



**«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ –  
МСХА ИМЕНИ К.А. ТИМИРЯЗЕВА»**

**ИНСТИТУТ АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ**

**КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ**

**АЗОТФИКСИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ, КАК КОМПОНЕНТ  
МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ЗАСОЛЕННЫХ ПОЧВ**

**Селицкая О.В.**

Москва, 2021

Засоленные почвы - это большая группа почв разного генезиса и свойств, объединенная одним диагностическим признаком - наличием в профиле легкорастворимых солей в количестве, ухудшающим плодородие почв и отрицательно влияющим на рост и развитие большинства растений.

Высшие растения играют основополагающую роль в формировании микробных сообществ почвы и процессах почвообразования.

Растения вступают в симбиотические взаимоотношения с микроорганизмами, что потенциально повышает их адаптацию к экстремальным условиям.

# Задачи

- Оценить биоразнообразие и биологическую активность микробных сообществ засоленных почв различных регионов;
- Выявить доминирующие таксоны микроорганизмов в почве разной степени засоленности и обозначить наиболее значимые с экологической и агрономической точек зрения;
- Получить чистые культуры азотфиксирующих бактерий из ризосферы галофитных растений и оценить возможность их использования для повышения плодородия почв и урожайности сельскохозяйственных культур.

# Объекты исследования

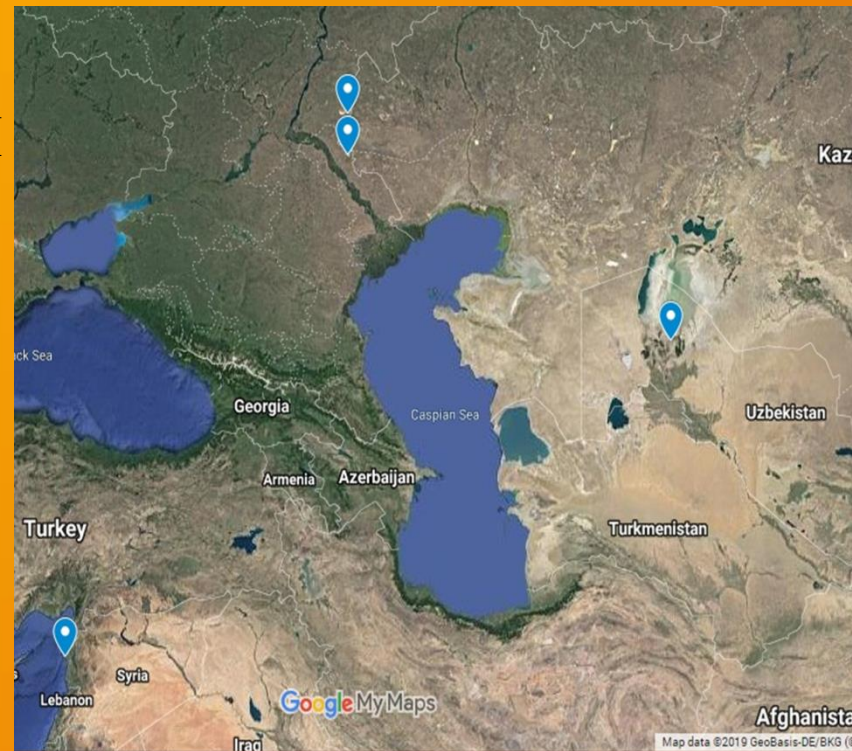


Характеристика	Очень низкое	Низкое	Среднее	Повышенное	Высокое	Очень высокое
Содержание гумуса	100,0 %	-	-	-	-	-
Содержание азота	83,2 %	16,8 %	-	-	-	-
Содержание фосфора	10 %	-	40 %	13 %	33,2 %	3,8 %
Содержание калия	-	-	12,5 %	60,5 %	11 %	16 %



Лугово-сероземные засоленные (солончаковые, местами солончаковатые) почвы, правобережной части Шаульдерского массива орошения (Туркестанская область, Казахстан)

- ▣ Солончаки, сформировавшиеся на месте обсохшего дна Аральского моря (Узбекистан) общая засоленность – 8,3%, рН - 8,70.
- ▣ Солончаки окрестностей озера Баскунчак (Россия)- общая засоленность 7,4%; рН -9,00;
- ▣ Солончаки окрестностей озера Эльтон (Россия) – общая засоленность 8,8%; рН-7,42.
- ▣ Серо-коричневые почвы из Латакии (Сирия) по содержанию солей - средnezасоленные (0,3%).



На сильно засоленных почвах доминирующим видом флоры является Солерос (*Salicornia L.*)

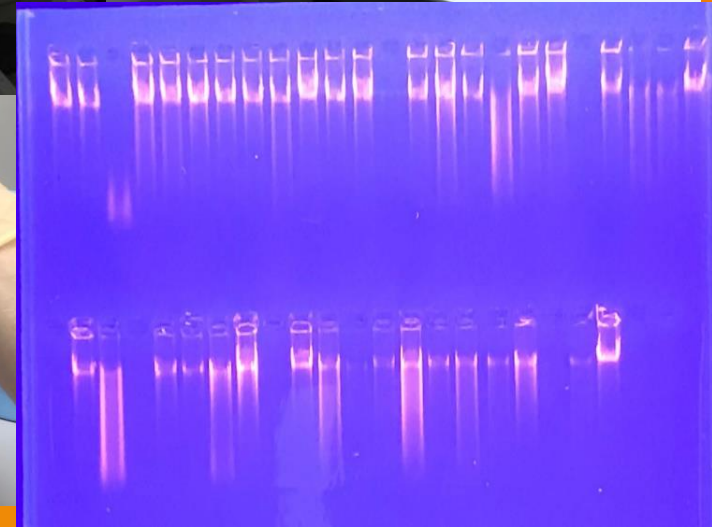
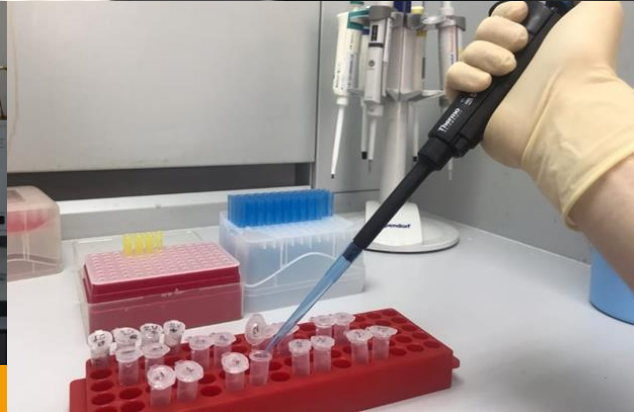




- ▣ климакоптера аральская  
(*Climacoptera aralensis* L.),
- ▣ эфедрa (*Ephedra* L.),
- ▣ дымянкa лекарственнaя  
(*Fumaria officinalis* L.) ,
- ▣ донник (*Melilotus* L.),
- ▣ амсония (*Amsonia* L.) ,
- ▣ солянкa (*Salsola richteri* L.);
- ▣ дереза (*Lycium* L.) и др.

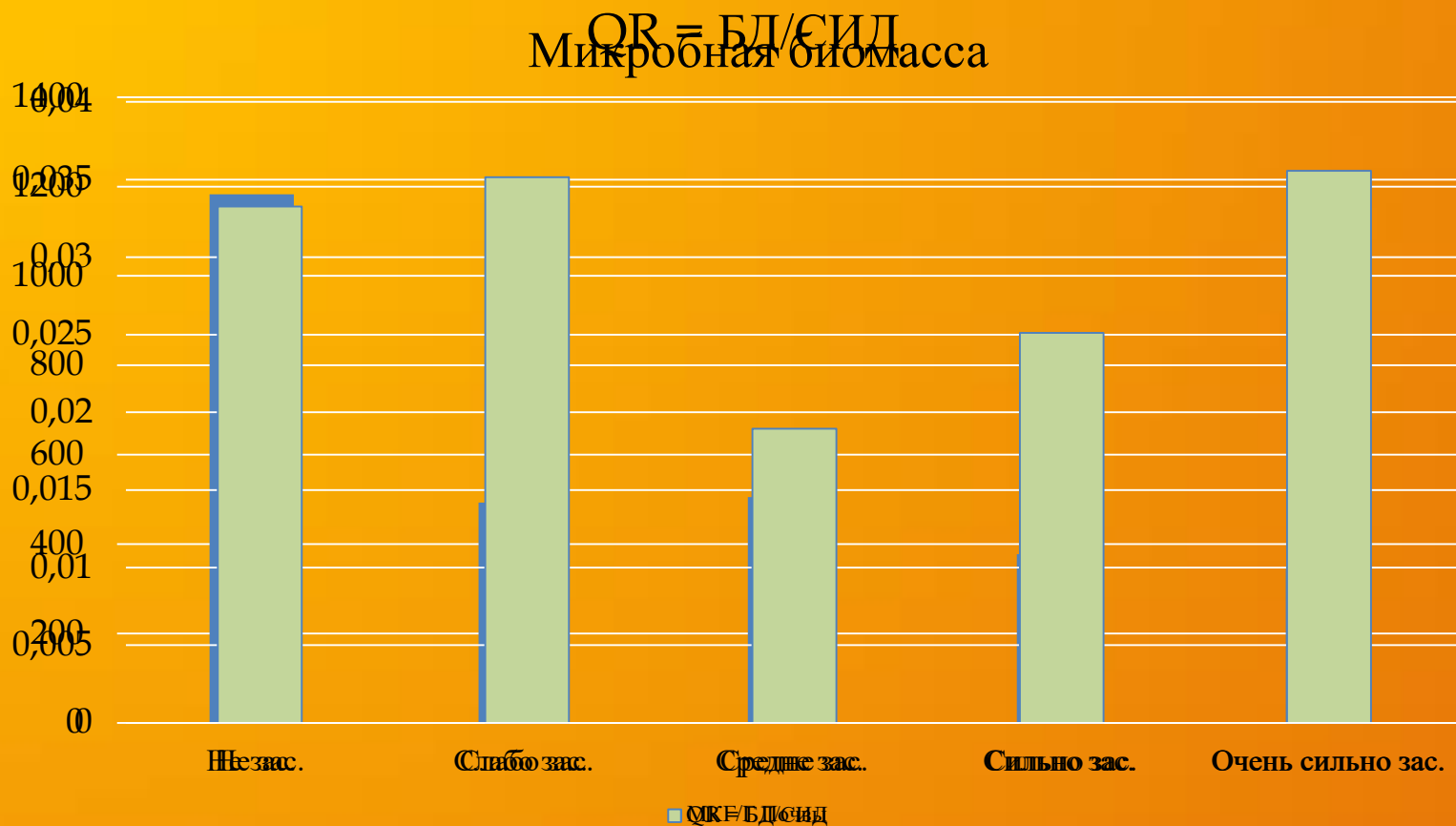


# Методы исследования



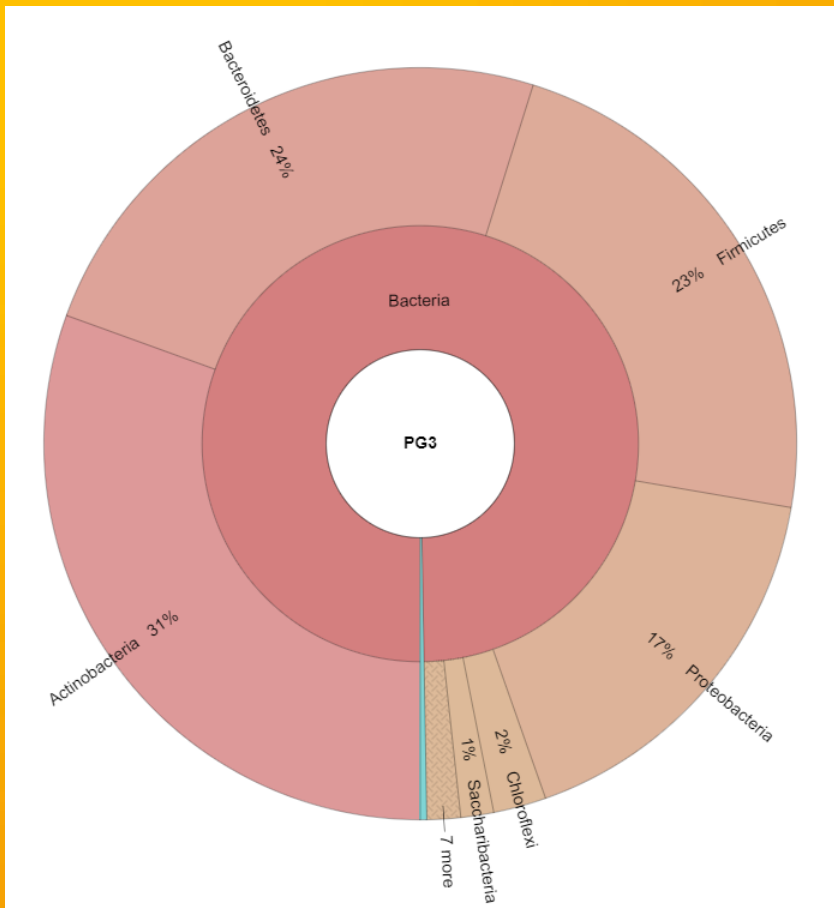


# Зависимость между степенью засоления и активностью биоты лугово-сероземных почв (Казахстан)





# Сильнозасоленная лугово-сероземная почва

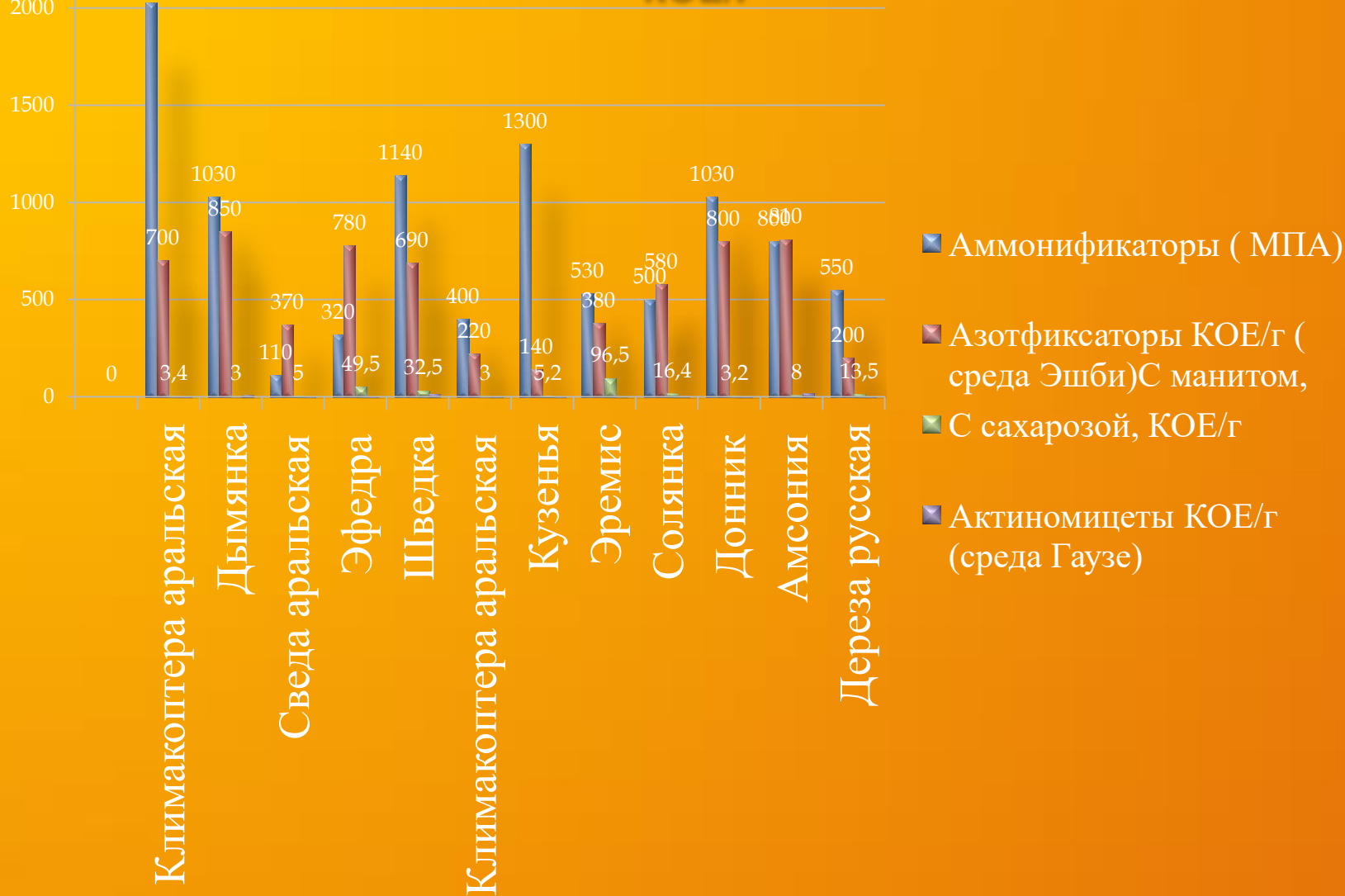


# Анализ данных видового разнообразия микробного сообщества почв разной степени засоленности

Наименование образца	Количество таксономических единиц	Максимальный процент от биоценоза	Индекс Шеннона	Индекс Симпсона
Слабозасоленная лугово-серозёмная почва	845	2.103%	8,828	0,004
Очень сильнозасоленная лугово-серозёмная почва	410	7.612%	6,782	0,023

# Растения играют ключевую роль в формировании микробных сообществ

Численность микроорганизмов ризосферы различных растений  $10^6$  КОЕ/г



Наибольшее количество азотфиксаторов на среде с маннитом выявлено в ризосфере таких растений как:

дымянка (*Fumaria officinalis L.*)  $8,50 \times 10^8$  КОЕ/г;

эфедра  $7,80 \times 10^8$  КОЕ/г,

донник (*Melilotus L.*)  $8,00 \times 10^8$  КОЕ/г,

амсония (*Amsonia L.*)  $8,10 \times 10^8$  КОЕ/г.

Численность азотфиксаторов, растущих на среде с сахарозой, была значительно ниже, чем на среде с маннитом, и составила в ризосфере

солянки (*Salsola richteri L.*) -  $1,64 \times 10^7$  КОЕ/г;

дерезы (*Lycium L.*) -  $1,35 \times 10^7$  КОЕ/г;

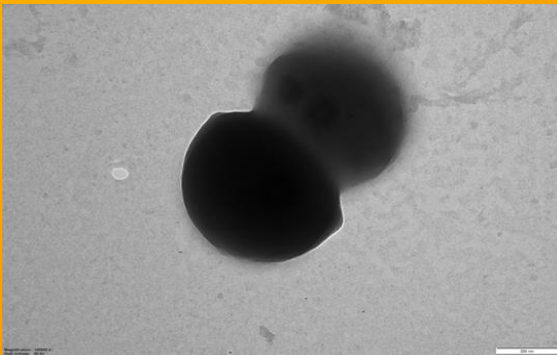
амсонии (*Amsonia L.*) -  $8,00 \times 10^6$  КОЕ/г.

## Анализ биоразнообразия микробных сообществ почв ризосферы

Результаты исследования культивируемых бактерий из засоленных почв показали, что на питательной среде для выявления галофильных бактерий HP101, где концентрация хлорида натрия 10%, биоразнообразие отличалось в каждой географической местности.

Образец почвы ризосферы солероса *Salicornia* (Приаральский регион, Узбекистан) показал наибольшее разнообразие представителей филюмов Proteobacteria: Halomonas и Firmicutes: Planococcus, Thalassobacillus, Piscibacillus, Marinoccus, Halobacillus, Oceanobacillus.

Путем секвенирования гена 16S рРНК установлено, что разнообразие культивируемого микробного сообщества аридной почвы из ризосферы галофитного растения *Salicornia L.*, представлено такими родами бактерий как *Planococcus*, *Oceanobacillus*, *Thalassobacillus*, *Virgibacillus*, *Halobacillus*, *Piscibacillus*, *Marinococcus* (филиум *Firmicutes*) и *Halomonas* (филиум *Proteobacteria*).



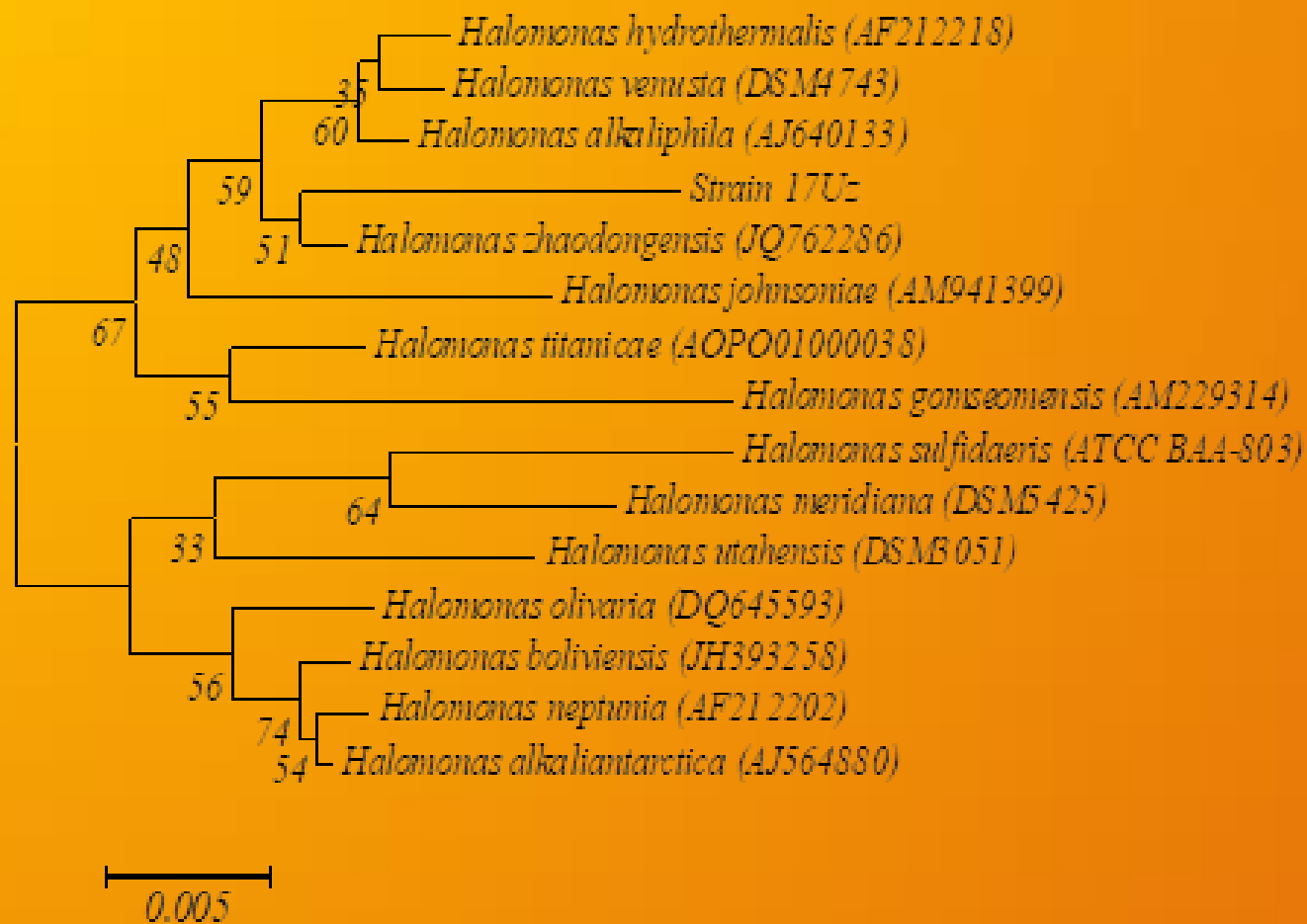
*Planococcus*  
sp.11Uz



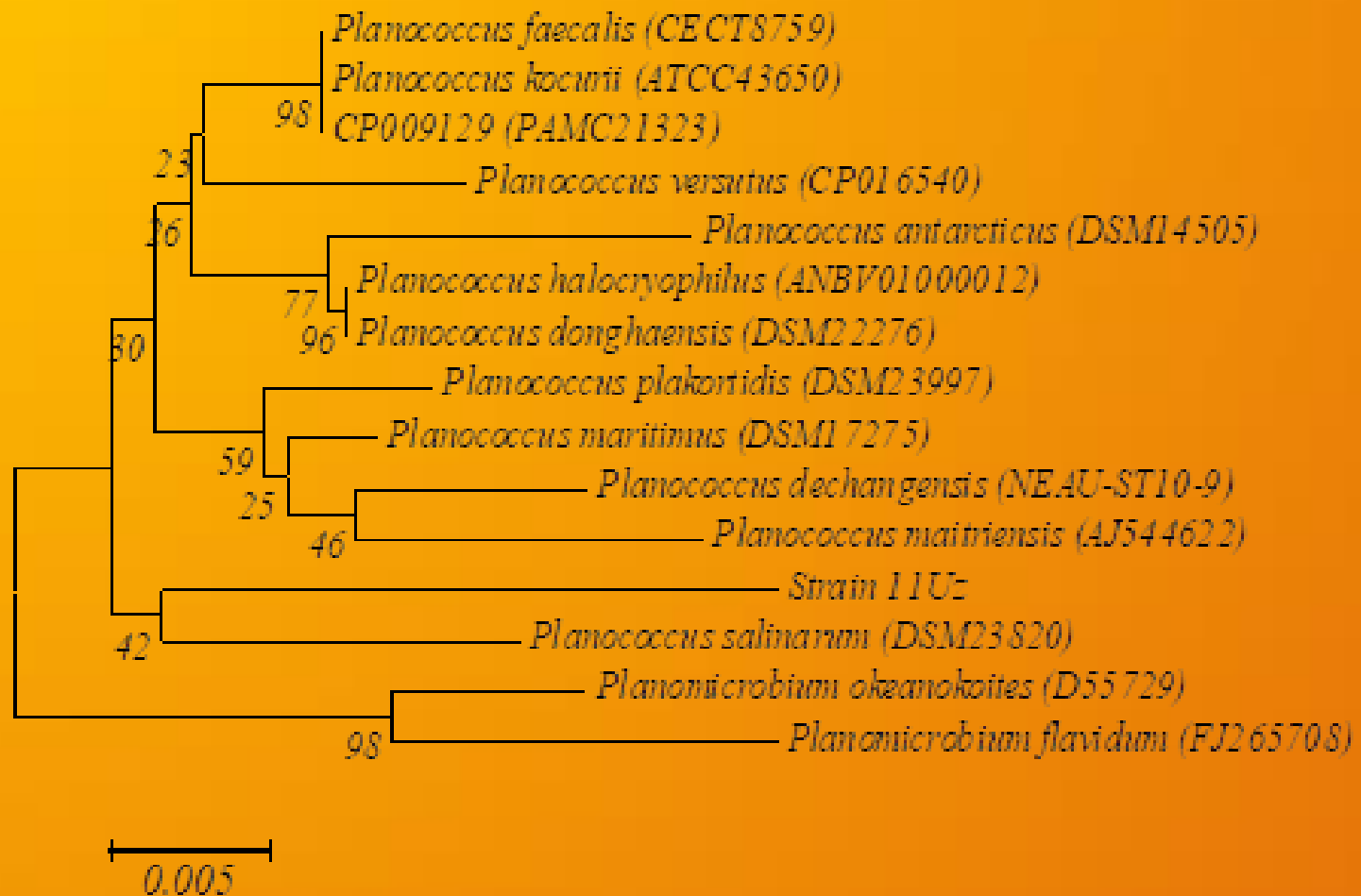
*Halomonas*  
sp.17Uz



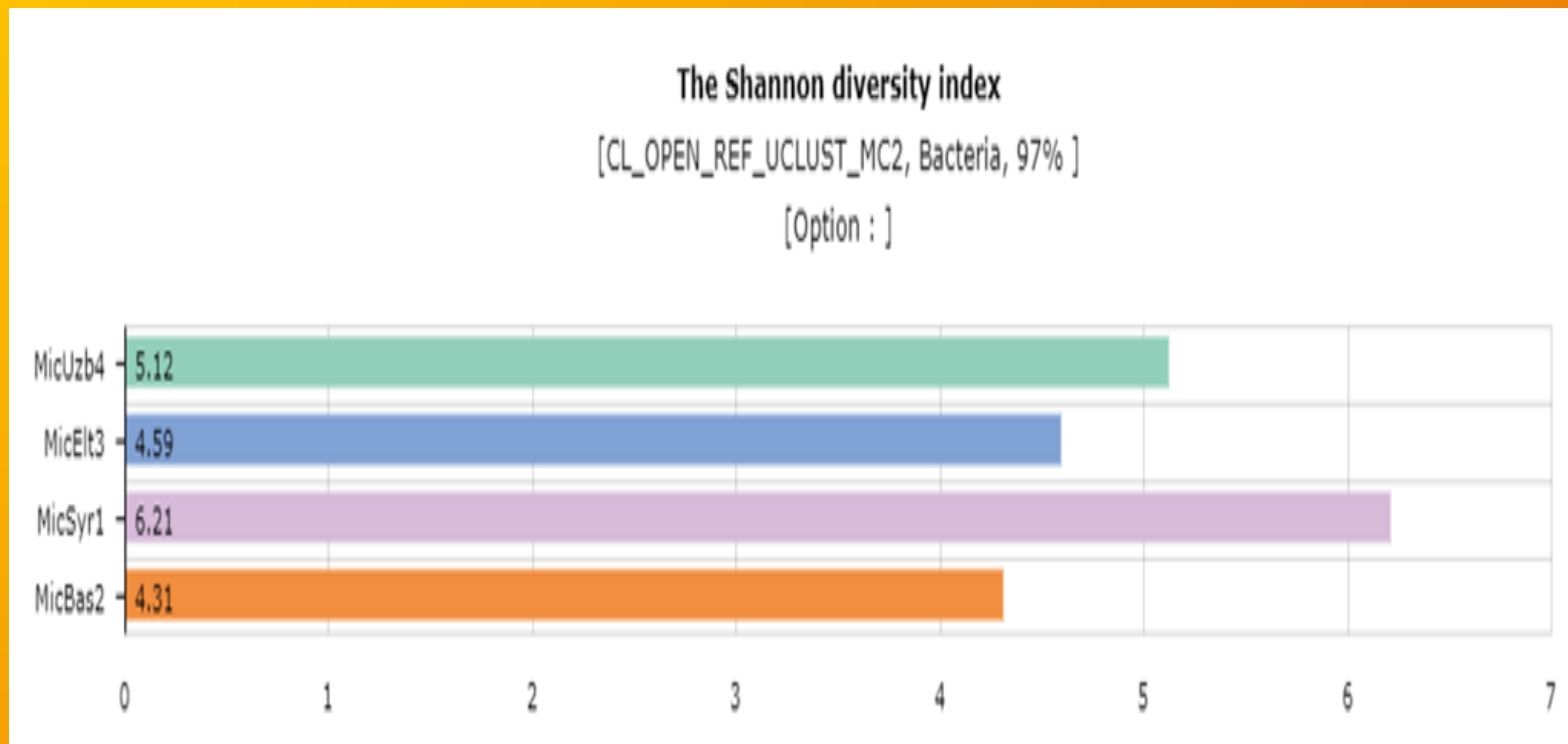
# Расположение штамма *Halomonas* sp.17Uz на филогенетическом древе

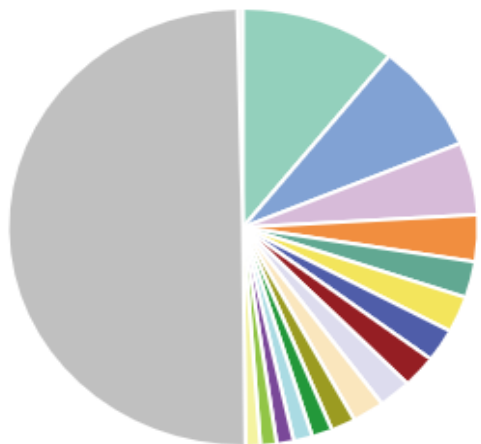


# Расположение штамма *Planococcus* sp.11Uz на филогенетическом древе



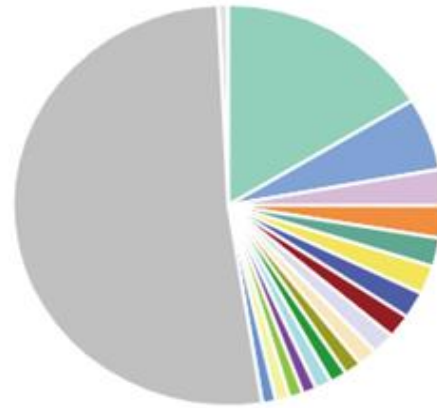
# Разнообразие микробиома почвенных образцов по индексу Шеннона





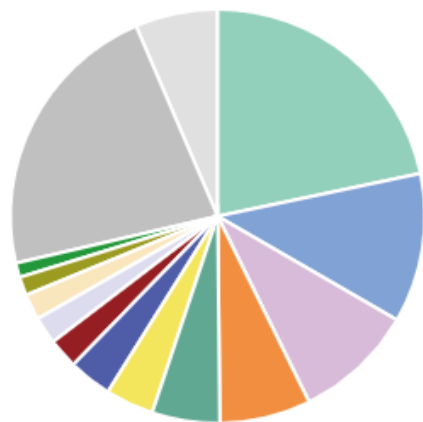
Enterobacteriaceae_uc	10.70%	Stenotrophomonas	8.05%
Halomonas	5.33%	DQ206420_g	3.44%
Mariniphaga	2.67%	EU374093_g	2.66%
FJ152698_g	2.43%	Desulfopila	2.38%
Marinococcus	2.27%	Marinobacter	2.20%
Alkalibacterium	1.69%	Nitriliruptoraceae_uc	1.41%
Nitriliruptor	1.30%	Halospina	1.17%
EU246073_g	1.12%	Desulfobulbaceae_uc	1.01%
ETC [<1.0]	49.79%	Unclassified in higher taxonomic rank	0.38%

Микробиом почвы ризосферы *Salicornia* на уровне рода (солончак, Приаралье)



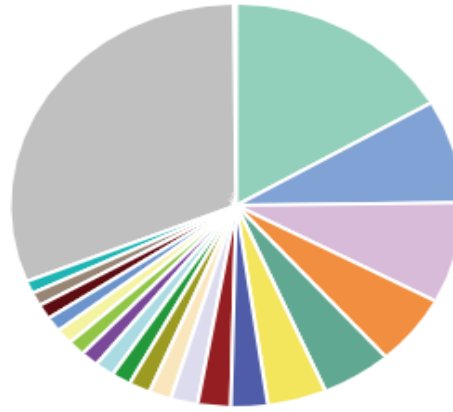
Rubrobacter	16.28%	Gaiella	5.86%
EU289467_g	2.90%	HQ190410_g	2.61%
Tepidisphaera	2.32%	AB630582_g	2.29%
Sphingomonas	2.15%	HM061812_g	1.88%
AY281358_g	1.76%	Streptomyces	1.46%
Nocardioides	1.30%	Microvirga	1.28%
FJ478561_g	1.23%	Solirubrobacter	1.05%
Pseudarthrobacter	1.04%	EU881211_g	1.04%
Mycobacterium	1.03%	ETC [<1.0]	51.79%
Unclassified in higher taxonomic rank	0.73%		

Основные таксономические группы бактерий (на уровне рода) почвы ризосферы растения *Salicornia* (светло-коричневая почва, Сирия)



Fodinibius	21.68%	Salinibacter	11.67%
EU374070_f_uc	9.37%	Balneolaceae_uc	7.11%
AB533884_g	5.28%	JX240660_f_uc	3.77%
EU735649_g	3.38%	Bradymonadaceae_uc	2.35%
HQ396976_g	2.13%	AB533908_g	2.02%
Marinobacter	1.45%	EF632708_g	1.13%
ETC [<1.0]	22.19%	Unclassified in higher taxonomic rank	6.45%

Микробиом почвы ризосферы *Salicornia* на уровне рода  
(солончак, о. Баскунчак)



Pontibacter	16.51%	Deinococcaceae_uc	8.27%
Fodinibius	8.09%	Rhodobacteraceae_uc	5.65%
Bradymonadaceae_uc	5.04%	Salinibacter	4.21%
Marinobacter	2.62%	Rhodovulum	2.36%
Trueperaceae_uc	1.93%	Novosphingobium	1.59%
FN436135_g	1.54%	Nafulsella	1.39%
HQ396976_g	1.39%	Idiomarina	1.28%
Pseudomonas	1.25%	JX240660_f_uc	1.24%
HQ190542_g	1.20%	Rubellimicrobium	1.19%
HQ910322_g	1.09%	Altererythrobacter	1.02%
ETC [<1.0]	30.95%	Unclassified in higher taxonomic rank	0.20%

Микробиом почвы ризосферы *Artiplex cana* на уровне рода  
(солончак, о. Эльтон)

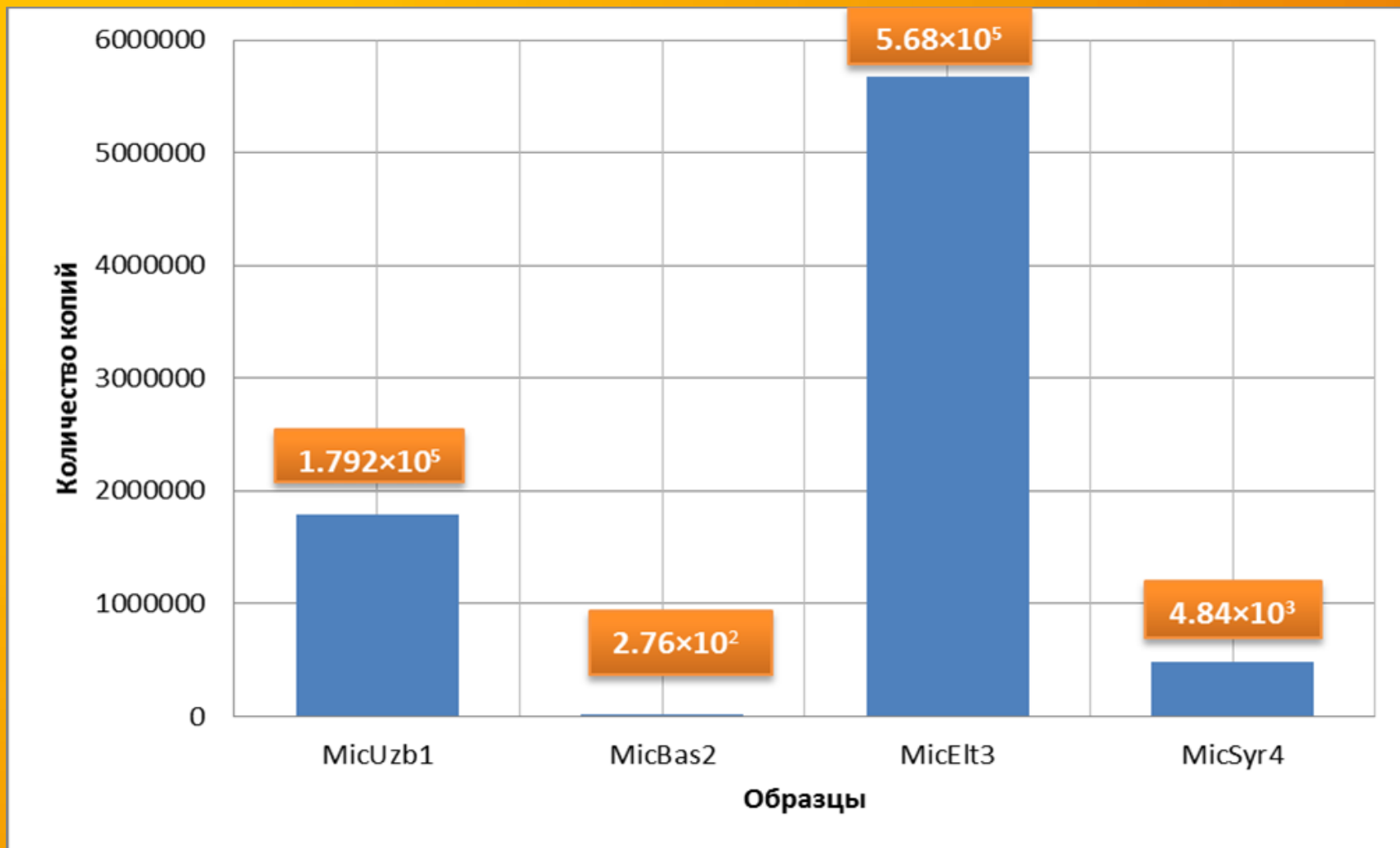
# **Одним из способов повышения солеустойчивости растений является применение галотолерантных ростостимулирующих бактерий ризосферы**

## **Способность выделенных штаммов к азотфиксации**

После обогащения и выделения были получены двенадцать штаммов, и среди них только два штамма, обозначенные как Str01 - штамм из образца почвы Латакии, и Str02 - штамм из образца почвы бассейна Аральского моря, продемонстрировали способность фиксировать азот (восстанавливать ацетилен до этилена). Скорости восстановления ацетилена составляли  $2.24 \pm 0.61$  нмоль  $C_2H_4$  ч<sup>-1</sup> для Str01 и  $0.63 \pm 0.11$   $C_2H_4$  нмоль ч<sup>-1</sup> для Str02.



## Обилие гена нитрогеназы *nifH* в почвенных образцах



Количественный анализ *nifH* гена исследуемых почв (MicUzb1 – Приаралья, MicBas2 - о.Баскунчак, MicElt3 - о.Эльтон, MicSyr4 - Латакия, Сирия)

# Влияние бактериальных культур на прорастания семян кресс-салата в модельном опыте

Инокулянты	Количество прорастающих семян, шт	
	Варианты инокуляции	
	1/100	1/1000
Контроль-вода	6.5±0.54	6.5±0.54
Контроль-питательная среда	10.0±1.09	10.0±1.09
<i>Oceanobacillus</i> sp. 18.2.3	12.2±1.16	20.5±1.22
<i>Halomonas</i> sp. 13.1	12.5±1.04	19.0±1.26
<i>Halobacillus</i> sp. A3	9.5±1.04	18.8±0.75
<i>Virgibacillus</i> sp. Syr1	10.7±0.82	24.0±0.89
<i>Gracilibacillus</i> sp.	12.6±0.82	19.7±1.03

# Выводы

1. Подтверждена экологическая значимость проблемы вторичного засоления почв. С повышением содержания солей в почвах, видовое разнообразие микробного сообщества сокращается, что можно считать одним из показателей деградации почвы
2. Установлено значительное сокращение микробной биомассы при повышении уровня засоления почв (на примере лугово-серозёмных почв Шаульдерского массива орошения).
3. Видовое разнообразие микробиома лугово-серозёмных почв Шаульдерского массива орошения, согласно индексу Шеннона, примерно на 20 процентов выше на слабозасоленных почвах. Индекс Симпсона указывает на отсутствие явно доминирующих видов в очень сильнозасоленных лугово-серозёмных почвах, однако, наблюдается тенденция к сокращению разнообразия.
4. Показано, что доминирующими культивируемыми бактериями сильнозасоленной почвы Приаральского региона (Узбекистан), являются галофильные бактерии родов *Halomonas* и *Planococcus*, относящиеся к разным филогенетическим группам грамотрицательных гамма-протеобактерий и грамположительных фирмикут домена Bacteria.

6. Полученные результаты показывают, что после обогащения в модифицированной среде без азота, содержащей 50 г/л NaCl, из солончака Приаралья, были выделены два изолята, которые восстанавливают ацетилен до этилена и могут культивироваться на среде без азота.

7. Секвенирование гена 16S рРНК показало, что штаммы относятся к родам *Halomonas* (*Proteobacteria*) и *Gracilibacillus* (*Firmicutes*). Результаты измерения нитрогеназной активности показали, что выделенные нами штаммы *Halomonas* (*Proteobacteria*) и *Gracilibacillus* (*Firmicutes*) обладают способностью восстанавливать ацетилен до этилена.

8. Нитрогеназная активность штаммов составила  $1,12 \pm 0,174$  наномоль/час для *Gracilibacillus* sp. и  $0,51 \pm 0,01$  наномоль/час для *Halomonas* sp. соответственно.

9. Установлено, что новый штамм *Halomonas* sp. обладающий способностью к азотфиксации, может использовать в качестве источника углерода широкий спектр органических соединений, выдерживать высокие (до 15%) концентрации соли, что делает его перспективным для разработки бактериального удобрения для улучшения биологических свойств засоленных почв.

# Благодарности

Ибраевой М., Атарову А. (Казахский НИИИ почвоведения и агрохимии им. У.У.Успанова); Кочкаровой С.А. (Каракалпакский государственный университет им.Бердаха); Васильевой Л.В., Берестовской Ю.Ю. (ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН»); Бегматову Ш.А., Ваньковой А.А., Самохину Л.В., Пономареву Г.Ю., Оспенникову Ю.В., Зиновьевой О.В., Трофимову А.С. (РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева)

