

СТАТЬЯ

УДК 579.64

**СОЛЕТОЛЕРАНТНЫЕ АЗОТФИКСИРУЮЩИЕ
И ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩИЕ БАКТЕРИИ
ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РОСТА
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР**

Смирнова И.Э., Турлыбаева З.Ж., Рахметова Я.У.

*ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,
Казахстан, Алматы, e-mail: iesmirnova@mail.ru*

Засоление почв представляет собой серьезную угрозу сельскому хозяйству, так как снижает плодородие и продуктивность культур. Солевой стресс отрицательно влияет также на поглощение растениями питательных элементов почвы, основными из которых являются азот и фосфор. Для повышения продуктивности культур применяют минеральные удобрения, но их высокая стоимость и угроза для окружающей среды (загрязнение воды, почвы) мотивируют к поиску альтернативных путей решения проблемы. Одним из путей является разработка экологически чистых методов на основе микроорганизмов. К таким микроорганизмам относятся азотфиксирующие и фосфатмобилизующие бактерии, стимулирующие рост культур и повышающие биодоступность питательных веществ для растений на засоленных почвах. Цель исследования – изучение способности солетолерантных азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий фиксировать азот, мобилизовать фосфаты и поддерживать рост культур в условиях солевого стресса. Азотфиксирующую активность бактерий изучали ацетиленовым методом на газовом хроматографе, фосфатмобилизацию – модифицированным методом Сэги. Установлено, что при высокой засоленности солеустойчивые азотфиксирующие и фосфатмобилизующие бактерии активно фиксируют азот атмосферы и мобилизуют нерастворимые фосфаты. Показано, что применение азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий и их микробного консорциума стимулирует рост и развитие сельскохозяйственных культур при засолении. Микробный консорциум оказывает более эффективное влияние, чем монокультуры. Солетолерантные штаммы и их консорциум можно рекомендовать для создания биоудобрения, повышающего продуктивность сельскохозяйственных культур на засоленных почвах.

Ключевые слова: азотфиксирующие бактерии, фосфатмобилизующие бактерии, солетолерантность, стимуляция роста, сельскохозяйственные культуры

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».

**SALT-TOLERANT NITROGEN-FIXING
AND PHOSPHATE-MOBILIZING BACTERIA
FOR PROMOTING GROWTH OF CROPS**

Smirnova I.E., Turlybaeva Z.Zh., Rakhmetova Ya.U.

*Research and Production Center for Microbiology and Virology LLC,
Kazakhstan, Almaty, e-mail: iesmirnova@mail.ru*

Soil salinization poses a serious threat to agriculture, as it reduces crop fertility and productivity. Salt stress also negatively impacts plant uptake of soil nutrients, the most important of which are nitrogen and phosphorus. Mineral fertilizers are used to increase crop productivity, but their high cost and environmental risks (water and soil pollution) motivate the search for alternative solutions. One such approach is the development of environmentally friendly microbial-based methods. These microorganisms include nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing bacteria, which stimulate crop growth and increase the bioavailability of plant nutrients in saline soils. The aim of this study was to investigate the ability of salt-tolerant nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing bacteria to fix nitrogen, mobilize phosphates, and support crop growth under salt stress. Nitrogen-fixing activity of bacteria was studied using the acetylene method on a gas chromatograph, and phosphate mobilization was studied using a modified Sagi method. It was found that under high salinity, salt-tolerant nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing bacteria actively fix atmospheric nitrogen and mobilize insoluble phosphates. The use of nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing bacteria and their microbial consortium was shown to stimulate the growth and development of agricultural crops under salinity. Microbial consortium is more effective than monocultures. Salt-tolerant strains and their consortium can be recommended for the creation of biofertilizers that increase crop productivity in saline soils.

Keywords: nitrogen-fixing bacteria, phosphate-mobilizing bacteria, salt tolerance, growth stimulation, crops

The work was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan, within the framework of the grant project AP23487733 “Development of a rational technology for increasing the fertility of degraded saline soils of pastures in southeastern Kazakhstan”.

Введение

Увеличение площадей 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) к 2050 г. из-за засоления потеря пахотных земель во всем мире составит 50% [2]. При засолении происходит ухудшение структурного состава почвы, уменьшается накопление гумуса, что приводит к снижению плодородия и биоразнообразия почвенной микрофлоры. Также засоление является серьезным абиотическим стрессом, который губительно воздействует на растения. Все перечисленные процессы приводят к нарушению экологии, препятствуют сельскохозяйственной деятельности и приводят к существенному снижению урожайности культур. Также установлено, что солевой стресс отрицательно влияет на эффективность поглощения растениями основных питательных элементов почвы, таких как азот, фосфор и калий, что сдерживает рост и развитие растений, приводит к физиологическим отклонениям и в итоге ставит под угрозу глобальную продовольственную безопасность [3].

Известно, что азот является одним из основных питательных элементов растений и необходим для биосинтеза нуклеиновых кислот, ферментов, фитогормонов, белков и хлорофилла, его недостаток снижает продуктивность культур. Еще одним из основных питательных элементов растений является фосфор. Он участвует в фотосинтезе, синтезе биологически активных веществ, ферментов, образовании АТФ, играет фундаментальную роль в регуляции физиологических процессов и повышает устойчивость растений к абиотическим стрессам (холод, засоление, засуха) [4]. Его недостаток вызывает снижение азотфиксации и урожайности культур. Хотя запасы общего фосфора в почве обильны во многих экосистемах, но в основном они находятся в недоступной для растений форме [5]. Показано, что засоление снижает общее содержание фосфора в почве в среднем на 4–6%, доступного фосфора на 10–15% и активность фосфата-

зы на 25–30% [6]. Также негативное влияние засоления на биодоступность почвенного фосфора увеличивается с повышением степени и продолжительности засоления.

Во многих странах мира проводятся исследования по восстановлению плодородия засоленных почв и используются такие направления мелиорации, как гидротехнические, химические, органические и биологические [7]. Применение разных способов мелиорации, эффективное управление ресурсами и выведение солеустойчивых сортов растений снижают засоленность, но все эти мероприятия являются очень длительными и дорогостоящими. Также для повышения продуктивности культур ежегодно вносят большие дозы минеральных химических удобрений, но их высокая стоимость и угроза для окружающей среды (загрязнение воды, почвы и др.) мотивируют к поиску альтернативных путей решения проблемы засоленности почв. В этой связи основное внимание уделяется разработке и внедрению безопасных и экологически чистых методов на основе использования полезных микроорганизмов для производства сельскохозяйственных культур на засоленных почвах. Одним из наиболее перспективных решений является применение микроорганизмов, которые присутствуют в ризосфере растений и обладают полезными для них свойствами: способствуют росту и снимают солевой стресс растений на засоленных почвах. Кроме того, эти микробы повышают устойчивость растений к абиотическим стрессам, увеличивают доступность питательных веществ почвы, способны к продукции фитогормонов и сидерофоров, производству летучих органических соединений и метаболитов для предотвращения болезней растений [8; 9]. Однако основными процессами, положительно влияющими на развитие агрокультур на засоленных почвах, являются биологическая фиксация азота и повышение доступности питательных веществ почвы, в частности фосфора. В этой связи использование азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий может повысить плодородие почвы, увеличить урожайность культур, улучшить качество продукции и позволит полностью или частично исключить внесение минеральных химических удобрений.

Однако не все микроорганизмы могут активно развиваться в засоленных почвах, большинство из них обладают низкой устойчивостью к засолению. Кроме того, хотя использование этих бактерий может быть эффективной, экологически чистой заменой минеральных удобрений, их способность к фиксации азота и мобилиза-

ции фосфатов в условиях высокого солевого стресса практически не исследована, а влияние на рост и развитие сельскохозяйственных культур на засоленных почвах изучено недостаточно.

Цель исследования – изучение способности солетолерантных азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий фиксировать азот, мобилизовать фосфаты и поддерживать рост и развитие сельскохозяйственных культур в условиях солевого стресса.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили солетолерантные азотфиксирующие и фосфатмобилизующие бактерии, выделенные из сильнозасоленных почв юго-востока Казахстана (Алматинская область). Содержание солей в водной вытяжке составляло 1,36%, значение pH 9,2. По содержанию ионов HCO_3^- почвы относятся к высокощелочным. Такие почвы вызывают щелочной токсикоз растений, что негативно отражается на их развитии.

В опытах использовали семена основных злаковых культур: пшеница озимая (*Triticum aestivum* L.) сорт Безостая-1, ячмень (*Hordeum vulgare* L.) сорт Подольский, овес (*Avena sativa* L.) сорт Советский-339, кукуруза (*Zea mays* L.) сорт Будан. В связи с тем, что планируется применять солеустойчивые бактерии на засоленных пастбищах, в опытах использовали смесь семян луговых злаков: тимopheевка луговая (*Phleum pratense* L.), овсяница луговая (*Festuca pratensis* L.) и райграс многолетний (*Lolium perenne* L.), в соотношении 1:1:1.

Изучение азотфиксации бактерий проводили ацетиленовым методом на газовом хроматографе Agilent Technology 7890B (США) [10]. 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 [11]. Повторность опытов трехкратная.

Фосфатмобилизацию бактерий изучали на среде NBRIP модифицированным методом Сэги [12, с. 135–137]. Индекс растворимости или солюбилизации (SI) рассчитывали как отношение общего диаметра (колония + зона гало) к диаметру колонии. Индекс растворимости (SI) штаммов классифицировали в соответствии со шкалой, где $\text{SI} < 2$ – низкий, $2 > \text{SI} < 3$ – средний, $\text{SI} > 3$ – высокий [13]. Исследование проводили в пятикратной повторности.

Для изучения биосовместимости бактерий применяли метод перпендикулярных штрихов [14, с. 245–247].

Для изучения влияния бактерий на рост и развитие культур бактерии выращивали на жидких элективных средах. Семена перед посевом стерилизовали, а затем инокулировали суспензией бактерий из расчета 5 мл с титром 1×10^8 клеток на 1 г семян в течение 2 ч при комнатной температуре. В контроле семена обрабатывали стерильной водопроводной водой. Обработанные семена раскладывали на чашки Петри с агаризованной средой Ковровцева, солевой стресс создавали, добавляя 2% NaCl. Через 10 суток проводили подсчет проростков растений, измерение надземной части и корней. Повторность опытов была пятикратной.

Статистическую значимость полученных результатов анализировали с помощью программы STATISTICA 10.0, ver. 6.0 [15, с. 207–208]. Различия считались значимыми при $p < 0,05$, где значения представлены как среднее значение (M) $\pm$ стандартное отклонение ($\pm \text{SEM}$).

Результаты исследования и их обсуждение

При использовании азотфиксирующих бактерий для засоленных почв одним из наиболее важных показателей является их способность фиксировать молекулярный азот атмосферы при высоком солевом стрессе. Для изучения азотфиксации бактерии выращивали на жидкой среде Эшби, солевой стресс создавали добавлением 500 μM NaCl. В табл. 1 представлены данные по накоплению биомассы и нитрогеназной активности у семи штаммов бактерий, ранее показавших наиболее высокие результаты по солеустойчивости.

Из данных табл. 1 следует, что штаммы солеустойчивых азотфиксирующих бактерий активно фиксируют азот атмосферы при высокой степени засоленности, о чем свидетельствуют высокие показатели накопления биомассы (до 2,75 г/л) и нитрогеназной активности. Наиболее высоким накоплением биомассы и нитрогеназной активностью характеризовались три штамма Az3/29, Azp6/2 и Az22, из них лучшие показатели отмечали у штамма Azp6/2. Эти штаммы были отобраны как наиболее эффективные для применения на засоленных почвах.

Для изучения активности мобилизации фосфатов при различной степени засоленности, бактерии выращивали в жидкой среде NBRIP с различными концентрациями NaCl (100, 250 и 500 μM). Активность растворения фосфора была рассчитана с помощью индекса солюбилизации (SI). Полученные данные приведены в табл. 2.

Таблица 1

Биомасса и нитрогеназная активность азотфиксирующих бактерий

Штаммы	Биомасса, АСБ* г/л	Нитрогеназная активность, $\mu\text{моль } \text{C}_2\text{H}_4/\text{мл/ч}$
Az3/9	2,52±0,1	3,41±0,09**
Az3/23	1,45±0,1	3,56±0,1
Az3/28	2,51±0,08	4,19±0,2
Az3/29	2,61±0,1	4,94±0,08**
Azp6/2	2,75±0,2	5,17±0,3
Az22	2,67±0,1	571±0,2
Az24	1,47±0,07	4,65±0,08**

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

Таблица 2

Фосфатмобилизующая активность бактерий при солевом стрессе

Штаммы	Концентрация NaCl, $\mu\text{моль}$			
	0	100	250	500
	Индекс растворения фосфатов (SI)			
FT4	7,45 ± 0,03	6,67 ± 0,01	5,50 ± 0,02	4,78 ± 0,01
F7A	7,12 ± 0,01	6,08 ± 0,01	5,44 ± 0,01	4,39 ± 0,01
FM19/5	5,89 ± 0,03	4,85 ± 0,02	4,11 ± 0,01	3,29 ± 0,02
FM22	6,28 ± 0,02	5,87 ± 0,01	4,10 ± 0,02	3,18 ± 0,01
FY3	7,16 ± 0,02	6,77 ± 0,03	5,69 ± 0,01	4,61 ± 0,02
FC11/7	6,22 ± 0,03	5,82 ± 0,02	4,21 ± 0,02	3,15 ± 0,01

Примечание: $p < 0,05$; $n = 5$.

Результаты исследований показали, что в условиях солевого стресса солеустойчивые бактерии способны активно мобилизовать фосфаты (табл. 2). Так, при концентрации соли в среде 100 $\mu\text{моль}$ все изоляты характеризовались высокой мобилизацией фосфатов, с увеличением засоленности активность мобилизации фосфатов снижалась. Однако даже при высоком солевом стрессе (500 $\mu\text{моль NaCl}$) все изоляты имели индекс солиобилизации (SI) больше 3, что свидетельствует о высокой активности штаммов. Самое высокое значение индекса растворимости фосфата отмечали у штамма FT4 (SI 4,78), далее следовали штаммы FY3 (SI 4,61) и F7A (SI 4,39). Эти показатели свидетельствуют о том, что штаммы являются солеустойчивыми и способны мобилизовать фосфаты при высоком солевом стрессе.

Для применения бактерий в сельском хозяйстве одним из важных показателей является стимуляция роста культур на засоленных почвах. Изучение влияния соле-толерантных бактерий на рост основных

злаковых культур проводили при засолении, составлявшем 2%. В опытах использовали азотфиксирующий штамм Azp6/2 и фосфатмобилизующий штамм FT4, которые характеризовались наиболее высокими показателями при солевом стрессе. Известно, что микробный консорциум более эффективно стимулирует рост культур по сравнению с отдельными штаммами. В этой связи был проведен опыт по изучению совместности штаммов Azp6/2 и FT4. Установлено, что штаммы биосовместимы и на их основе создан микробный консорциум. Штаммы бактерий и их консорциум были использованы для изучения влияния на рост основных злаковых культур и пастбищных трав. Полученные результаты представлены в табл. 3.

Из данных табл. 3 следует, что инокуляция семян штаммами и микробным консорциумом повышала их всхожесть и улучшала рост культур. Было обнаружено, что микробный консорциум более эффективен по сравнению с отдельными штаммами.

Таблица 3

Влияние штаммов бактерий и консорциума на рост и развитие культур

Варианты опыта	Всхожесть, %	Средняя длина стебля, см	Средняя длина корня, см
Пшеница			
Контроль	68,1±	10,6±	12,3±
Azr6/2	85,7±	21,5±	22,4±
FT4	82,0±	19,8±	20,1±
Консорциум	87,2±	23,2±	24,2±
Ячмень			
Контроль	52,3±	12,6±	13,1±
Azr6/2	73,6±	25,10,2	23,5±
FT4	70,5±	22,40,1	20,6±
Консорциум	76,2±	28,2±	26,3±
Овес			
Контроль		13,1±	9,6±
Azr6/2		22,6±	20,9±
FT4		20,6±	18,9±
Консорциум		26,3±	23,90,2
Кукуруза			
Контроль	60,3±	15,3±	14,5±
Azr6/2	76,2±	29,7±	33,1±
FT4	73,5±	26,0±	30,8±
Консорциум	80,7±	32,3 0,2	36,2±
Пастбищные злаки			
Контроль	40,2±	5,4±0,04	3,2±0,1
Azr6/2	58,0±	16,5±0,1	13,7±0,2
FT4	55,8±	14,3±0,1	12,9±0,1
Консорциум	61,1±	18,8±0,2	14,5±0,2

Примечание: уровень доверительной вероятности $p < 0,05$; $n = 5$.

Так, предпосевная обработка семян консорциумом значительно повысила их всхожесть. При этом всхожесть пшеницы увеличилась до 87% (контроль 78%), ячменя – до 76,2% (контроль 52%), овса – до 70% (контроль 48%), кукурузы – до 80% (контроль 60%), пастбищных злаков – до 61% (контроль 40%). Также установлено, что длина стебля пшеницы и ячменя увеличилась более чем в 2,5 раза, овса и кукурузы – в 2,0 раза, пастбищных злаков – в 3,5 раза, длина корня пшеницы и ячменя – в 2,0 раза, овса и кукурузы – в 2,5 раза, пастбищных злаков – в 4,5 раза.

Заключение

Таким образом показано, что солеустойчивые азотфиксирующие и фосфатмобилизующие бактерии, выделенные из сильнозасоленных почв, могут активно фиксировать азот атмосферы и мобилизовать нерас-

творимые фосфаты почвы даже при высоком солевом стрессе, что крайне важно для их применения в сельском хозяйстве на засоленных почвах. Также установлено, что применение штаммов азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий и их микробного консорциума оказывает высокое положительное влияние на всхожесть семян, рост и развитие культур и пастбищных трав при засолении. Установлено, что микробный консорциум оказывает более эффективное влияние, чем монокультуры. Солетолерантные штаммы и их консорциум можно рекомендовать для создания биоудобрения, повышающего продуктивность сельскохозяйственных культур на засоленных почвах.

Список литературы

1. Tarolli P., Luo J., Park E., Barcaccia G., Masin R. Soil salinization in agriculture: Mitigation and adaptation strate-

- gies combining nature-based solutions and bioengineering // iScience. 2024. Vol. 27, Is. 2. P. e108830. DOI: 10.1016/J.ISCI.2024.108830.
2. FAO. The future of food and agriculture – Drivers and triggers for transformation. 2022. DOI: 10.4060/cc0959en.
3. De Corato U., Viola E., Keswani C., Minkina T. Impact of the sustainable agricultural practices for governing soil health from the perspective of a rising agri-based circular bioeconomy // Applied Soil Ecology. 2024. Vol. 194. P. e105199. DOI: 10.1016/j.apsoil.2023.105199.
4. Ahmed M., Toth Z., Decsi K. The Impact of Salinity on crop yields and the confrontational behavior of transcriptional regulators, nanoparticles, and antioxidant defensive mechanisms under stressful conditions: A Review // International Journal of Molecular Sciences. 2024. Vol. 25, Is. 5. P. 2654. DOI: 10.3390/ijms25052654.
5. Balasubramaniam T., Shen G., Esmacili N., Zhang H. Plants' response mechanisms to salinity stress // Plants (Basel). 2023. Vol. 12, Is. 12. P. 2253. DOI: 10.3390/plants12122253.
6. Li M., Petrie M.D., Lu X., Wang J., Sun X., Hu N., Chen H. Salinization decreases soil phosphorus availability and plant productivity in terrestrial ecosystems // Earth's Future. 2025. Vol. 13, Is. 9. P. e2024EF005738. DOI: 10.1029/2024EF005738.
7. Wang H., Zheng C.L., Ning S.R., Cao C.Y., Li K. J., Dai H.K. Impacts of long-term saline water irrigation on soil properties and crop yields under maize-wheat crop rotation // Agricultural Water Management. 2023. Vol. 286. P. e108383. DOI: 10.1016/j.agwat.2023.108383.
8. Samantaray A., Chattaraj S., Mitra D., Ganguly A., Kumar R., Gaur A., Das Mohapatra P.K., de los Santos-Villalobos S., Rani A., Thatoi H. Advances in microbial based bio-inoculum for amelioration of soil health and sustainable crop production // Current Research in Microbial Sciences. 2024. Vol. 7. P. e100251. DOI: 10.1016/j.crmicr.2024.100251.
9. Maciel-Rodríguez M., Moreno-Valencia F.D., Plascencia-Espinosa M. The Role of Plant Growth-Promoting Bacteria in Soil Restoration: A Strategy to Promote Agricultural Sustainability // Microorganisms. 2025. Vol. 13, Is. 8. P. 1799. DOI: 10.3390/microorganisms13081799.
10. 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.
11. 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 // Frontiers in Microbiology. 2021. Vol. 12. P. e690439. DOI: 10.3389/fmicb.2021.690439.
12. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. М.: Колос, 1983. 296 с.
13. Hone H., Li T., Kaur J., Wood J.L., Sawbridge T. Often *in silico*, rarely *in vivo*: characterizing endemic plant-associated microbes for system-appropriate biofertilizers // Frontiers in Microbiology. 2025. Vol. 16. P. e1568162. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1568162.
14. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология: теория и практика. 3-е изд., испр. М.: Юрайт, 2018. 332 с. ISBN 978-5-534-03806-4.
15. Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных и машинное обучение на STATISTICA. М.: Горячая линия – Телеком, 2023. 354 с. ISBN 978-5-9912-0738-6.