

анализе распространения избранных индикаторных видов лишайников. Это эвритоппные виды, но с некоторыми ограничениями в распространении, связанными с кислотностью среды. Для анализа предложены 17 индикаторных видов. В нашем исследовании из них обнаружен только один и из указанных родов – *Usnea* и дополнительно обнаружено 7 видов из 5 родов.

Индексы, основанные на учете всех видов эпифитов, включая и мхи, не дают более высокой корреляции с величиной содержания диоксида серы в атмосфере. В нашем исследовании при увеличении содержания окислов серы и азота в атмосферном воздухе снижается видовое разнообразие лишенофлоры, самыми неустойчивыми в загрязнению оказываются листовые формы, самыми устойчивыми – накипные, в частности род *Cladonia*.

По возрастанию устойчивости к загрязняющим веществам все встреченные виды можно расположить в следующем порядке: *Parmelia sulcata*, *Parmelia olivacea*, *Hypogymnia physodes*, *Physcia aipolia*, *Physcia adscendens*, *Usnea longissima*, *Ramalina synensis*, *Evemium mesomorpha*, *Arctoporeia gemmata*, *Parmelia utrophylloides*, *Cladonia* sp.

По эвритоппности: *Usnea longissima*, *Parmelia sulcata*, *Parmelia olivacea*, *Hypogymnia physodes*, *Physcia aipolia*, *Physcia adscendens*, *Arctoporeia gemmata*, *Ramalina synensis*, *Evemium mesomorpha*, *Parmelia utrophylloides*, *Cladonia* sp.

Сравнение наших исследований и исследований, проведенных в рекреационных зонах г. Ставрополя, показали, что из 10 видов, там встречающихся, в нашем случае встретились всего 2. Это свидетельствует о том, что для разных климатических зон видовой состав лишеносингузий отличается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малышкин, Н.Г. Оценка состояния атмосферного воздуха в районе деятельности промышленного предприятия методом лишеноиндикации / Н.Г. Малышкин // Успехи современного естествознания. – 2018. – № 11-2. – С. 361–365; URL: <https://natural-sciences.ru/ru/article/view?id=36953> (дата обращения: 19.02.2024).
2. Федосеев О.Н., Хурнова Л.М., Мамина Д.Х. Исследование зависимости проективного покрытия лишайниками форофита от ключевых факторов среды // Естественные и технические науки. №10 (173). – М., Издательство «Спутник+», 2022. С. 71–76.
3. Мучник Е.Э., Инсарова И.Д., Казакова М.В. Учебный определитель лишайников Средней России: учебно-методическое пособие / Ряз. гос. ун-т им. С.А. Есенина. - Рязань, 2011. - 360 с.
4. Пчелкин А.В., Боголюбов А.С. Методы лишеноиндикации загрязнений окружающей среды: методическое пособие. - М.: Экосистема, 1997. С. 27.
5. Малышева Н.В. Биоразнообразие лишайников и оценка экологического состояния парковых ландшафтов с помощью лишайников (на примере парков окрестностей Санкт-Петербурга) // Новости систематики низших растений. С.-Пб., 1996. Т. 31. С. 135–137.
6. Van Dobben H.F., ter Braak C.J.F. Ranking of epiphytic lichen sensitivity to air pollution using survey data: a comparison of indicator scales // Lichenologist, 1999. Vol. 31 (1). P. 27–39.
7. Geebelen W., Hoffman M. Evaluation of bio-indication methods using epiphytes by correlating with SO₂-pollution parameters // Lichenologist, 2001. Vol. 33 (3). P. 249–260.

ФИКСАЦИЯ АЗОТА КЛУБЕНЬКАМИ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.) ПРИ ПОМОЩИ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНОВ NITROGEN FIXATION BY PEAS NODULES (*PISUM SATIVUM* L.) USING NITROGEN-FIXING BACTERIA ISOLATED FROM SOILS OF DIFFERENT REGIONS

**А. Э. Юницкий, И. В. Налетов, В. С. Заяц
A. E. Unitsky, I. V. Naletov, V. S. Zayats**

ЗАО «Струнные технологии», г. Минск, Республика Беларусь
v.zayats@unitsky.com
Unitsky String Technologies, Inc. Minsk. Republic of Belarus

Исследования, проведенные в данной работе, посвящены изучению влияния ассоциации почвенных азотфиксирующих микроорганизмов на формирование клубеньков у растений Гороха посевного (*Pisum sativum* L.) Ассоциации азотфиксирующих бактерий были получены из почв различных регионов мира. Оценка влияния выделенных ассоциаций проводилась на жидкой питательной среде без азота. Оценивался среднесуточный прирост вегетативной массы, а также клубеньки на корнях (масса, количество). По результатам исследований была определена ассоциация микроорганизмов, обладающий наибольшим потенциалом к фиксации азота. Данные результаты указывают на важность рассмотрения альтернативных источников азотфиксирующих микроорганизмов при изучении процессов фиксации азота в природных экосистемах.

The research conducted in this work is devoted to the study of the influence of the association of soil nitrogen-fixing microorganisms on nodule formation in plants of pea (*Pisum sativum* L.) Associations of nitrogen-fixing bacteria were obtained from soils of different regions of the world. The influence of the isolated associations was evaluated on liquid nutrient medium without nitrogen. The average daily growth of vegetative mass, as well as nodules on roots (mass, number) were evaluated. Based on the results, the association of microorganisms with the highest potential for nitrogen fixation was identified. These results indicate the importance of considering alternative sources of nitrogen-fixing microorganisms when studying nitrogen fixation processes in natural ecosystems.

Ключевые слова: *Pisum sativum*, клубеньки, азотфиксаторы, ассоциация микроорганизмов.

Keywords: *Pisum sativum*, nodules, nitrogen fixers, association of microorganisms.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-2-67-70>

Продуктивность бобовых культур определяется многими факторами, среди которых, одним из первостепенных, является активность симбиотических взаимоотношений между клубеньковыми бактериями и бобовым растением [1]. При лучшей обеспеченности растений биологическим азотом формируется большая ассимиляционная поверхность, увеличиваются фотосинтетический потенциал, чистая продуктивность фотосинтеза, накопление сухого вещества всеми органами растений и, в конечном счете, урожай и белковая продуктивность посевов. Биологическая фиксация азота (N_2) является процессом преобразования атмосферного азота в биодоступную форму, такую как аммоний (NH_4^+), который используется организмами (бактериями, водорослями, грибами и растениями) для синтеза органических соединений, включая белки и нуклеиновые кислоты. Этот процесс играет важную роль в биогеохимическом цикле азота и является ключевым для поддержания жизни на Земле.

Фермент, ответственный за биологическую фиксацию азота, называется нитрогеназой. Существуют различные формы нитрогеназы, которые отличаются по составу активного центра, в котором содержится переходный металл. Наиболее распространенной и хорошо изученной формой является молибден-нитрогеназа, которая содержит молибден в своем активном центре. Также существуют ванадиевая и железная формы нитрогеназы, иногда называемые альтернативными нитрогеназами [2].

Молибден-нитрогеназа обладает более высокой активностью по сравнению с альтернативными нитрогеназами и экспрессируется преимущественно при наличии молибдена. Бактерии, азотфиксаторы, обычно содержат молибден-нитрогеназу, но некоторые из них также могут иметь гены для ванадиевой или железной нитрогеназы, или для обеих форм. Гены альтернативных нитрогеназ широко распространены в почвах, что указывает на то, что они могут играть роль в процессе фиксации азота при условиях наличия в почве нужных компонентов.

Диазотрофы – это микроорганизмы, способные фиксировать молекулярный азот из атмосферы. У них есть общий биохимический механизм для фиксации азота. Существуют две основные группы микроорганизмов, способных фиксировать атмосферный азот: симбиотические, которые вступают в симбиоз с высшими растениями, и свободноживущие [3].

К первой группе относятся бактерии родов *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mezorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* и другие, которые образуют симбиотические отношения с корневыми системами растений. Они образуют клубеньки на корнях растений, в которых фиксируют атмосферный азот и обеспечивают его доступность для растений [4].

Ко второй группе относятся ассоциативные азотфиксаторы, такие как бактерии родов *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Enterobacter*, а также некоторые другие микроорганизмы. Они способны фиксировать азот в свободной форме, не вступая в симбиотические отношения с растениями. Эти микроорганизмы обычно населяют почву и могут существовать независимо от растений.

Таким образом, диазотрофы разделены на группы в зависимости от своих взаимоотношений с растениями и способности к свободному существованию в почве.

Альтернативные нитрогеназы могут способствовать фиксации азота в почвах при хелатном содержании молибдена, особенно важно в умеренном и тропическом климате, где молибден может быть менее доступным для организмов.

Леггемоглобин, аналогичный гемоглобину крови человека и животных по строению и функции, является красным пигментом клубеньков. Симбиотическая фиксация азота является аэробным процессом. Леггемоглобин связывает кислород, который используется при окислении углеводов для фиксации азота с выделением энергии. Для фиксации 1 мл азота из воздуха требуется 3 мл кислорода. Поэтому клубеньки формируются на корнях растений в наиболее доступном для поступления воздуха слое почвы (0-10 см). Красная окраска клубеньков является хорошим показателем активности симбиоза и свидетельствует о наличии леггемоглобина в клубеньках [5].

Процесс зарождения и раннего развития клубеньков у бобовых запускается химическими сигналами (липидолиполисахаридами), синтезируемыми и секретируемыми белками, кодируемыми генами бактериального клубенька (*nod*). Экспрессия генов *nod* специфически индуцируется флавоноидными соединениями, секретируемыми корнем растения.

Нами были проведены исследования по возможности азотфиксации микроорганизмами, выделенными из возделываемых сельскохозяйственных почв с целью выделения ассоциаций азотфиксирующих бактерий, которые могут играть ключевую роль в цикле азота на территории Республики Беларусь. Более того, наши исследования также были направлены на изучение полезного действия для экологии полей с антропогенным вмешательством в естественную микробиоту почв.

Все ассоциации микроорганизмов были выделены из почв различных регионов – банка почв, расположенном на территории Крестьянско-фермерского хозяйства «Юницкого» в г. Марьино горка.

Для эксперимента по азотфиксации были использованы инокулянты ассоциаций (таб. 1) различных нитрифицирующих и азотфиксирующих бактерий выделенных из почвы различных климатических зон планеты. Растения для эксперимента использовали горох посевной (*Pisum sativum* L.).

Семена растений дезинфицировались в растворе гипохлорита в течении 20 минут, затем семена были помещены в раствор H_2O_2 20 % на 20 минут. После растения промывались стерильной водопроводной водой и в последствии вымачивались в течении двух суток в стерильной водопроводной воде.

После появления корней у растений длиной равной семени производилась обработка заранее подготовленным инокулятом азотфиксирующих бактерий.

Вегетация растений проводилась под светодиодными лампами 6000 люм. светового спектра от 350 нм до 780 нм., 10 часов дневного времени и 14 часов ночного времени. Влажность 90 %, температура от + 20 до + 25 °С, температура почвы от + 15 до + 18 °С. Состав жидкой питательной среды: $P_{20} K_{20} Mg_4 Mo_{0,04}$ г/л. Длительность вегетации оценивалась до цветения (32 дня).

Таблица 1

Список ассоциаций азотфиксирующих бактерий, полученных из почв различных регионов

Наименование ассоциации	Источник из которого выделили бактерии
И10	Образец почвы из Индии, отобранный из полей вдоль реки Дели.
A2	Образец почвы интенсивного культивирования клевера лугового (<i>Trifolium pratense</i> L.) из г. Кобрин
SHA	Образец почвы из США, Южная Каролина, полей органического земледелия
A4	Образец почвы интенсивного возделывания голубики высокой (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) сорта Блюголд из г. Кобрин

После наступления плодоношения растения извлекали из питательной среды, промывали корни и изучали клубеньки ризобактерий.

В ходе вегетации оценивался среднесуточный прирост, среднее количество клубеньков, количество ветвлений корней, а также масса клубеньков.

Таблица 2

Оценка клубеньковых образований на корнях растений

Наименование ассоциации	Среднее количество клубеньков на центральном корне	Количество ветвлений корней	Масса клубеньков с центрального корня, г
И10	17	10	1,0
A2	10	14	0,8
SHA	15	9	1,2
A4	9	13	0,7

По итогам полученных результатов наибольшее количество клубеньков отмечено в образцах И10 и SHA, масса клубеньков так же доминировала в этих двух вариантах эксперимента (1,0 г и 1,2 г соответственно).



A2 И10 A4 SHA

Рисунок 1 – Растения Гороха посевного (*Pisum sativum*) с ассоциацией азотфиксирующих микроорганизмов

Исходя из рисунка 1 можно отметить, что вегетативная масса в вариантах И10 и SHA значительно превосходит другие (15,8 см и 16,3 см, соответственно). Учет различных азотфиксирующих бактерий в исследовании может иметь несколько важных последствий для различий в вегетативной массе между вариантами растений. Азот является одним из основных питательных элементов для растений, и его доступность может ограничивать их рост и развитие. Присутствие азотфиксирующих бактерий способствует фиксации атмосферного азота и его превращению в азотные соединения, которые растения могут использовать для своего роста. Варианты И10 и SHA использовались с определенными азотфиксирующими бактериями, то это может обеспечить им дополнительный источник азота и, следовательно, способствовать более интенсивному росту и развитию их вегетативной массы. Азотфиксирующие бактерии также могут способствовать увеличению поглощения азота растениями. Это происходит через симбиотическое взаимодействие бактерий и растений, где бактерии предоставляют растению доступ к фиксированному азоту, а растение, в свою очередь, обеспечивает бактерии углеводами и другими необходимыми питательными веществами. Увеличенное поглощение азота может способствовать более интенсивному росту и развитию растений, что может проявиться в более высокой вегетативной массе. Некоторые азотфиксирующие бактерии могут также способствовать улучшению устойчивости растений к стрессовым условиям, таким как засуха или недостаток питательных веществ.

Исследование этой проблемы обусловлено необходимостью разработки новых эффективных биологических препаратов. Создание и использование биопрепаратов на основе азотфиксирующих микроорганизмов является эффективным способом повышения продуктивности растений, сохранения плодородия почвы и экологического равновесия. Биопрепараты позволяют регулировать полезную микрофлору в ризосфере растений, а также обеспечивают растения азотом, фиксированным из атмосферы.

Например, в случае дефицита полноценного протеина важную роль играет соя. Однако на почвах, где впервые выращивается эта культура, обычно отсутствуют или имеются в незначительном количестве специфические клубеньковые бактерии (до 20 ед/г почвы), необходимые для фиксации азота.

Таким образом, использование биопрепаратов на основе азотфиксирующих микроорганизмов является важным средством для повышения продуктивности растений, регулирования микрофлоры и обеспечения растений азотом из атмосферы. Биопрепараты, содержащие азотфиксирующие микроорганизмы, могут способствовать увеличению урожайности. Благодаря повышенному доступу к азоту, растения могут формировать больше биомассы, развиваться и цветонести лучше, что в конечном итоге может привести к увеличению урожайности. Помимо этого, микроорганизмы способны обогащать почву азотом и влиять на микробиологическую активность почвы. Это может способствовать более благоприятной микробиоте почвы и улучшению ее структуры. Более здоровая микробиота почвы может повысить доступность питательных веществ для растений и снизить риск развития патогенных микроорганизмов.

Использование биопрепаратов на основе азотфиксирующих микроорганизмов является более экологически устойчивым подходом к удобрению по сравнению с традиционными химическими удобрениями. Биопрепараты меньше нагружают окружающую среду и почву вредными веществами, и их использование может способствовать снижению негативного воздействия на окружающую среду.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ишакаева, М. К. Методы исследования биологической азотфиксации //Рецензенты: Верещак Светлана Борисовна, канд. юрид. наук. – 2021. – С. 10.
2. Бутовина, О. Ю. Высококонкурентные штаммы клубеньковых бактерий – основа эффективности биопрепаратов / О. Ю. Бутовина, Н. З. Толкачев, А. В. Князев // Мікробіол. журн., 2017. – Т. 59. – № 4. – С. 123–131.
3. Шерстобоева, Е. В. Биопрепараты азотфиксирующих бактерий: проблемы и перспективы применения / Е. В. Шерстобоева [и др.] // Мікробіол. журн., 2017. – Т. 59. – № 4. – С. 109–117.
4. Юницкий, А. Э. Изучение микробиологической солюбилизации бурого угля / А. Э. Юницкий [и др.] // Сахаровские чтения 2022 года: экологические проблемы XXI века. – 2022. – С. 322–325.
5. Налётов, И. В. Минимальная ассоциация организмов для плодородия почвы / И. В. Налётов, В. С. Заяц // Сборник материалов IV международной научно-технической конференции «Безракетная индустриализация ближнего космоса: проблемы, идеи, проекты». – ООО «Астроинженерные технологии», 2021. – №. 4. – С. 301–311.