

УДК 579.64

АГРОНОМИЧЕСКИ ЦЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ И ИХ АССОЦИАЦИЯ ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

Смирнова И.Э., Саданов А.К.

ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии», Алматы, e-mail: iesmirnova@mail.ru

Сахарная свекла является одной из наиболее экономически значимых технических культур. Однако урожайность этой культуры в России и Казахстане по сравнению с другими странами мира невысокая. Одной из причин снижения урожайности сахарной свеклы являются ее болезни. Наибольший урон наносят корневые гнили, вызываемые фитопатогенными грибами. Целью данного исследования было выделение и отбор новых высокоактивных штаммов азотфиксирующих, фосфатмобилизирующих и целлюлолитических бактерий и создание на их основе ассоциации агрономически ценных микроорганизмов для биоконтроля корневых гнилей сахарной свеклы, стимуляции развития и повышения ее урожайности. Из почв Жамбылской области Казахстана были выделены новые штаммы азотфиксирующих, фосфатмобилизирующих и целлюлолитических бактерий. Исследована их биологическая активность и отобраны наиболее активные. Для создания эффективной ассоциации проведено исследование биосовместимости штаммов и подобраны штаммы с отсутствием антагонизма по отношению друг к другу. На основе этих штаммов создана ассоциация агрономически ценных микроорганизмов. Изучение ростостимулирующих свойств ассоциации выявило ее высокое положительное влияние на рост и развитие растений сахарной свеклы. Так, при инокуляции семян бактериальной суспензией ассоциации длина стебля растений увеличилась в 2,0 раза, корней – 2,5 раза по сравнению с контролем. Проведенные исследования показали, что ассоциация является перспективным агентом для биоконтроля фитопатогенных грибов, вызывающих корневые гнили сахарной свеклы, так как обладает высокой антифунгальной активностью. В отношении гриба *Fusarium oxysporum* она проявлялась формированием зоны лизиса диаметром 30 мм; в отношении *Fusarium solani* – 39,7 мм; в отношении гриба *Alternaria alternata* – 48,5 мм. Новизна данного исследования заключается в том, что создана ассоциация агрономически ценных микроорганизмов, на основе новых аборигенных штаммов бактерий, адаптированных к природно-климатическим условиям Казахстана. Созданная ассоциация обладает комплексным действием: стимулирует развитие растений сахарной свеклы и характеризуется высокой антифунгальной активностью по отношению к основным фитопатогенным грибам, вызывающим корневые гнили этой культуры.

Ключевые слова: азотфиксирующие, фосфатмобилизирующие, целлюлолитические бактерии, ассоциация агрономически ценных микроорганизмов, ростостимуляция, антифунгальная активность, сахарная свекла

AGRICULTURALLY IMPORTANT MICROORGANISMS AND THEIR ASSOCIATION FOR AGRICULTURE

Smirnova I.E., Sadanov A.K.

LP «Scientific Production Center of Microbiology and Virology», Almaty, e-mail: iesmirnova@mail.ru

Sugar beet is one of the most economically significant industrial crops. However, the yield of this crop in Russia and Kazakhstan compared with other countries of the world is not high. The main reason for the decline in sugar beet yield is its disease. The most harmful of which are root rot caused by phytopathogenic fungi. The aims of this study was the isolation and selection of highly active strains of nitrogen-fixing, phosphate-mobilizing and cellulolytic bacteria, and the creation on their basis of the Associations of agriculturally important microorganisms for the biocontrol of root rot, stimulation of sugar beet and increase its yield. Nitrogen-fixing, phosphate-mobilizing and cellulolytic bacteria were isolated from the soils of the Zhambyl region of Kazakhstan. Their biological activity was studied; strains with high activity were selected. To create an effective association, the biocompatibility of strains was studied and strains with no antagonism to each other were selected. On the basis of these strains, an association of agronomically important microorganisms was created. It is shown that the association has a high positive effect on the development of sugar beet plants. So, when the seeds were inoculated with bacterial suspension by the association, the length of the stem increased 2.0 times, the roots 2.5 times compared to the control. Studies have shown that the association is a promising agent for the biocontrol of phytopathogenic fungi that cause root rot of sugar beet, as it has high antifungal activity. The zone of inhibition of the growth of the fungus *Fusarium oxysporum* was 30 mm in diameter; *Fusarium solani* – 39.7 mm; *Alternaria alternata* – 48.5 mm. The novelty of this study is the creation of an association of agronomically important microorganisms, based on novel native bacterial strains adapted to the climatic conditions of Kazakhstan. The created association has a complex effect: it stimulates the growth of sugar beet plants and has high antifungal activity against phytopathogenic fungi that cause root rot of this crop.

Keywords: nitrogen-fixing, phosphate-mobilizing, cellulolytic bacteria, association of agronomically important microorganisms, growth stimulation, antifungal activity, sugar beet

Сахарная свекла – одна из основных технических культур. В мировом земледелии она занимает значительную площадь – 7,913 млн га, в наибольшем количестве сахарная свекла производится в России,

за ней следуют Франция и Соединенные Штаты [1]. В то же время урожайность сахарной свеклы в России и Казахстане по сравнению с другими странами низкая. Так, урожайность сахарной свеклы в США

составляет 530–650 ц/га, во Франции – 840–910 ц/га, России – 450–470 ц/га, в Казахстане этот показатель составляет всего лишь 153–285 ц/га [2]. Выращивание сахарной свеклы наносит существенный урон почвам, так как с урожаем выносятся большое количество питательных элементов, что вызывает сокращение почвенной микробной массы и ее биоразнообразия. Кроме того, многие свеклосеющие хозяйства не применяют ротацию культур и сеют сахарную свеклу на полях до 5–7 лет, что приводит к накоплению фитопатогенов, вызывающих болезни сахарной свеклы. Вследствие этого нередко в почвах хозяйств наблюдается массовое развитие гнилей корнеплодов сахарной свеклы, видовой состав которых представлен лишь 2–3 видами фитопатогенных грибов. Так, потери урожая сахарной свеклы от корневых гнилей в России доходят до 30%, в Казахстане – до 40% [3, 4]. Во многих странах мира корневые гнили также наносят существенный урон урожайности сахарной свеклы (до 30–35%) [5].

Одним из путей решения этой проблемы является биологизация земледелия, достоинствами которой являются: экологичность; снижение затрат и повышение качества продукции. Существенным фактором восстановления плодородия почвы является применение агрономически ценных микроорганизмов. Именно эти микроорганизмы осуществляют в почве процесс гумификации растительных остатков и органических веществ почвы и занимают основное место в обогащении почв гумусом – главного фактора плодородия почвы. В состав ассоциаций, как правило, входят основные группы почвенных микроорганизмов: азотфиксирующие, целлюлолитические, фосфатмобилизующие и силикатные.

Почва является основным природным банком при поиске культур микроорганизмов с любыми необходимыми свойствами. По некоторым данным штаммы, выделенные из ризосферы, активно колонизируют корневую зону растений и синтезируют биологически активные вещества, способствующие их развитию [6, 7]. Также обнаружено, что микроорганизмы синтезируют метаболиты, способные подавлять рост и развитие патогенных для растений микроорганизмов [8].

Нахождение штаммов агрономически ценных микроорганизмов и создание на их основе ассоциаций для сельского хозяйства, положительно влияющих на развитие растений и подавляющих развитие фитопатогенов, вызывающих болезни растений, является весьма актуальной задачей.

Целью данного исследования было выделение и отбор новых высокоактивных штаммов азотфиксирующих, фосфатмобилизующих и целлюлолитических бактерий и создание на их основе ассоциации агрономически ценных микроорганизмов для биоконтроля корневых гнилей сахарной свеклы, стимуляции развития и повышения ее урожайности.

Новизна данного исследования заключается в том, что создана ассоциация агрономически ценных микроорганизмов, на основе новых аборигенных штаммов бактерий, адаптированных к природно-климатическим условиям Казахстана. Созданная ассоциация обладает комплексным действием: стимулирует рост и развитие растений сахарной свеклы и характеризуется высокой антифунгальной активностью по отношению к основным фитопатогенным грибам, вызывающим корневые гнили этой культуры.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили штаммы азотфиксирующих, фосфатмобилизующих и целлюлолитических бактерий, выделенные из почв Жамбылской области Казахстана в весенний период 2018 г., и ассоциация, созданная на их основе. Сбор образцов почв проводили в соответствии с методикой ГОСТа [9]. Выделение бактерий согласно методике [10]. Целлюлолитические бактерии выделяли на среде Гетчинсона с 1% Na-КМЦ (водорастворимая Na-карбоксиметилцеллюлоза), азотфиксирующие – на среде Эшби, фосфатмобилизующие микроорганизмы – на среде Муромцева.

Нитрогеназную активность бактерий определяли ацетиленовым методом [11]. Для этого бактерии выращивали на среде Эшби. Ацетилен вводили в сосуды с культурами до концентрации 10% (по объему). После инкубации культур в течение 1,5 ч в атмосфере ацетилена пробы газа отбирали шприцем по 1 мл из сосуда и определяли наличие этилена на газовом хроматографе «Agilent Technology 7890 B» (США) с пламенно-ионизационным детектором.

Определение способности бактерий к мобилизации фосфатов проводили по модифицированной методике Сэги на среде Муромцева, содержащей нерастворимый трикальцийфосфат в виде мелкодисперсного осадка, придававшего питательной среде равномерную мутность [12]. Фосфатмобилизующую активность бактерий оценивали количественно по диаметру зон «гало» без вычета диаметра лунки и выражали в мм.

Целлюлазную активность (КМЦ-азаная) бактерий определяли по диаметру зон гидролиза твердой среды с 0,1% Na-КМЦ после окрашивания раствором красителя конго-рот и соответственного пересчета, выражали в ед/мл [13].

Биомассу микроорганизмов определяли нефелометрически на спектрофотометре PD-303 («Arel», Япон) и пересчитывали по калибровочной кривой на вес абсолютно сухой биомассы (АСБ, г/л).

Для изучения ростостимулирующей способности ассоциаций бактерии выращивали на жидких элективных средах при 180 об/мин, 28°C в течение 5–7 суток до концентрации 1×10^7 кл/мл и смешивали в соотношении 1:1:1. В опытах использовали семена сахарной свеклы сорта «Айсултан». Семена перед посевом обрабатывали суспензией ассоциации в концентрации 1×10^7 кл/мл на 1 г семян в течение 2 ч при комнатной температуре. В контроле семена замачивали в водопроводной воде. Через 30 дней проводили измерение длины стебля и корней растений и сравнивали их с контрольным вариантом. Эксперименты проводились в климатической камере для выращивания растений («Mettmert HPP-750», Германия). Опыты проводили в 3-кратной повторности (12 растений на повторность).

Антифунгальные свойства ассоциации определяли методом агаровых блоков [14]. В расплавленную и остуженную до 40°C среду картофельно-декстрозный агар (КДА) вносили суспензию конидий грибов (10^8 КОЕ/мл) из расчета 1 мл на 100 мл среды и разливали в чашки Петри. Бактерии, входящие в состав ассоциации выращивали на жидких элективных средах до концентрации 10^7 кл/мл и смешивали в соотношении 1:1:1. Затем в среде КДА, предварительно засеянной культурами фитопатогенных грибов, буром (диаметр 7 мм) вырезали лунки, в которые вносили суспензию ассоциаций в количестве 0,5 мл (титр 10^7 кл/мл), и оставляли на 72 ч при температуре 28°C. Контролем служили лунки со стерильной водой. Об антифунгальной активности судили по диаметру зоны подавления роста грибов.

Биосовместимость штаммов ассоциации изучали методом перпендикулярных штрихов [15].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «STATISTICA 10.0». В таблице и рисунке представлены средние значения (M) и их стандартные отклонения ($\pm SD$) при $p < 0,5$.

Результаты исследования и их обсуждение

Выделение бактерий проводили из образцов почв (более 70 образцов), собранных в Жамбылской области Казахстана. В общей сложности было выделено 54 азотфиксирующих, 25 фосфатмобилизующих и 106 культур целлюлолитических бактерий.

Азотфиксирующие бактерии были выделены на среде Эшби. С целью выявления активных штаммов был проведен первичный скрининг культур. Критерием отбора служила величина и размеры колоний при росте на безазотистой среде. При этом исходили из того, что бактерии, способные к активному росту и накоплению биомассы на безазотистых средах, образуют колонии большого диаметра, что свидетельствует об их повышенной способности к фиксации молекулярного азота атмосферы. В результате первичного скрининга для дальнейшей работы было отобрано 10 культур азотфиксирующих бактерий. Для отбора высокоактивных штаммов изучили их нитрогеназную активность и способность к накоплению биомассы. В результате проведенной работы было отобрано два штамма Az-22 и Az-24, характеризующихся повышенным накоплением биомассы и высокой нитрогеназной активностью.

Выделение и первичный скрининг активных штаммов фосфатмобилизующих бактерий проводили на среде Муромцева с нерастворимым фосфатом, придававшего питательной среде равномерную мутность. Отбор культур проводили исходя из того, что активные штаммы образуют большие зоны просветления среды (зоны гало). Исследование способности штаммов к мобилизации фосфатов позволило отобрать два наиболее активных штамма бактерий Ф-11 и Ф-12.

Выделение целлюлолитических бактерий из почвенных образцов проводили на среде Гетчинсона. Первичный отбор активных культур проводили на агаризованной среде Гетчинсона, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии пшеничную солому. Отбор культур проводили исходя из того, что чем больше диаметр колоний, тем эффективнее культура бактерий утилизирует целлюлозу. В результате первичного скрининга было отобрано 20 бактерий. Для отбора высокоактивных штаммов бактерий были проведены опыты по изучению их целлюлазной активности. В результате исследований было отобрано два штамма целлюлолитических бактерий С-21(8) и С-82 с высокой активностью целлюлаз.

Одним из основных факторов, которые необходимо учитывать при создании ассоциации, является биосовместимость штаммов. Изучение биосовместимости штаммов бактерий показало, что штаммы Az-22, Az-24, С-21(8), С-82, Ф-11 и Ф-12 биосовместимы, то есть не подавляют рост и развитие друг друга. На основе этих штаммов была создана ассоциация агрономически ценных микроорганизмов, включающая штаммы целлюлолитических С-82, азотфиксирующих Az-24 и фосфатмобилизующих бактерий Ф-12 (в соотношении 1:1:1).

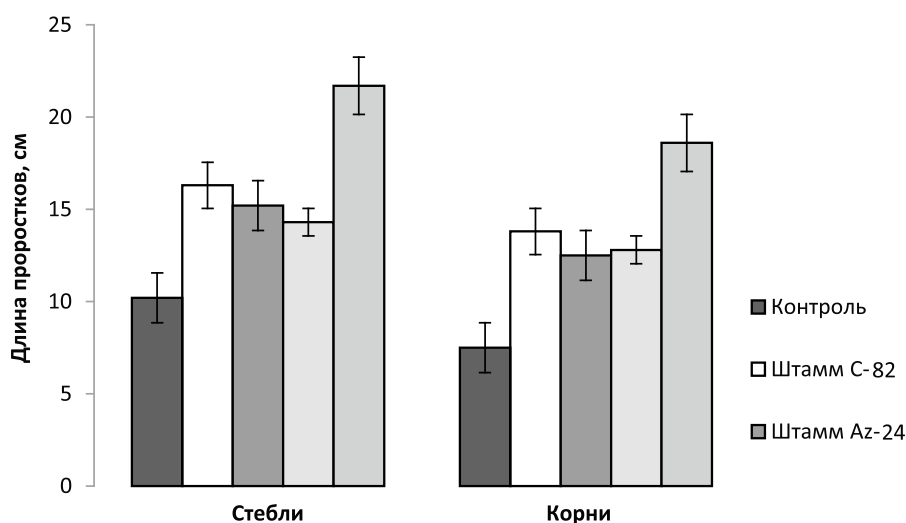
В лабораторных условиях изучили влияние отдельных штаммов бактерий и созданной ассоциации на развитие растений сахарной свеклы. Полученные данные представлены на рисунке.

Установлено, что отдельные штаммы и ассоциация обладают ростостимулирующей способностью, но ростостимуляция растений в варианте с ассоциацией была выше. Так, инокуляция семян штаммами бактерий увеличила длину стебля в 1,4–

1,5 раза, корней – в 1,6–1,8 раза по сравнению с контролем. В то время как при инокуляции семян ассоциацией длина стебля увеличилась в 2,0 раза, корней – 2,5 раза по сравнению с контролем.

Исследование антифунгальной активности штаммов и ассоциации по отношению к основным фитопатогенным грибам, вызывающим корневые гнили, показало, что не все штаммы ассоциации характеризовались антифунгальной активностью (таблица).

Установлено, что только штамм С-82 проявлял антифунгальную активность, остальные штаммы ею не обладали. Также показано, что ассоциация обладала более высокой антифунгальной активностью против фитопатогенных грибов. Так, антифунгальная активность ассоциации в отношении грибов *F. oxysporum* составляла 29,9 мм, *F. solani* – 39,7 мм и *A. alternata* – 48,5 мм, в то время как у штамма С-82 диаметр зоны подавления фитопатогенных грибов *F. oxysporum* составлял 28,3 мм, *F. solani* – 36,2 мм и *A. alternata* – 45,6 мм (таблица).



Ростостимуляция проростков сахарной свеклы при инокуляции семян отдельными штаммами и созданной ассоциацией

Антифунгальная активность штаммов и ассоциации в отношении фитопатогенных грибов, возбудителей корневых гнилей сахарной свеклы ($M \pm SEM$)

Штаммы бактерий	Диаметр зоны подавления роста грибов, мм		
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
Az-24	0	0	0
С-82	45,6 ± 0,5	36,2 ± 0,2	28,3 ± 0,1
Ф-12	0	0	0
Ассоциация	48,5 ± 0,7	39,7 ± 0,3	29,9 ± 0,3
Контроль	0	0	0

Заклучение

Таким образом, из почв Казахстана были выделены новые штаммы агрономически ценных микроорганизмов: азотфиксирующие, фосфатмобилизующие и целлюлолитические бактерии. Изучена их биологическая активность и отобраны штаммы с высокой активностью. Для создания эффективной ассоциации проведено исследование биосовместимости штаммов и подобраны штаммы с отсутствием антагонизма по отношению друг к другу. На основе этих штаммов создана ассоциация агрономически ценных микроорганизмов для сельского хозяйства. Изучение ее ростостимулирующих свойств выявило высокое положительное влияние ассоциации на рост и развитие растений сахарной свеклы. Также проведенные исследования показали, что ассоциация является перспективным агентом для биоконтроля фитопатогенных грибов, так как обладает высокой антифунгальной активностью в отношении основных фитопатогенных грибов родов *Fusarium* и *Alternaria*, вызывающих корневые гнили сахарной свеклы.

В дальнейшем практическое применение созданной ассоциации в сельском хозяйстве позволит снизить заболеваемость растений за счет биоконтроля корневых гнилей в почве и стимулировать рост и развитие растений сахарной свеклы, что приведет к повышению ее урожайности. Также, использование ассоциации будет способствовать уменьшению химической нагрузки на почвы и позволит получить экологически чистую продукцию растениеводства.

Список литературы

1. Solomon S., Quirk R.G., Shukla S.K. Green management for sustainable sugar industry. *Sugar Tech.* 2019. Vol. 21. No 2. P. 183–185. DOI: 10.1007/s12355-019-00711-2.
2. Обзор сахарной отрасли государств – членов Евразийского экономического союза за 2012–2016 гг. М.: Департамент ЕАЭС, 2017. 110 с.
3. Мауи А.А., Исмухамбетов Ж.Д. Комплексная система защиты посевов сахарной свеклы от вредителей, болез-

ней и сорняков для условий Казахстана. Алматы: Бастау, 2012. 48 с.

4. Селиванова Г.А. Болезни сахарной свеклы при интенсификации технологии выращивания культуры // *Земледелие.* 2013. № 4. С. 31–37.
5. Webb K.M., Brenner T., Jacobsen B.J., Temperature effects on the interactions of sugar beet with *Fusarium* yellows caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *betae*. *Canadian Journal of Plant Pathology.* 2015. Vol. 37. No 3. P. 353–362. DOI: 10.1080/07060661.2015.1071283.
6. Jacoby R., Peukert M., Succurro A., Koprivova A., Kopriva S. The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition – current knowledge and future directions. *Frontiers in Plant Science.* 2017. Vol. 8. P. 1617–1638. DOI: 10.3389/fpls.2017.01617.
7. Smirnova I.E., Sadanov A.K. Cellulolytic bacteria and association of effective microorganisms for biocontrol of root rot infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Agricultural Biology.* 2019. Vol. 54. No 5. P. 1041–1052. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.5.
8. Smirnova I., Sadanov A. Application of agriculturally important microorganisms for biocontrol of root rot infection of sugar beet. *Archives of Phytopathology and Plant Protection.* 2019. Vol. 52. No 7-8. P. 698–713. DOI: 10.1080/03235408.2019.1588195.
9. ГОСТ 17.4.4.02-84. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического анализа. М.: Стандаринформ, 2008. 142 с.
10. Казеев К.Ш., Колесников С.И., Акименко Ю.В., Даденко Е.В. Методы биодиагностики наземных экосистем. Ростов н/Д.: Южный федеральный университет, 2016. 355 с.
11. Nishihara A., Matsuura K., Tank M., McGlynn S.E., Thiel V., Haruta S. Nitrogenase activity in thermophilic chemolithoautotrophic bacteria in the phylum aquificae isolated under nitrogen-fixing conditions from nakabusa hot springs. *Microbes and Environments.* 2018. Vol. 33. No 4. P. 394–401. DOI: 10.1264/j sme2.ME18041.
12. Егоршина А.А., Хайруллин Р.М., Лукьянцев М.А., Курамшина З.М., Смирнова Ю.В. Фосфатмобилизующая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их влияние на степень микоризации корней пшеницы // *Журнал Сибирского федерального университета. Биология.* 2011. Т. 4. № 2. С. 172–182.
13. Зубов Д.В., Толченов А.А. Экспресс-методика контроля активности ферментного комплекса // *Вестник Саратовского государственного технического университета.* 2012. Т. 1. № 2 (64). С. 389–392.
14. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis.* 2016. Vol. 6. No 2. P. 71–79. DOI: 10.1016/j. jpha.2015.11.005.
15. Иркитова А.Н., Яценко Е.С. Оптимизация метода определения антагонистической активности пробиотических бактерий // *Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК.* 2017. № 5 (19). С. 113–117.