

МРНТИ 34.27.17

И.Э.СМИРНОВА*, Э.Р. ФАЙЗУЛИНА, Л.Г. ТАТАРКИНА,
Г.Б. БАЙМАХАНОВА, Г.А. СПАНКУЛОВА
ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан
*iesmirnova@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ НА ВСХОЖЕСТЬ СЕМЯН И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ ДОННИКА И ЛЮЦЕРНЫ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.08

Аннотация

Изучено влияние целлюлолитических бактерий на всхожесть и развитие разных сортов донника и люцерны. Установлено, что обработка семян целлюлолитическими бактериями повышала всхожесть семян донника до 63,8%, люцерны до 89% и стимулировала рост и развитие растений. При этом, длина стебля донника увеличилась в 1,6-2,8 раза, корня - в 2,1-4,8 раза, длина стебля люцерны в 1,7-3,7 раза, корня в 3,1-5,4 раза. По результатам исследований были отобраны наиболее активные штаммы: три штамма для донника и четыре для люцерны.

Ключевые слова: целлюлолитические бактерии, донник, люцерна, семена, всхожесть, стимуляция роста

Традиционной отраслью АПК республики является животноводство. Основным фактором, сдерживающим развитие этой отрасли, является недостаточность кормовой базы [1]. В Казахстане одними из основных кормо-бобовых культур являются люцерна и донник, которые возделываются на зерно и зеленую массу. Трава донника и люцерны характеризуется высоким содержанием протеина, в состав которого входят основные незаменимые аминокислоты (лизин, валин, триптофан, метионин и др.). Их количественное содержание в белке этих культур в 1,5-3,0 раза выше, чем в белке зерновых [2]. Также, кормо-бобовые культуры способны активно фиксировать азот атмосферы и оставлять с пожнивными остатками в почве до 40-100 кг/га азота, что приравнивается к 10-20 т/га навоза [3]. В будущем эти культуры будут занимать ведущее место в биологическом земледелии для поддержания плодородия почв [4,5]. В тоже время, состояние кормовой базы Казахстана показывает, что доля кормо-бобовых культур в севообороте составляет всего 15%, что в 2 раза ниже рекомендованного, и из-за низкой урожайности культур, существующих посевов недостаточно для развития животноводства Казахстана [6,7].

Одной из причин низкой урожайности кормо-бобовых культур является плохая всхожесть семян, что связано с биологической особенностью их строения. Часть семян донника и люцерны имеет непроницаемую для воды и воздуха оболочку, из-за которой семена не могут прорастать сразу после посева. Это свойство называется твердокаменностью семян. Донник и люцерна содержат до 30-70% таких семян [8]. При посеве из-за твердой оболочки, семена не дают дружных всходов, что создает разреженность посевов и значительно снижает урожайность зеленой массы этих культур с единицы площади [9].

Для повышения всхожести семян донника и люцерны чаще всего используют скарификацию, при которой семена пропускают через специальные машины-скарификаторы [10,11]. Этот метод требует специального оборудования, больших затрат энергии и труда.

Кроме того, механическое воздействие вызывает повреждение не только оболочки, но и зародыша семени, что приводит к его поражению микробами, плесневению и загниванию, в результате этого значительная часть посевного материала пропадает [12]. Также, этот способ требует больших материальных и энергетических затрат, и специального оборудования. В этой связи, разработка доступного и эффективного способа повышения всхожести семян кормо-бобовых культур имеет высокую актуальность.

Биологический способ повышения всхожести семян, основанный на использовании микроорганизмов отвечает всем этим требованиям. Для создания биоудобрения для повышения всхожести наиболее перспективно применять целлюлолитические бактерии. Эти бактерии синтезируют особые ферменты - целлулазы, которые частично разрушают целлюлозу твердой оболочки семян, образуя в ней микротрешины, оболочка семян становится мягкой и зародыш легко прорастает через нее. Этот процесс заменяет процесс механической скарификации семян. На основе целлюлолитических бактерий возможно создание биоудобрение для донника и люцерны, которое будет экологически чистыми, отвечающим требованием охраны окружающей среды, не требующего специального оборудования и больших материальных и энергетических затрат. Для разработки такого удобрения необходимо выделить, отсекционировать штаммы, изучить их влияние на всхожесть семян и отобрать наиболее активные.

Целью данного исследования было изучение влияния штаммов целлюлолитических бактерий на всхожесть семян, рост и развитие донника и люцерны, отбор наиболее активных штаммов.

Материалы и методы

Объектами исследования служили целлюлолитические бактерии, выделенные из почв и целлюлозосодержащих субстратов, собранных на полях Алматинской области Казахстана. В качестве целлюлозосодержащих растительных остатков использовали разложившиеся стебли, листья, корешки растений.

В опытах использовали два сорта донника «Аркас» и «Желтый» и два сорта люцерны (*Medicago sativa L.*) «Семиреченская» и «Семиреченская новая». Сорт «Аркас» относится к доннику белому (*Melilotus albus Medik.*) и характеризуется низким содержанием алкалоида кумарина, сорт «Желтый» относится к доннику желтому (*Melilotus officinalis Pall.*) и является отличным медоносом. Семена растений были предоставлены ТОО «Казахский НИИ земледелия и растениеводства» (отдел кормовых, масличных культур и кукурузы). Эти сорта рекомендованы для выращивания в юго-восточном регионе Казахстана и широко используются фермерами.

Целлюлолитические бактерии были выделены на элективной среде Гетчинсона. Для выделения бактерий 15 г почвы разводили 90 мл дистиллированной стерильной воды и перемешивали на шейкере при 180 об/мин в течение 2 часов. Далее проводили серию разведений, переносив 1 мл полученной суспензии в пробирку, содержащую 9 мл стерильной воды и т.д. до разведения 10^{-8} . Посев микроорганизмов проводили из разведений 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} и 10^{-8} в чашки Петри с агаризованной средой Гетчинсона, на поверхность которой помещали стерильную фильтровальную бумагу. Объем посевного материала составлял 1 мл почвенной суспензии. При выделении бактерий из целлюлозосодержащих субстратов, на фильтровальную бумагу помещали кусочки величиной 1-2 мм [13]. Засеянные чашки инкубировались в термостате при 28°C в течение 10 дней. Каждое

разведение высевали в пятикратной повторности. Чашки культивировали при температуре 30°C в течение 7 суток [14].

Культивирование целлюлолитических бактерий проводили на жидкой элективной среде Гетчинсона на шейкере при 180 об/мин и на твердых питательных средах (среда Гетчинсона, МПА) при температуре 30°C.

Лабораторные опыты по изучению влияния бактерий на всхожесть семян, рост и развитие растений донника и люцерны проводили в климатической камере роста (Constant Climate Chamber HPP-750, «Memmert», Germany). Параметры режима камеры роста: световой день - 12 ч, температура 25°C, освещенность: холодный белый свет - 6500 K, теплый свет 2700 K; ночной режим - 12 ч; температура 15°C, влажность - 65%. Для обработки семян использовали бактериальные суспензии с титром 1×10^8 кл/мл из расчета 15 мл на 100 г семян. Время обработки семян при комнатной температуре составляло 2 часа. Контролем служили семена, замоченные в стерильной водопроводной воде. Далее семена высевали в сосуды на 250 мл с почвой. Количество семян составляло 7 растений на сосуд. Длительность опытов составляла 20 дней. Повторность опытов 3-х кратная.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «STATISTICA 10.0» [15].

Результаты и обсуждение

В лабораторных условиях проведено изучение влияние целлюлолитических бактерий на всхожесть семян и развитие растений донника и люцерны. В опытах использовали шесть штаммов бактерий (C-21(18)N, C-21N2, C-21(2)AS, C-22TN, C-182K, C-604N), которые характеризовались высокой активностью целлюлазного комплекса. Опыты проводили в сосудах с почвой. Семена люцерны и донника перед посевом обрабатывали суспензией бактерий в течение двух часов при комнатной температуре (раздел «Материалы и методы»). В контроле семена замачивали в стерильной водопроводной воде. После этого семян высевали в сосуды с почвой и помещали в камеру роста.

Полученные данные по влиянию целлюлолитических бактерий на всхожесть семян, рост и развитие донника и люцерны представлены в таблице.

Таблица - Влияние на целлюлолитических бактерий на всхожесть семян, рост и развитие донника и люцерны

Варианты опыта	Всхожесть, %	Длина стебля, см	Длина корня, см	Кол-во листьев, шт.	Количество корней, шт.
1	2	3	4	5	6
Донник сорт «Аркас»					
Контроль	20,3	1,88±0,1	1,07±0,03	2,33±0,1	1,0±0,04
C-21(18)N	57,1	4,58±0,2	3,73±0,2	2,88±0,1	2,75±0,1
C-21N2	63,4	5,41±0,3	3,58±0,2	2,79±0,2	1,86±0,1
C-182K	53,5	7,54±0,2	2,73±0,1	2,57±0,1	2,43±0,1
C-21(2)AS	56,8	2,93±0,1	2,25±0,1	2,91±0,1	1,2±0,02

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6
C-22TN	60,6	4,38±0,2	2,59±0,1	2,33±0,1	1,22±0,1
C-604N	57,2	4,94±0,1	3,51±0,2	2,14±0,1	3,30±0,1
Донник сорт «Желтый»					
Контроль	40,3	2,14±0,1	0,94±0,06	1,86±0,1	1,11±0,06
C-21(8)N	57,2	4,81±0,3	3,36±0,3	2,64±0,2	1,14±0,1
C-21N2	49,5	4,64±0,2	2,97±0,1	2,91±0,2	1,20±0,04
C-82K	63,8	5,11±0,3	2,71±0,2	2,86±0,2	2,36±0,2
C-21(2)AS	48,2	5,65±0,2	3,05±0,2	2,77±0,1	1,92±0,05
C-22TN	53,8	2,98±0,08	4,48±0,3	2,40±0,1	1,40 ±0,1
C-604N	57,3	6,84±0,2	3,15±0,1	3,11±0,2	3,18±0,2
Люцерна сорт «Семиреченская новая»					
Контроль	61,3	2,01±0,1	1,05±0,06	2,06±0,1	1,2±0,06
C-21(18)N	85,2	4,71±0,2	3,48±0,2	2,42±0,1	1,26±0,04
C-21N2	89,3	4,02±0,3	2,40±0,1	2,39±0,2	1,86±0,1
C-182K	87,3	4,73±0,1	3,54±0,2	2,73±0,1	1,86±0,1
C-21(2)AS	85,5	6,07±0,3	5,48±0,3	2,73±0,2	2,5±0,1
C-22TN	86,8	3,90±0,2	3,08±0,2	2,56±0,1	2,92±0,2
C-604N	77,2	7,14±0,3	5,71±0,3	2,59±0,2	1,9±0,03
Люцерна сорт «Семиреченская»					
Контроль	40,2	2,12±0,1	1,77±0,06	2,33±0,1	1,17±0,08
C-21(18)N	80,8	4,53±0,3	2,63±0,1	2,27±0,1	1,07±0,06
C-21N2	89,2	2,84±0,2	2,44±0,1	2,4±0,2	1,8±0,04
C-182K	87,3	3,87±0,2	2,97±0,2	2,25±0,1	1,9±0,05
C-21(2)AS	84,6	2,37±0,1	2,91±0,08	2,23±0,2	2,18±0,2
C-22TN	47,3	3,68±0,2	2,29±0,2	2,42±0,1	1,17±0,05
C-604N	79,6	4,19±0,2	2,57±0,2	2,16±0,1	1,68±0,04
Примечание - уровень доверительной вероятности $p<0,05$					

Из данных, приведенных в таблице, следует, что штаммы целлюлолитических бактерий значительно повышали всхожесть семян донника и люцерны. Так, всхожесть обработанных семян донника возросла до 63,8%, в контрольных вариантах всхожесть донника сорта «Аркас» составляла только 20,3%, сорта «Желтый» - 40,3%. Обработка семян

люцерны целлюлолитическими бактериями, повышала всхожесть до 89%, в контроле этот показатель у сорта люцерны «Семиреченская новая» составлял 61,3%, а у сорта «Семиреченская» - 40,2%.

Установлено, что обработка семян бактериями активно стимулировала развитие растений донника и люцерны. При этом, длина стебля донника сорта «Аркас» увеличилась в 1,6-2,8 раза, длина корня - в 2,1-3,5 раза, длина стебля донника сорта «Желтый» - в 1,4-2,6, длина корня - 3,2-4,8 по сравнению с контролем. Длина стеблей люцерны, обработанных бактериями, у сорта «Семиреченская новая» и «Семиреченская» увеличилась в 2,3-3,6 и 1,7-3,7 раза, длина корня у сорта «Семиреченская новая» и «Семиреченская» увеличилась в 3,1-5,4 и 1,3-1,6 раза по сравнению с контролем (рисунок).



Слева - контроль; справа: 1 - обработка семян донника штаммом C-21(18)N; 2 - обработка семян люцерны штаммом C-21N2

Рисунок - Влияние целлюлолитических бактерий на всхожесть семян донника и люцерны

По результатам исследований были отобраны три штамма для донника: C-21(18)N, C-182K, C-22TN и четыре штамма для люцерны: C-21N2, C-182K, C-21(2)AS, C-22TN.

Заключение

Таким образом, изучено влияние целлюлолитических бактерий на всхожесть и развитие растений разных сортов донника и люцерны. Установлено, что предпосевная обработка семян штаммами целлюлолитических бактерий значительно повышала всхожесть

донника и люцерны. Так, всхожесть семян донника возросла до 63,8%, люцерны - до 89%. Также выявлено, что обработка семян бактериями активно стимулировала рост и развитие растений этих культур. При этом, длина стебля донника увеличилась в 1,6-2,8 раза, длина корня - в 2,1-4,8 раза, длина стебля люцерны в 1,7-3,7 раза, корня в 3,1-5,4 раза. По результатам исследований отобраны наиболее активные штаммы бактерий: три штамма для донника и четыре штамма для люцерны.

Дальнейшее тестирование эффективности отобранных штаммов целлюлолитических бактерий в полевых условиях позволит отобрать перспективные штаммы, на основе которых будет создано биоудобрение для этих культур.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках грантового проекта AP08855656.

Литература:

- 1 Юрченко В.А. Путь создания прочной кормовой базы в Казахстане. - URL: <https://kazakhzerno.net/112038-put-sozdaniya-prochnoj-kormovoj-bazy-v-kazakhstane/> (дата обращения 22.10.2021).
- 2 Пелевина А.И. Зернобобовые культуры - решение проблемы белка // Международный журнал социальных и гуманитарных наук. - 2017. - Т. 1(3). - С. 44-46.
- 3 Hua W., Luo P., An N., Cai F. et al. Manure application increased crop yields by promoting nitrogen use efficiency in the soils of 40-year soybean-maize rotation // Scientific reports. - 2020. - Vol. 10. - P. 14882. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71932-9>.
- 4 Kulkarni K.P., Tayade R., Asekova S., Song J.T., Shannon J.G., Lee J.D. Harnessing the potential of forage legumes, alfalfa, soybean, and cowpea for sustainable agriculture and global food security // Frontiers in Plant Science. - 2018. - Vol. 9. - P. 1314.
- 5 Stagnari F., Maggio A., Galieni A. Pisante M. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview // Chemical and biological technologies in agriculture. - 2017. - Vol. 4. - P. 2. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>.
- 6 Исаков А. Продуктивность в животноводстве СКО ухудшается из-за снижения качества кормов. - URL: <https://zonakz.net/2018/04/10/produktivnost-v-zhivotnovodstve-sko-uxudshaetsya-iz-zasnidzeniya-kachestva-kormov/> (дата обращения 19.10.2021).
- 7 Карапуев Е. В Казахстане были нарушены основные принципы развития животноводства. - URL: https://forbes.kz/news/2021/08/13/newsid_256479 (дата обращения - 19.10.2021).
- 8 Игнатьев С.А., Регидин А.А., Грязева Т.В., Горюнов К.Н. Зерновое хозяйство России. - 2019. - № 6(66). - С. 46-49.
- 9 Kokonov S., Ryabova T., Votintsev A., Mokeeva S., Vorobyeva S., Esenkulova O. Influence of presowing seed treatment on the yield of variegated alfalfa and eastern galega // Plant Science Today. - 2021. - Vol. 8(2). - P. 250-254. doi:10.14719/pst.2021.8.2.1000.
- 10 Ахметзянова Р.Р., Каримов Х.З. Прием повышения семенной продуктивности, посевных качеств и урожайных свойств пестрого биридной люцерны // Вестник Омского государственного аграрного университета. - 2017. - № 1(25). - С. 5-10.
- 11 Волошин Е.И., Аветисян А.Т. Руководство по удобрению многолетних бобовых трав. - Красноярск: Красноярский государственный аграрный университет, 2017. - 31 с.
- 12 Kimura E., Islam M.A. Seed scarification methods and their use in forage legumes // Research Journal of Seed Science. - 2012. - Vol. 5. - P. 38-50. DOI: 10.3923/rjss.2012.38.50.
- 13 Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. - М.: МГУ, 191. - 304 с.
- 14 Saha B., Roy S., Hossen F. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from soil sample and their antibiogram. American Journal of Microbiological Research. - 2019. - Vol. 7(3). - P. 83-90. DOI:10.12691/ajmr-7-3-3.
- 15 Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. - М.: Stat Soft, 2013. - 268 с.

И.Э.СМИРНОВА*, Э.Р. ФАЙЗУЛИНА, Л.Г. ТАТАРКИНА,
 Г.Б. БАЙМАХАНОВА, Г.А. СПАНКУЛОВА
 ЖШС «Микробиология и вирусология FTO», Алматы, Қазақстан
 *iesmirnova@mail.ru

ЦЕЛЛЮЛОЛИТИКАЛЫҚ БАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ТҮҚЫМДАРДЫҢ ӨСҮІНЕ ЖӘНЕ ТҮЙЕЖОНЫШҚА МЕН ЖОҢЫШҚА ӨСІМДІКТЕРІНІҢ ДАМУЫНА ӘСЕРІ.

Түйін

Түйежонышқа мен жоңышқаның әртүрлі сорттарының өнуіне және дамуына целлюлолитикалық бактериялардың әсері зерттелді. Түқымдарды целлюлолитикалық бактериялармен өндөу түйежонышқа түқымдарының өнгіштігін 63,8%-ға, жоңышқанықін 89%-ға дейін арттырғаны анықталды. Сондай-ақ, түқымдарды бактериялармен өндөу бұл дақылдардың өсімдіктерінің өсуі мен дамуын ынталандыратыны көрсетілді. Сонымен бірге түйежонышқаның сабактары 1,6-2,8 ретке, тамыры - 2,1-4,8 ретке, жоңышқаның сабағының ұзындығы 1,7-3,7 ретке, тамыры 3,1-5,4 ретке өсті. Зерттеу нәтижелері бойынша ең белсенді штамм ретінде түйе жоңышқа үшін үш штамм және жоңышқа үшін төрт штамм таңдалды.

Кілтті сөздер: целлюлолитикалық бактериялар, түйежонышқа, жоңышқа, түқым, өну, өсуді ынталандыру

IRSTI 34.27.17

I.E. SMIRNOVA*, E.R. FAYZULINA, L.G. TATARKINA,
 G.B. BAIMAKHANOVA, G.A. SPANKULOVA
 LLC «Scientific Production Center for Microbiology and Virology», Almaty, Kazakhstan
 *iesmirnova@mail.ru

EFFECT OF CELLULLOLYTIC BACTERIA ON SEED GERMINATION AND DEVELOPMENT OF SWEET CLOVER AND ALFALFA PLANTS

doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.08

Summary

The effect of cellulolytic bacteria on the germination and development of different varieties of sweet clover and alfalfa was studied. It was found that the treatment of seeds with cellulolytic bacteria increased the germination of seeds of sweet clover up to 63.8%, alfalfa up to 89% and stimulated the growth and development of plants of these crops. At the same time, the sweet clover of the stem length increased by 1.6-2.8 times, the root length - by 2.1-4.8 times, the alfalfa of the stem length by 1.7-3.7 times, the root by 3.1-5 times, 4 times. Based on the research results most active strains were selected: three strains for sweet clover and four for alfalfa as the

Keywords: cellulolytic bacteria, sweet clover, alfalfa, seeds, germination, growth stimulation

The traditional branch of the agro-industrial complex of Kazakhstan is animal husbandry. The main factor hindering the development of this industry is the lack of food supply [1]. In Kazakhstan, one of the main forage and legume crops are alfalfa and sweet clover, which are cultivated for grain and green mass. Sweet clover and alfalfa grass is characterized by a high protein content, which includes the main essential amino acids (lysine, valine, tryptophan, methionine, etc.). Their quantitative content in the protein of these crops is 1.5-3.0 times higher than in the protein of cereals [2]. Also, fodder legumes are able to actively fix atmospheric nitrogen

and leave up to 40–100 kg/ha of nitrogen with crop residues in the soil, which is equivalent to 10–20 t/ha of manure [3]. In the future, these crops will take a leading place in biological farming to maintain soil fertility [4,5]. At the same time, the state of the forage base of Kazakhstan shows that the share of fodder and legumes in the crop rotation is only 15%, which is 2 times lower than the recommended one, and due to the low yield of crops, the existing crops are not enough for the development of animal husbandry in Kazakhstan [6,7].

One of the reasons for the low yield of fodder legumes is the poor germination of seeds, which is associated with the biological features of their structure. Some of the seeds of sweet clover and alfalfa have a shell that is impermeable to water and air, due to which the seeds cannot germinate immediately after sowing. This property is called seed hardness. Sweet clover and alfalfa contain up to 30–70% of such seeds [8]. When sown because of the hard shell, the seeds do not give friendly shoots, which creates a sparse crop and significantly reduces the yield of green mass of these crops per unit area [9].

To increase the germination of sweet clover and alfalfa seeds, scarification is most often used, in which the seeds are passed through special scarifying machines [10,11]. This method requires special equipment, high energy and labor costs. In addition, mechanical impact causes damage not only to the shell, but also to the seed embryo, which leads to its damage by microbes, mold and decay, as a result of which a significant part of the seed material disappears [12]. Also, this method requires large material and energy costs, and special equipment. In this regard, the development of an affordable and effective way to increase the germination of seeds of fodder legumes is of high relevance.

The biological method of increasing the germination of seeds based on the use of microorganisms meets all these requirements. To create a biofertilizer to increase germination, it is most promising to use cellulolytic bacteria. These bacteria synthesize special enzymes - cellulases, which partially destroy the cellulose of the hard shell of seeds, forming microcracks in it, the shell of the seeds becomes soft and the embryo easily grows through it. This process replaces the process of mechanical seed scarification. On the basis of cellulolytic bacteria, it is possible to create a biofertilizer for sweet clover and alfalfa, which will be environmentally friendly, meet the requirements of environmental protection, which does not require special equipment and high material and energy costs. To develop such a fertilizer, it is necessary to isolate, select strains, study their effect on seed germination, and select the most active ones.

The goal of this study was to study the effect of cellulolytic bacteria strains on seed germination, growth and development of sweet clover and alfalfa, and selection of the most active strains.

Materials and methods

The objects of the study were cellulolytic bacteria isolated from soils and cellulose-containing substrates collected in the fields of the Almaty region of Kazakhstan. Decayed stems, leaves, and roots of plants were used as cellulose-containing plant residues.

Two varieties of sweet clover "Arkas" and "Yellow" and two varieties of alfalfa (*Medicago sativa* L.) "Semirechenskaya" and "Semirechenskaya Novaya" were used in the experiments. Variety "Arkas" refers to white sweet clover (*Melilotus albus* Medik.) and is characterized by a low content of coumarin alkaloid, variety "Yellow" refers to yellow sweet clover (*Melilotus officinalis* Pall.) and is an excellent honey plant. Plant seeds were provided by LLP "Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Growing" (department of fodder, oilseeds and corn). These

varieties are recommended for cultivation in the south-eastern region of Kazakhstan and are widely used by farmers.

Cellulolytic bacteria were isolated on Hutchinson's elective medium. To isolate bacteria, 15 g of soil was diluted with 90 ml of distilled sterile water and mixed on a shaker at 180 rpm for 2 hours. Next, a series of dilutions was carried out, transferring 1 ml of the resulting suspension into a test tube containing 9 ml of sterile water, etc. up to a dilution of 10^{-8} . Microorganisms were seeded from dilutions of 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} and 10^{-8} in Petri dishes with agarized Hutchinson's medium, on the surface of which sterile filter paper was placed. The volume of inoculum was 1 ml of soil suspension. When bacteria were isolated from cellulose-containing substrates, pieces 1–2 mm in size were placed on filter paper [13]. Seeded cups were incubated in a thermostat at 28°C for 10 days. Each dilution was seeded in five replicates. The dishes were cultivated at 30°C for 7 days [14].

Cultivation of cellulolytic bacteria was carried out on liquid elective Hutchinson's medium on a shaker at 180 rpm and on solid nutrient media (Hutchinson's medium, MPA) at a temperature of 30°C. Laboratory experiments to study the effect of bacteria on seed germination, growth and development of sweet clover and alfalfa plants were carried out in a climate growth chamber (Constant Climate Chamber HPP-750, Memmert, Germany). Growth chamber parameters: daylight - 12 hours, temperature 25°C, illumination: cold white light - 6500 K, warm light 2700 K; night mode - 12 hours; temperature 15°C, humidity - 65%. For seed treatment, bacterial suspensions were used with a titer of 1×10^8 cells/ml at the rate of 15 ml per 100 g of seeds. The seed treatment time at room temperature was 2 hours. Seeds soaked in sterile tap water served as control. Next, the seeds were sown in 250 ml vessels with soil. The number of seeds was 7 plants per vessel. The duration of the experiments was 20 days. The repetition of experiments is 3-fold.

Statistical processing of the results was carried out using the STATISTICA 10.0 software package [15].

Results and discussion

Under laboratory conditions, the influence of cellulolytic bacteria on the germination of seeds and the development of sweet clover and alfalfa plants was studied. Six strains of bacteria (C-21(18)N, C-21N2, C-21(2)AS, C-22TN, C-182K, C-604N) were used in the experiments, which were characterized by a high activity of the cellulase complex. Experiments were carried out in vessels with soil.

Seeds of alfalfa and sweet clover before sowing were treated with a suspension of bacteria for two hours at room temperature (section "Materials and Methods"). In the control, the seeds were soaked in sterile tap water. After that, the seeds were sown in pots with soil and placed in a growth chamber.

The obtained data on the effect of cellulolytic bacteria on seed germination, growth and development of sweet clover and alfalfa are presented in the table.

Table - Influence on cellulolytic bacteria on seed germination, growth and development of sweet clover and alfalfa

Variants	Germination,%	Stem length, cm	Root length, cm	Number of leaves, pcs.	Number of leaves, pcs..
1	2	3	4	5	6
Sweet clover variety "Arcas"					
Контроль	20,3	1,88±0,1	1,07±0,03	2,33±0,1	1,0±0,04
C-21(18)N	57,1	4,58±0,2	3,73±0,2	2,88±0,1	2,75±0,1
C-21N2	63,4	5,41±0,3	3,58±0,2	2,79±0,2	1,86±0,1
C-182K	53,5	7,54±0,2	2,73±0,1	2,57±0,1	2,43±0,1
C-21(2)AS	56,8	2,93±0,1	2,25±0,1	2,91±0,1	1,2±0,02
C-22TN	60,6	4,38±0,2	2,59±0,1	2,33±0,1	1,22±0,1
C-604N	57,2	4,94±0,1	3,51±0,2	2,14±0,1	3,30±0,1
Sweet clover variety "Yellow"					
Контроль	40,3	2,14±0,1	0,94±0,06	1,86±0,1	1,11±0,06
C-21(8)N	57,2	4,81±0,3	3,36±0,3	2,64±0,2	1,14±0,1
C-21N2	49,5	4,64±0,2	2,97±0,1	2,91±0,2	1,20±0,04
C-82K	63,8	5,11±0,3	2,71±0,2	2,86±0,2	2,36±0,2
C-21(2)AS	48,2	5,65±0,2	3,05±0,2	2,77±0,1	1,92±0,05
C-22TN	53,8	2,98±0,08	4,48±0,3	2,40±0,1	1,40 ±0,1
C-604N	57,3	6,84±0,2	3,15±0,1	3,11±0,2	3,18±0,2
Alfalfa variety "Semirechenskaya new"					
Контроль	61,3	2,01±0,1	1,05±0,06	2,06±0,1	1,2±0,06
C-21(18)N	85,2	4,71±0,2	3,48±0,2	2,42±0,1	1,26±0,04
C-21N2	89,3	4,02±0,3	2,40±0,1	2,39±0,2	1,86±0,1
C-182K	87,3	4,73±0,1	3,54±0,2	2,73±0,1	1,86±0,1
C-21(2)AS	85,5	6,07±0,3	5,48±0,3	2,73±0,2	2,5±0,1
C-22TN	86,8	3,90±0,2	3,08±0,2	2,56±0,1	2,92±0,2
C-604N	77,2	7,14±0,3	5,71±0,3	2,59±0,2	1,9±0,03
Alfalfa variety "Semirechenskaya"»					
Контроль	40,2	2,12±0,1	1,77±0,06	2,33±0,1	1,17±0,08
C-21(18)N	80,8	4,53±0,3	2,63±0,1	2,27±0,1	1,07±0,06

Continuation of table

1	2	3	4	5	6
C-21N2	89,2	2,84±0,2	2,44±0,1	2,4±0,2	1,8±0,04
C-182K	87,3	3,87±0,2	2,97±0,2	2,25±0,1	1,9±0,05
C-21(2)AS	84,6	2,37±0,1	2,91±0,08	2,23±0,2	2,18±0,2
C-22TN	47,3	3,68±0,2	2,29±0,2	2,42±0,1	1,17±0,05
C-604N	79,6	4,19±0,2	2,57±0,2	2,16±0,1	1,68±0,04
Note - confidence level $p<0.05$					

From the data given in the table, it follows that cellulolytic bacteria strains significantly increased the germination of sweet clover and alfalfa seeds. Thus, the germination of treated seeds of sweet clover increased to 63.8%, in the control variants the germination of sweet clover of the variety «Arkas» was only 20.3%, of the sweet clover variety "Yellow" - 40.3%. The treatment of alfalfa seeds with cellulolytic bacteria increased the germination rate to 89%, in the control this indicator for the alfalfa variety "Semirechenskaya New" was 61.3%, and for the variety "Semirechenskaya" - 40.2%.

It was established that seed treatment with bacteria actively stimulated the development of sweet clover and alfalfa plants. At the same time, the length of the stem of the sweet clover variety "Arkas" increased by 1.6-2.8 times, the length of the root - by 2.1-3.5 times, the length of the stem of the sweet clover variety "Yellow" - by 1.4-2.6 , root length - 3.2-4.8 compared with the control. The length of alfalfa stalks treated with bacteria increased by 2.3-3.6 and 1.7-3.7 times in the varieties "Semirechenskaya New" and "Semirechenskaya", the length of the root in the varieties "Semirechenskaya New" and "Semirechenskaya" increased by 3.1-5.4 and 1.3-1.6 times compared with the control (figure).



Left - control; right: 1 - seed treatment of sweet clover strain C-21(18)N; 2 - treatment of alfalfa seeds with strain C-21N2

Figure - Influence of cellulolytic bacteria on the germination of sweet clover and alfalfa seeds

Conclusion

Thus, the effect of cellulolytic bacteria on the germination and development of plants of different varieties of sweet clover and alfalfa was studied. It was established that presowing treatment of seeds with strains of cellulolytic bacteria significantly increased the germination of sweet clover and alfalfa. Thus, the germination of sweet clover seeds increased to 63.8%, alfalfa - up to 89%. It was also found that seed treatment with bacteria actively stimulated the growth and development of sweet clover and alfalfa plants. At the same time, the sweet clover stem length increased by 1.6-2.8 times, the root length - by 2.1-4.8 times, the alfalfa stem length by 1.7-3.7 times, the root length by 3.1-5.4 times depending on the bacterial strain. According to the results of the research, the most active strains of bacteria were selected, for sweet clover - three strains, for alfalfa - four strains.

Further testing of the efficiency of the selected strains of cellulolytic bacteria in the field will allow the selection of promising strains, on the basis of which a biofertilizer for these crops will be created.

The study was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan within the grant project AP08855656.

References:

- 1 Jurchenko V.A. Put' sozdanija prochnoj kormovoj bazy v Kazahstane. URL: <https://kazakh-zerno.net/112038-put-sozdaniya-prochnoj-kormovoj-bazy-v-kazakhstane/> (data obrashhenija 22.10.2021).
- 2 Pelevina A.I. Zernobobovye kul'tury - reshenie problemy belka. Mezhdunarodnyj zhurnal social'nyh i gumanitarnyh nauk. 2017. T. 1(3). S. 44-46.
- 3 Hua W., Luo P., An N., Cai F. Manure application increased crop yields by promoting nitrogen use efficiency in the soils of 40-year soybean-maize rotation. Scientific reports. 2020. Vol. 10. P. 14882. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71932-9>.
- 4 Kulkarni K.P., Tayade R., Asekova S., Song J.T., Shannon J.G., Lee J.D. Harnessing the potential of forage legumes, alfalfa, soybean, and cowpea for sustainable agriculture and global food security. Frontiers in Plant Science. 2018. Vol. 9. P. 1314.
- 5 Stagnari F., Maggio A., Galieni A., Pisante M. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. Chemical and biological technologies in agriculture. 2017. Vol. 4. P. 2. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>.
- 6 Iskakov A. Produktivnost' v zhivotnovodstve SKO uhudshaetsja iz-za snizhenija kachestva kormov. URL: <https://zonakz.net/2018/04/10/produktivnost-v-zhivotnovodstve-sko-uxudshaetsja-iz-za-snizheniya-kachestva-kormov/> (data obrashhenija 19.10.2021).
- 7 Karashukev E. V Kazahstane byli narusheny osnovnye principy razvitiya zhivotnovodstva. URL: https://forbes.kz/news/2021/08/13/newsid_256479 (data obrashhenija - 19.10.2021).
- 8 Ignat'ev S.A., Regidin A.A., Grjazeva T.V., Gorjunov K.N. Zernovoe hozjajstvo Rossii. 2019. № 6(66). S. 46-49.
- 9 Kokonov S., Ryabova T., Votintsev A., Mokeeva S., Vorobyeva S., Esenkulova O. Influence of presowing seed treatment on the yield of variegated alfalfa and eastern galega. Plant Science Today. 2021. Vol. 8(2). P. 250-254. doi:10.14719/pst.2021.8.2.1000.
- 10 Ahmetzjanova R.R., Karimov H.Z. Priem povyshenija semennoj produktivnosti, posevnyh kachestv i urozhajnyh svojstv pestrogibridnoj ljucerny. Vestnik Omskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2017. № 1(25). S. 5-10.
- 11 Voloshin E.I., Avetisjan A.T. Rukovodstvo po udobreniju mnogoletnih bobovyh trav. - Krasnojarsk: Krasnojarskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet, 2017. 31 s.
- 12 Kimura E., Islam M.A. Seed scarification methods and their use in forage legumes // Research Journal of Seed Science. 2012. Vol. 5. P. 38-50. DOI: 10.3923/rjss.2012.38.50.
- 13 Zvjagincev D.G. Metody pochvennoj mikrobiologii i biohimii. M. MGU, 191. 304 s.
- 14 Saha B., Roy S., Hossen F. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from soil sample and their antibiogram. American Journal of Microbiological Research. 2019. Vol. 7(3). R. 83-90. DOI:10.12691/ajmr-7-3-3.
- 15 Borovikov V.P. Populjarnoe vvedenie v sovremenneyj analiz dannyh v sisteme STATISTICA. M.: Stat Soft, 2013. 268 s.