

Всероссийский конкурс юных исследователей окружающей среды
«Открытие 2030» (с международным участием)
Номинация: «Ботаника и экология растений»

**ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕСТНЫХ ИЗОЛЯТОВ
КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ БОБОВО-
РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА У СОРТОВОГО КЛЕВЕРА**

Автор:

Темчура Вега Олеговна,
Россия, Мурманская область, г. Мурманск,
ГАНОУ МО «ЦО «Лапландия», ДТ «Кванториум-51»;
МБОУ МПЛ

Научный руководитель:

Икко Наталья Викторовна, кандидат биологических наук,
заведующий сектором ГАНОУ МО «ЦО «Лапландия»

г. Мурманск, 2022-2023

Оглавление

Введение	3
Раздел I. Теоретическая часть	4
Раздел II. Практическая часть	5
Выводы	9
Заключение	9
Список литературы	9
Приложение 1	11
Приложение 2	12
Приложение 3	13
Приложение 4	14
Приложение 5	15
Приложение 6	16
Приложение 7	17

Введение

В Мурманской области в связи с природными условиями почвенная микрофлора очень бедная, и ее метаболическая активность низкая. Вследствие этого почвы малопродуктивные. Поэтому для выращивания сельскохозяйственных культур необходимо вносить удобрения, в том числе азотные. В настоящее время в сельскохозяйственную практику активно внедряются микробиологические удобрения, в состав которых входят азотфиксирующие бактерии. Применение их, согласно некоторым исследованиям, позволяет стимулировать ростовые процессы, улучшить минеральное питание растений, особенно азотом, снизить химическую нагрузку на окружающую среду [1].

Одним из приемов обогащения почвы азотом является введение в севооборот бобовых растений, которые способны формировать симбиоз с азотфиксирующими бактериями. В некоторых исследованиях встречается информация, что у кормовых сортов бобовых при выращивании в условиях Крайнего Севера не образуются клубеньки из-за отсутствия видоспецифических штаммов симбиотических бактерий [2]. Однако этот вопрос недостаточно исследован в нашем регионе. В связи с этим мы решили провести исследование по формированию клубеньков у кормовых сортов клевера в местных условиях.

Гипотеза: предполагается, что местные изоляты клубеньковых бактерий положительно влияют на формирование бобово-ризобиального симбиоза у сортового клевера.

Цель исследования: проверить влияние штаммов клубеньковых бактерий, изолированных из местных видов клевера, на формирование клубеньков у сортового клевера.

Задачи:

1. Выделить местные изоляты клубеньковых бактерий из клевера лугового и клевера ползучего, проверить их симбиотическую способность на сортах «ВИК 77», «Юбилейный» и «Курцевский».
2. Проверить наличие в почве штаммов, способных вступать в симбиоз с кормовыми сортами клевера.
3. Оценить симбиотический потенциал местных штаммов клубеньковых бактерий.

Объект исследования – местные штаммы клубеньковых бактерий.

Предмет исследования – возможность применения местных штаммов азотфиксирующих бактерий для формирования бобово-ризобиального симбиоза у сортового клевера.

Методы исследования: микробиологический (элективные питательные среды: бобовый агар – для культивирования симбиотических азотфиксаторов; агаризованная минеральная среда и минеральная среда – для изучения образования клубеньков на корнях бобовых растений; методы посева: метод Дригальского, метод истончающего штриха); биохимический – идентификация бактерий по культуральным, морфологическим и физиолого-

биохимическим признакам (окрашивание по Граму); морфологический – описание колоний (размер, цвет, форма, край, поверхность, прозрачность, структура, профиль, консистенция колоний); микроскопический – изучение микроорганизмов в окрашенном и неокрашенном виде с помощью микроскопа; наблюдение.

Практическая значимость: на основе местных штаммов азотфиксирующих бактерий может быть разработан биопрепарат.

Раздел I. Теоретическая часть

Клевер (*Trifolium L.*) относится к многолетнему семейству бобовых. Среди 300 видов клеверов наиболее важное практическое применение имеет клевер луговой (*Trifolium pratense*), клевер ползучий (*Trifolium repens*), клевер гибридный (*Trifolium hybridum*). Основной их особенностью является возможность возделывания как в чистом виде, так и в составе травосмесей. Также, они относятся к ценнейшим кормовым культурам. Если сравнивать с единицы площади других культур, то они обеспечивают больше белка, который усваивается животными значительно лучше.

Симбиотические азотфиксаторы, живущие в клубеньках корней бобовых растений (клубеньковые бактерии), относятся к роду *Rhizobium*. Связывание азота атмосферы возможно только при симбиотической ассоциации микроорганизмов этого вида и высшего растения в основном из семейства «Бобовые». Существует большое количество разновидностей (штаммов) клубеньковых бактерий, каждая из которых приспособлена к заражению одного или нескольких видов бобовых растений. Это отражается в их названиях: *Rhizobium trifolii* - клубеньковые бактерии клевера и *Rhizobium lupini* - клубеньковые бактерии люпина и т.д. [1].

Одним из показателей продуктивности бобовых культур является их азотфиксирующая активность, которая более уже ста лет обеспечивается предпосевной инокуляцией семян разными видами инокуляционного материала на основе клубеньковых бактерий [3]. Инокуляция - (от лат. *inoculatio* — прививка) введение живых микроорганизмов, инфицированного материала, сыворотки или др. веществ в ткани растений, животных или человека (а также в питательные среды).

Использование биопрепаратов, согласно некоторым исследованиям, положительно влияет на формирование симбиотического аппарата, рост и урожайность растения. Так, Г. П. Гамзиков и П. Р. Шотт исследовали эффективность инокуляции биологическими препаратами гороха и овса в одновидных и смешанных посевах. В результате они доказали, что применение бактериальных препаратов оказало положительное влияние на азотфиксирующую активность ризобияльного комплекса, на продуктивность сельскохозяйственных культур [4]. В исследовании С. А. Хапчаевой изучались способы повышения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза. Для этого семена бобовых растений перед посевом обрабатывали суспензией симбиотических микроорганизмов, и они также положительно повлияли на формирование клубеньков на корнях растений [5].

Раздел II. Практическая часть

2.1. Методика исследования

Данная работа была выполнена на базе лаборатории «Биоквантума» детского технопарка «Кванториум-51» (Приложение 1). Исследование проводилось в период с 19.06.22 по 01.11.22. Был отобран клевер луговой (координаты: 68,9954942, 33,0890433), клевер ползучий (координаты: 68,9930521, 33,0878518). В лаборатории «Биоквантума» был осуществлен посев из клубеньков данных растений следующим способом. Корни с клубеньками тщательно отмывались от почвенных частиц, клубенек отрезался, промывался в стерильной воде, трижды сменяя её, помещался в раствор марганцовки (1:1000) в чашке Петри и выдерживался 2-3 минуты. Затем клубенек переносился в чашку Петри со стерильной водопроводной водой, где промывался в течение 5 минут. Далее выдерживался в спирте 1 минуту и промывался в трех последовательных чашках со стерильной водой, выдерживался по 10 минут в каждой. После промывания клубенек был помещен в стерильную чашку и раздавливался скальпелем в капле воды. После этого действия наблюдалось выделение из клубенька мутной желтоватой жидкости – это симбиотические бактерии. Одна петля взвеси переносилась на поверхность бобового агара в чашках Петри и размазывалась шпателем. Этим же шпателем выполнялся посев еще на двух последовательных чашках. Период инкубации 1-2 суток, температура 28-30 градусов по Цельсию [11] (Приложение 2).

Бобовый агар готовился из бобового отвара: 50 г бобов (белой фасоли или гороха) заливают 1 л воды и варят до набухания и растрескивания кожуры (но не до разваривания), фильтруют через вату, доводится водопроводной водой до 1 л, добавляют 1% сахара, 0,05 мл 0,1%-ного раствора K_2HPO_4 и раствором соды устанавливается рН 7. Для получения плотной среды добавляется 1,5—2% агара. Стерилизуется при 121° 20 мин [12].

Для получения чистых культур бактерий из отдельных колоний на чашках Петри был сделан пересев на бобовый агар методом истончающего штриха (Приложение 4). Идентификация бактерий, культивированных на бобовом агаре, проводилась по культуральным, морфологическим и физиолого-биохимическим признакам [12].

После получения чистой культуры бактерий изготавливалась бактериальная суспензия. Для этого культура бактерий снималась с питательной петли микробиологической петлей и помещалась в жидкую бобовую среду.

Клубеньки на корнях бобовых растений можно было наблюдать, помещая корень в специальный фиксирующий раствор. Процесс инокуляции растений культурами бактерий для образования клубеньков на корнях бобовых растений проводился по методу Фереуса [11]. Для обеспечения стерильных условий работа выполнялась в ламинарном боксе. Два предметных стекла толщиной 0,7-0,8 мм с проложенной между ними с одного конца стеклянной пластинкой располагались так, чтобы край одного стекла выступал над краем

другого примерно на 3-5 мм, и прочно связывались нитками. Стеклянные пластинки для прокладки изготавливались из покровных стекол. Системы стёкол стерилизовались в автоклаве. Заполнялось пространство между предметными стеклами стерильной расплавленной агаризованной минеральной средой, измененного состава (г/л): CaCl_2 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,12; K_2HPO_4 – 0,1; $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,15; хелат железа – 100 мкл; следы $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; агар – 6 [11].

В полужидкий агар между стеклами помещались 2 росточка клевера, и системы опускались в стаканчики, в которых была жидкая минеральная среда того же состава. Через сутки ростки были инокулированы суспензией 2—3-суточных культур местных изолятов клубеньковых бактерий, выделенных из клевера лугового и клевера ползучего. Далее препараты изучались под микроскопом (Приложение 6). Образовавшиеся клубеньки были посеяны методом, указанным ранее [12].



Рис. 1. Фото экспериментальной установки для искусственного получения клубеньков на корнях сортового клевера по методу Феруса.

На один сорт было два варианта добавления бактериальной суспензии: в одном стакане бактерии клевера лугового, в другом бактерии клевера ползучего. Контроль был без добавления суспензии бактерий. Всего таких стаканов было 9. Схема эксперимента по методу Феруса представлена в таблице 1. Эксперимент длился 1 месяц.

Таблица 1. Схема эксперимента по методу Фереуса (Зенова и др., 2002).

Вариант	Суспензия клубеньковых бактерий, выделенных из клубеньков клевера лугового	Суспензия клубеньковых бактерий, выделенных из клубеньков клевера ползучего
Контроль («ВИК 77», «Юбилейный», «Курцевский»)	-	-
«ВИК 77» (1)	+	-
«ВИК 77» (2)	-	+
«Юбилейный» (1)	+	-
«Юбилейный» (2)	-	+
«Курцевский» (1)	+	-
«Курцевский» (2)	-	+

Помимо этого, был поставлен второй эксперимент – в почвах Мурманской области. Ростки клевера выращивались на почве из г. Апатиты (разнотравье) и в почве из пгт Молочный (люпин и овес). В качестве контроля были посажены проростки клевера в стерильной почве. Стерильная почва обрабатывалась при температуре 80 градусов по Цельсию в сухожаровом шкафу. Эксперимент длился 1 месяц.

Образцы сельскохозяйственных культур клевера, которые были использованы в двух экспериментах («ВИК 77», «Юбилейный» и «Курцевский») были предоставлены сотрудниками Федерального исследовательского центра Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР). Сорт «ВИК 77» (*Trifolium pratense* L.) – получен в ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса» (Московская обл.). Является зимо- и морозоустойчивым. Допущен к использованию с 2006 г. по Центральному региону. Сорт «Юбилейный» (*Trifolium repen* L.) – получен в ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса» (Московская обл.). Является зимо- и морозоустойчивым. Допущен к использованию с 1979 г. по всем регионам. Сорт «Курцевский» (*Trifolium hybridum* L.) – получен во ФГУП «Котласское» (Архангельская обл.). Является зимо- и морозоустойчивым. Допущен к использованию с 1995 г. по всем регионам.

2.2. Результаты и их обсуждение

Из клубеньков растения клевера лугового и клевера ползучего было выделено 3 типа изолятов клубеньковых бактерий (Приложение 2, 3). Они различались по скорости роста – преобладали быстрорастущие бактерии, встречались также медленнорастущие бактериальные изоляты. Время появления колоний варьировалось в среднем от 2 до 4 дней. Изоляты клубеньковых бактерий при росте на бобовом агаре бесцветные, беловатые, прозрачные, полупрозрачные. По описанию колоний клубеньковых бактерий подходил один тип колоний, выделенных из клубеньков клевера лугового и

клевера ползучего (Приложение 2). Из данной культуры была получена чистая культура бактерий. Биохимическим методом было доказано, что бактерии клевера лугового и клевера ползучего относятся к граммотрицательным палочкам. (Приложение 4). Это указывает на принадлежность выделенных бактерий к группе клубеньковых бактерий.

Результаты изучения образования клубеньков на корнях бобовых растений по методу Фереуса представлены в приложении 5.

Из таблицы видно, что изолят бактерий из клубеньков клевера лугового не вызвал образования клубеньков ни на одном из растений. Изолят из клубеньков клевера ползучего вызвал образование клубеньков у двух сортов: «Юбилейный» и «ВИК 77» (Приложение 6). Клубеньки образовывались только у половины растений каждого сорта, то есть эффективность заражения составила 50%. Клубеньков у сорта «ВИК 77» по количеству больше, но они мельче, чем у «Юбилейного». У клевера сорта «Курцевский» клубеньки не образовались. Вероятно, максимальный эффект от применения бактериальных препаратов часто относится к конкретной культуре или сорту, что не гарантирует получения положительного эффекта на других культурах и сортах. Это связано с узкой специфичностью клубеньковых бактерий при бобово-ризобийном симбиозе к видам растений.

Результаты эксперимента на почвах Мурманской области представлены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты образования клубеньков на корнях сортового клевера, выращенного на почвах Мурманской области (Приложение 7).

Вариант	Сорт клевера	Образование клубеньков (спустя 31 день)	Количество клубеньков в шт. на растение	Процент растений, у которых появились клубеньки, %
Стерильная почва (контроль)	«ВИК 77», «Юбилейный», «Курцевский»	-	-	-
Почва с территории агрофирмы в районе г. Апатиты	«ВИК 77»	+	1,3±1,3	33
	«Юбилейный»	-	-	-
	«Курцевский»	+	5,7±0,7	100
Почва с территории крестьянско-фермерского хозяйства в районе пгт Молочный	«ВИК 77»	+	1,0±1,0	33
	«Юбилейный»	+	2±1,6	66
	«Курцевский»	-	-	-

Из таблицы видно, что образование клубеньков наблюдалось у клевера всех трех сортов. У клевера сорта «Курцевский» эффективность формирования клубеньков 100%. У клевера сорта «Юбилейный» наблюдалось формирование клубеньков у 66% растений, у клевера сорта «ВИК 77» - 33%. Количество клубеньков преобладало у сорта «Курцевский». Вероятно, это свидетельствует о том, что в почве присутствуют те штаммы бактерий, которые необходимы для формирования клубеньков. В контроле все растения погибли к концу эксперимента. Возможно, это связано с отсутствием симбиотических бактерий в почве, без которых растение существовать не может.

Выводы

- 1) Из двух штаммов клубеньковых бактерий, выделенных из местных видов клевера, более эффективным оказался штамм из клубеньков клевера ползучего, так как в эксперименте по методу Фереуса клубеньки образовались у клевера сортов «ВИК 77» и «Юбилейный» под действием бактерий клевера ползучего. Бактерии клевера лугового не заражали растение, в связи с этим не наблюдалось образование клубеньков.
- 2) При выращивании сортового клевера в почвах Мурманской области наблюдалось образование клубеньков у всех сортов клевера. Сорт «Курцевский» оказался наиболее восприимчивым к местным штаммам клубеньковых бактерий.
- 3) Доказана возможность использования местных штаммов клубеньковых бактерий для формирования бобово-ризобияльного комплекса у сортового клевера.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования гипотеза подтверждена: местные клубеньковые бактерии положительно влияют на развитие клубеньков на корнях бобовых растений. Эти результаты продемонстрировали возможность использования местных изолятов клубеньковых бактерий в сельскохозяйственном производстве с целью уменьшения доз минеральных удобрений.

В дальнейшем планируется разработать биопрепарат на основе местных штаммов и доказать его симбиотическую активность на разных сортах клевера, проверить его влияние на урожайность зеленой массы и продуктивность растений в зависимости от штамма клубеньковых бактерий.

Список литературы

Монографии и статьи

1. Тихонович Н.А., Кожемяков А. П., Чеботарь В. К., Круглов Ю. В., Кандыбин Н. В., Лаптев Г. Ю., Биопрепараты в сельском хозяйстве: методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве / Н.А. Тихонович [и др.] // Москва, 2005. – С. 154
2. Ласкин П. В., Хаитбаев А. Х., Ингири А. А. Инокуляция однолетних люпинов клубеньковыми бактериями в условиях Крайнего Севера // Плодородие. – 2010. – №. 2. – С. 53-54

3. Каримова Е. Р., Худайгулов Г. Г. Изучение влияния биопрепарата на основе клубеньковых бактерий *Rhizobium lupini* на бобовые и злаковые культуры //Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. – 2018. – Т. 6. – №. 2. – С. 52-57.
4. Гамзиков Г. П., Шотт П. Р. Эффективность инокуляции биологическими препаратами гороха и овса в одновидовых и смешанных посевах //Агрохимия. – 2007. – №. 11. – С. 42-48.
5. Хапчаева С. А. и др. Генетическое маркирование клубеньковых бактерий и способы повышения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза //Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной наук. – 2018. – С. 54-55.
6. Устюжанин И. А. Реакция новых сортов клевера лугового на инокуляцию клубеньковыми бактериями в условиях северо-восточного региона европейской части России. – 2003.
7. Кириллов М. В. Сельское хозяйство Мурманской области. Состояние растениеводства и кормопроизводства //Современные научные исследования и разработки. – 2017. – №. 6. – С. 92-95.
8. Цыганова А. В., Цыганов В. Е. Роль поверхностных компонентов ризобий в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями //Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132. – №. 2. – С. 211-222.
9. Рябцева М. Ю. Некоторые теоретические и экспериментальные сведения о специфических органах фиксации азота-корневых клубеньках, образующихся в результате симбиоза гороха посевного (*Pisum sativum L.*) и клубеньковых бактерий (рода *Rhizobium*) //Аграрный вестник Урала. – 2009. – №. 6. – С. 41-44.
10. Дегунова Н. Б., Шкодина Е. П. Эффективность применения штаммов клубеньковых бактерий на люцерне //Реализация методологических и методических идей профессора БА Доспехова в совершенствовании адаптивно-ландшафтных систем земледелия. – 2017. – С. 118-123.

Учебные пособия

11. Зенова Г. М. и др. Практикум по биологии почв //М.: Изд-во МГУ. – 2002.
12. Определитель бактерий Берджи / ред. Хоулт Дж., Криг Н., Смит П., Стейли Дж., Уилльямс С. – М.: Мир. – 1997. – Т. 1. – С. 1-429.
13. Клещев Н. Ф. Агробиотехнология: биологическая фиксация молекулярного азота. – 2014.



Рис. 2. Процесс сбора образцов клевера лугового



Рис. 3. Работа в ламинарном боксе, в лаборатории «Биоквантума»:

Приложение 2

Получение накопительной культуры клубеньковых бактерий (посев методом Дригальского)

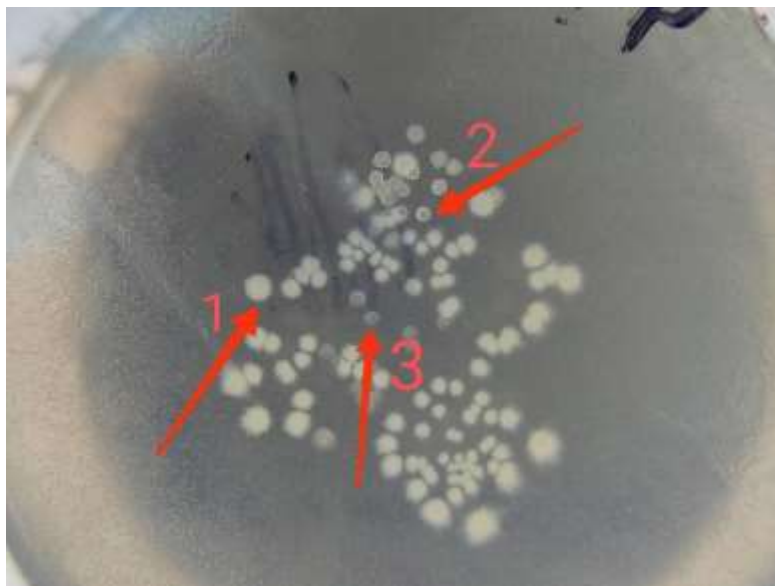


Рис. 4. Получение накопительной культуры клубеньковых бактерий (посев методом Дригальского) из клевера лугового (3 типа колоний).



Рис. 5. Получение накопительной культуры клубеньковых бактерий (посев методом Дригальского) из клевера ползучего (2 типа колоний).

Приложение 3

Таблица 3. Типы образовавшихся колоний на чашках Петри при посеве микроорганизмов методом Дригальского

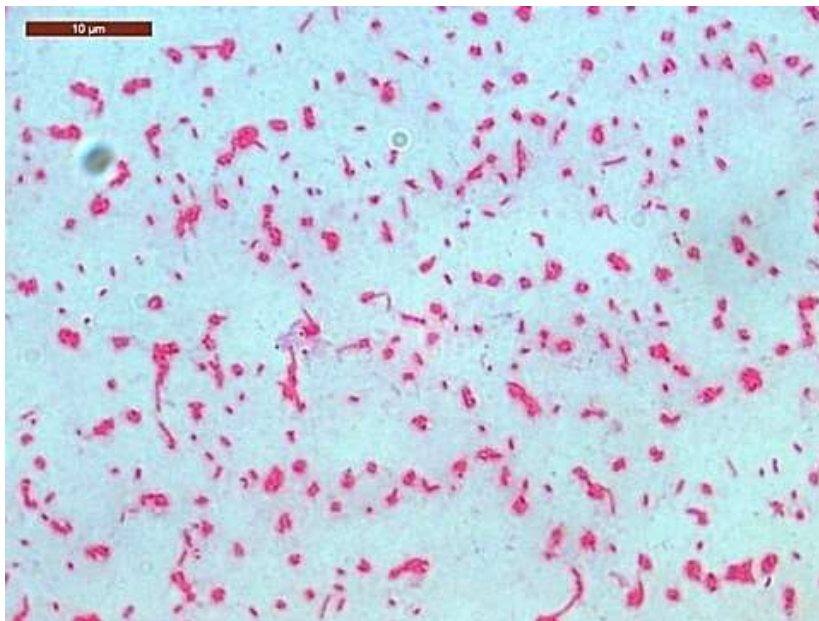
Тип колонии	Цвет	d, мм	Форма	Край	Поверхность	Структура	Профиль	Консистенция	Время появления
1	Беловатая	2-3	Круглая	Ровный	Контур – матовый, центр - блестящий	Однородная	Плоский	Мягкая	1 день
2	Беловатая	2-3	Овальная	Ровный	Блестящая	Однородная	Плоский	Мягкая	2 день
3	Беловатая	-	-	-	Морщинистая	Однородная	Плоский	Мягкая	3 день

Приложение 4

Получение чистой культуры клубеньковых бактерий методом истончающего штриха и окрашивания микропрепаратов бактерий по Граму



Рис. 6. Получение чистой культуры клубеньковых бактерий методом истончающего штриха на бобовый агар; колонии бактерий, с которых был



взят мазок.

Рис. 7. Микропрепарат бактерии клубеньковых бактерий, окрашенных по Граму – грамотрицательные палочки.

Таблица 4. Результаты эксперимента по методу Фереуса (Зенова и др., 2002).

Вариант	Образование клубеньков (спустя 31 день)	Количество клубеньков шт. на растение	Средняя длина клубенька, мм	Средняя масса клубенька, мг	Процент растений, у которых появились клубеньки, %
Контроль («ВИК 77», «Курцевский», «Юбилейный») без добавления бактерий	-	-	-	-	-
«ВИК 77» + клубеньковые бактерии клевера лугового	-	-	-	-	-
«ВИК 77» + клубеньковые бактерии клевера ползучего	+	4,5±4,5	0,59±0,04	0,07	50
«Юбилейный» + клубеньковые бактерии клевера лугового	-	-	-	-	-
«Юбилейный» + клубеньковые бактерии клевера ползучего	+	3,5±3,5	1,25±0,15	0,4	50
«Курцевский» + клубеньковые бактерии клевера лугового	-	-	-	-	-
«Курцевский» + клубеньковые бактерии клевера ползучего	-	-	-	-	-

Приложение 6

Фотографии клубеньков, образовавшихся на корнях сортового клевера (метод Ферреуса).

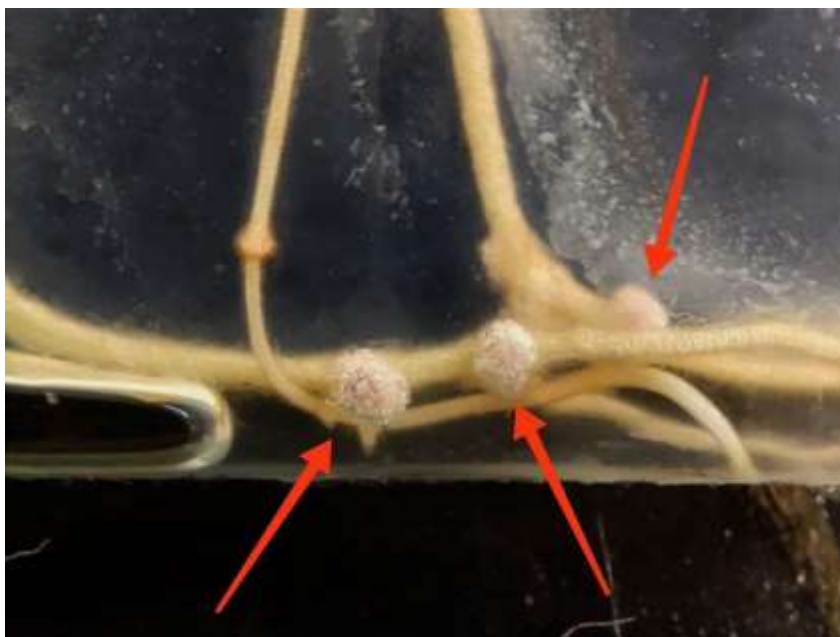


Рис. 8. Образовавшиеся клубеньки на корнях клевера сорта «Юбилейный» с добавлением бактериальной суспензии из клубеньков клевера ползучего.



Рис. 9. Образовавшиеся клубеньки на корнях клевера сорта «ВИК 77» с добавлением бактериальной суспензии из клубеньков клевера ползучего.

Приложение 7

Фотографии клубеньков, образовавшихся на корнях сортового клевера, выращенного на почвах Мурманской области.

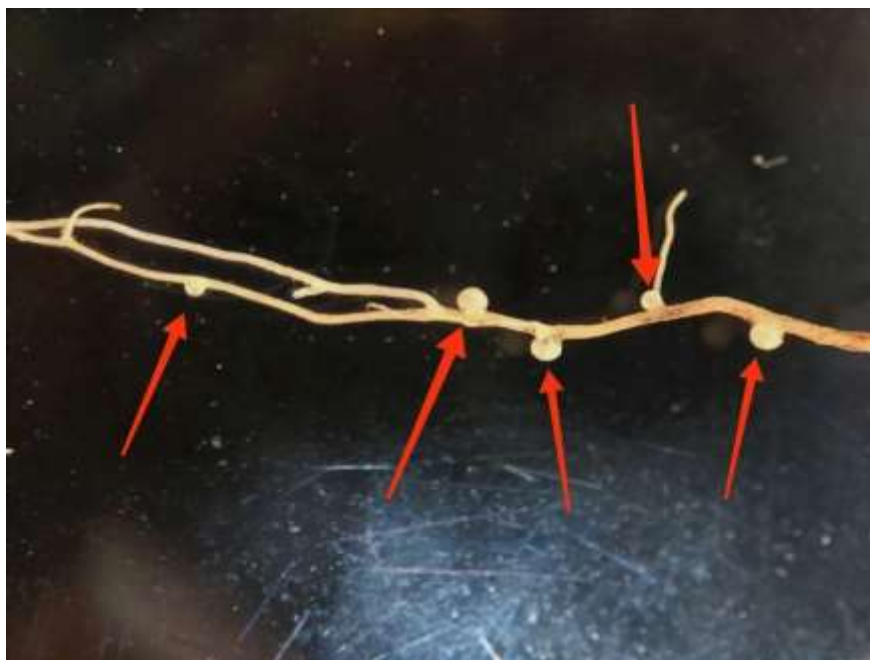


Рис. 10. Образовавшиеся клубеньки на корнях клевера сорта «Курцевский» в почве с территории агрофирмы в районе г. Апатиты.



Рис. 11. Образовавшиеся клубеньки на корнях клевера сорта «Юбилейный» в почве с территории крестьянско-фермерского хозяйства в районе пгт Молочный.