. V. 27. № 2. e108830. doi: 10.1016/j.isci.2024.108830.
2. FAO. The future of food and agriculture – Drivers and triggers for transformation. 2022. URL: <https://www.fao.org/global-perspectives-studies/resources/detail/en/c/1157074/> (дата обращения: 05.06.2022).
3. Balasubramaniam T., Shen G., Esmacili N., Zhang H. Plants' response mechanisms to salinity stress // *Plants (Basel)*. 2023. V. 12. № 12. P. 2253. doi: 10.3390/plants12122253.
4. 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 // *Open Agric. J.* 2023. V. 17. e187433152302140. doi: 10.2174/18743315-v17-230223-2022-42.

5. 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. V. 27. № 2. e108830. doi: 10.1016/j.isci.2024.108830.
6. Kamran M., Parveen A., Ahmar S., Malik Z., Hussain S., Chattha M.S., Saleem M.H., Adil M., Heidari P., Chen J.T. An overview of hazardous impacts of soil salinity in crops, tolerance mechanisms, and amelioration through selenium supplementation // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 21. № 1. P. 148. doi: 10.3390/ijms21010148.
7. Буянов С. Почему казахстанским фермерам не хватает пастбищ. URL: <https://eldala.kz/спецпроекты/15498-pochemu-kazahstanskim-fermeram-ne-hvataet-pastbishch> (дата обращения: 27.03.2024).
8. Pan J., Xue X., Huang C., You Q., Guo P., Yang R., Da F., Duan Z., Peng F. Effect of salinization on soil properties and mechanisms beneficial to microorganisms in salinized soil remediation: A review // *Res. Cold Arid Reg.* 2024. V. 16. № 3. P. 121–128. doi: 10.1016/j.rcar.2024.07.001.
9. Zhang T., Jian Q., Yao X., Guan L., Li L., Liu F., Zhang C., Li D., Tang H., Lu L. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) improve the growth and quality of several crops // *Heliyon*. 2024. V. 10. № 10. e31553. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e31553.
10. Brambilla S., Stritzler M., Soto G., Ayub N. A synthesis of functional contributions of rhizobacteria to growth promotion in diverse crops // *Rhizosphere*. 2022. V. 24. e100611. doi: 10.1016/j.rhisph.2022.100611.
11. de Andrade L.A., Santos C.H.B., Frezarin E.T., Sales L.R., Rigobelo E.C. Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production // *Microorganisms*. 2023. V. 11. № 4. P. 1088. doi: 10.3390/microorganisms11041088.
12. Guimaraes G.S., Rondina A.B.L., Santos M.S., Nogueira M.A., Hungria M. Pointing out opportunities to increase grassland pastures productivity via microbial inoculants: attending the society's demands for meat production with sustainability // *Agronomy*. 2022. V. 12. № 8. P. 1748. doi: 10.3390/agronomy12081748.
13. Aasfar A., Bargaz A., Yaakoubi K., Hilali A., Bennis I., Zeroual Y., Meftah Kadmiri I. Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. e628379. doi: 10.3389/fmicb.2021.628379.
14. Senthilkumar M., Amaresan N., Sankaranarayanan A. Quantitative estimation of nitrogenase activity: Acetylene reduction assay // *Plant-Microbe Interactions*. 2021. P. 716–800. doi: 10.1007/978-1-0716-1080-0_5.
15. Haskett T.L., Knights H.E., Jorin B., Mendes M.D., Poole P.S. A Simple in situ Assay to Assess Plant-Associative Bacterial Nitrogenase Activity // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. e690439. doi: 10.3389/fmicb.2021.690439.
16. Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA 10.0, ver. 6. Москва: Горячая линия-Телеком, 2016. 288 с.
17. 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 // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. e20942. doi: 10.1038/s41598-021-00199-5.
18. Muhammad M., Waheed A., Wahab A., Majeed M., Nazim M., Liu Y.H., Li L., Li W.J. Soil salinity and drought tolerance: An evaluation of plant growth, productivity, microbial diversity, and amelioration strategies // *Plant Stress*. 2024. V. 11. e100319. doi: 10.1016/j.stress.2023.100319.

УДК 637.146

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-4-42-43>

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЗЕЛЕННОЙ МАССЫ АМАРАНТА КАК АЛЬТЕРНАТИВНОГО ИСТОЧНИКА БЕЛКА В КОРМЛЕНИИ РЫБ

Л.А. Мирошниченко², С.В. Образцова¹, В.В. Пушкарь¹,
О.В. Зверева¹, О.С. Корнеева¹

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий, Россия

²ООО НПП «АмарантАгро»

В последние годы аквакультура переживает значительный рост во всем мире. Это обусловлено прежде всего ухудшением экологической обстановки – истощение природных рыбных запасов не позволяет удовлетворить растущую потребность населения в рыбопродуктах и кормах для рыб. Поиск доступных и экономичных источников протеина, способных заменить рыбную муку, становится приоритетной задачей для развития отрасли. Производство высококачественных рыбных кормов в России зачастую зависит от импортного сырья, что сказывается на их цене и снижает продовольственную безопасность государства.

В качестве альтернативных источников протеина, помимо рыбной муки, рассматриваются гидролизные дрожжи, личинки насекомых и растительные компоненты. В связи с этим, значительные надежды возлагаются на использование растительных шротов и белковых концентратов для выращивания различных гидробионтов, а также на поиск новых кормовых культур, богатых