

СОЗДАНИЕ НОВЫХ ФОРМ ПРЕПАРАТОВ СИМБИОТИЧЕСКИХ И АССОЦИАТИВНЫХ РИЗОБАКТЕРИЙ С ПОВЫШЕННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ

Лактионов Ю.В., Кожемяков А.П., Попова Т.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии, шоссе Подбельского, 3,
Санкт-Петербург, Пушкин-8, 196608, Россия
E-mail: Laktionov@pop3.ru

Приведены результаты изучения нового носителя для микроорганизмов – вермикулита, а также влияние влажности, температуры хранения, различных наполнителей, элементов питания, стабилизаторов и других веществ на титр бактерий в препарате. Показано, что при оптимальном сочетании компонентов в препарате он способен длительное время сохранять высокий титр бактерий.

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum, Rhizobium galega, Arthrobacter mysorens, Azospirillum brasilense, биопрепарат, соя, кукуруза.*

Современное интенсивное растениеводство немислимо без использования удобрений, регуляторов роста растений, контроля численности вредителей и полезных микро- и макроорганизмов [1].

Биопрепараты – препараты, содержащие живые культуры специально отобранных полезных микроорганизмов с заданными контролируемыми свойствами. Благодаря им прибавки урожая основных сельскохозяйственных культур могут составлять от 15 до 30 %. Эффективность биопрепаратов особенно возрастает при использовании на средне- и малоплодородных почвах, где растения испытывают дефицит минерального питания [2].

Важной задачей при получении биопрепаратов является длительное сохранение их высоких потребительских качеств [3].

В настоящее время доминирующей формой носителей для симбиотических и ассоциативных ризобактерий являются твердые носители, самым распространенным – молотый торф [2]. Но наряду со многими плюсами этого носителя, у него есть и недостатки,

главным из которых является его нестандартность. Далеко не на каждом виде торфа можно изготовить качественный препарат, и в то же время нет критериев для отбора торфа требуемого качества [4].

В связи с этим проводится поиск альтернативных носителей. В качестве такого носителя привлек внимание вермикулит – природный минерал группы гидрослюд. Это лёгкий, сыпучий материал, биологически стоек, не горюч, не канцерогенен. Вермикулит хорошо поддерживает жизнеспособность ризобактерий, благодаря своему специфическому строению: при определенной влажности в нем раскрываются микрозоны, где имеется достаточное количество влаги и кислорода для микроорганизмов. Вермикулит характеризуется стабильностью свойств и может храниться долгое время без потери качества; данный тип носителя легко подвергается стерилизации и является практически стерильным, т. к. в процессе производства подвергается температурной обработке выше 1000 °С; удобен с точки зрения его применения при обработке семян.

Так как вермикулит, в отличие от торфа, – минеральное соединение, то микроорганизмы не способны использовать его в качестве питания для поддержания своей жизнедеятельности без внесения различных наполнителей, элементов питания, стабилизаторов и других веществ. Используя вермикулит в качестве носителя, необходимо подобрать те компоненты, применение которых в препарате позволило бы микроорганизмам развиваться и поддерживать свое существование длительное время без снижения титра. Следовательно, для того, чтобы микроорганизмы “комфортно” существовали на нем длительное время, необходимо создать для этого оптимальные условия.

В задачу настоящей работы входило изучение влияния температуры хранения, влажности, элементов питания и других веществ на качество микробных препаратов, приготовленных на вермикулите.

Материалы и методы. Для исследований из коллекции ВНИИСХМ были взяты следующие штаммы ризобактерий: клубеньковые бактерии сои (*Bradyrhizobium japonicum*: um.6346, um.6406, um.6456), клубеньковые бактерии козлятника (*Rhizobium galega*: um.912, um.913), ассоциативные микроорганизмы (*Arthrobacter mysorens*, um.7; *Azospirillum brasilense*, um.8; *Agrobacterium radiobacter*, um.204).

Изучали влияние различных добавок и наполнителей (в питательную среду для инокулюма, в субстрат) на изменение численности микроорганизмов в препарате и на его эффективность. В качестве источников питания использовали: глюкозу, сахарозу, препарат “Дарина” на основе сапропеля, гуматы (калиевые), мелассу в различных комбинациях и процентных соотношениях. Как стабилизатор использовали глицерин.

В лабораторных опытах исследовали влияние температуры хранения и влажности препаратов на выживаемость в них клубеньковых бактерий сои и козлятника. Для определения жизнеспособности и количественной оценки интенсивности роста (размножения) бактерий использовали метод серийных предельных разведений [5].

В условиях вегетационного и полевых опытов изучали эффективность разработанных препаратов, а также их совместимость со стимулятором роста растений “Аквამикс” [5-8]. “Аквамикс” – это комплексное микроудобрение, которое содержит такие микроэлементы как Mo, B, Co, Cu, Zn.

В схемы опытов были включены следующие варианты:

1. Препарат клубеньковых (ассоциативных) бактерий на вермикулите с влажностью 60 %.
2. Препарат (влажность 60 %) + “Аквамикс”.
3. Препарат клубеньковых (ассоциативных) бактерий на вермикулите с влажностью 70 %.
4. Препарат (влажность 70 %) + “Аквамикс”.
5. Опыты проводили с соей сортов Дон 21, Дива и кукурузой сортов Зерноградский 282 МВ, Зерноградский 330 МВ, Зерноградский 401.

Вегетационные опыты проводили на территории опытного участка ВНИИСХМ на дерново-подзолистой почве в сосудах по 5 кг. Повторность 4-кратная. ($pH_{\text{сол.}}$ 6,2-6,8; $N_{\text{общ.}}$ – 0,26 %; P – 150 мг/кг; C – 4,7 %; гумус – 1,8 %).

Полевые исследования проводили на опытном поле ВНИИЗК им. И.Г. Калиненко Зерноградского района, расположенного в южной зоне Ростовской области. Почва опытного участка – чернозём обыкновенный тяжелосуглинистый. Агрохимические показатели в слое почвы 0-20 см: $pH_{\text{сол.}}$ – 7,1; гумус – 3,3-3,5 %; P_2O_5 – 20-25 мг/кг; K_2O – 300-350 мг/кг почвы. Климат зоны умеренно континентальный: ГТК – 0,7-0,8; среднегодовое количество осадков

– 511 мм с большими колебаниями: в засушливые годы – 420 мм, во влажные – 970 мм. Площадь делянки – 100 м², повторность трехкратная.

Учитывали количество клубеньков на корнях сои и урожайность культур.

Результаты и их обсуждение. В серии опытов по выяснению влияния различных добавок на сохранность бактерий было установлено, что многие источники углеводного питания существенно улучшают размножение и выживаемость клубеньковых бактерий сои и козлятника в препаратах на основе вермикулита. Значительное повышение титра бактерий отмечено в вариантах с использованием гуматов и препарата “Дарина” (табл. 1, 2).

Таблица 1. Титр клубеньковых бактерий сои (шт. 634б) при внесении различных добавок в вермикулит

Добавки в питательную среду	Добавки в вермикулит	Титр бактерий, КОЕ·10 ⁹ /г			
		срок хранения			
		17 дней	1 месяц	2 месяца	6 месяцев
глицерин 1%	глюкоза 1%	16,5±0,2	14,0±0,2	8,2±0,2	1,1±0,2
глицерин 1%	глюкоза 1% + Дарина 1%	27,6±0,3	40,0±0,2	30,6±0,3	3,2±0,1
глицерин 1%	глюкоза 1% + глицерин 1%	27,1±0,2	12,7±0,2	8,5±0,2	4,0±0,3
глицерин 1%	глюкоза 1% + гуматы 0,5%	33,5±0,2	24,5±0,3	8,2±0,3	4,1±0,2
глицерин 1%	глюкоза 1% + гуматы 1%	8,8±0,3	17,1±0,2	15,2±0,2	3,3±0,2
глицерин 1%	глюкоза 1% + меласса 2%	1,5±0,2	15,6±0,4	3,1±0,3	1,2±0,3
глицерин 1%	меласса 1%+ Дарина 1%	15,0±0,2	16,1±0,2	13,9±0,2	2,0±0,2
глицерин 1%	меласса 2% + глицерин 1%+ Дарина 2%	3,8±0,2	6,6±0,2	5,0±0,3	1,8±0,3
глицерин 1%	меласса 0,5% + глицерин 1%+ гуматы 0,5%	34,1±0,2	26,0±0,3	7,4±0,2	6,1±0,1

Поскольку в процессе транспортировки биопрепараты

подвергаются воздействию различных температур (иногда отрицательных), проводилось изучение влияния трех температурных режимов (замораживание, 5-8 °С, 20-22 °С) на их качество. Показано, что хранение препаратов при температуре 5-8 °С (холодильник) позволяет сохранить титр клубеньковых бактерий на 1-2 порядка выше, чем хранение при более высокой температуре 20-22 °С (в комнатных условиях) (табл. 3).

Таблица 2. Титр клубеньковых бактерий козлятника (шт.912, 913) при внесении различных добавок в питательную среду и в вермикулит

Штамм бактерий	Добавки в питательную среду	Добавки в вермикулит	Титр бактерий, КОЕ·10 ⁹ /г	
			срок хранения, месяцы	
			1	2
<i>R. galega</i> шт.912	–	сахароза + гуматы 0,5% + глицерин	54,0±0,3	16,2±0,3
	Дарина 1%	сахароза + гуматы 0,5% + глицерин	96,1±0,2	18,9±0,1
	–	Сахароза	12,0±0,3	10,1±0,3
	Дарина 1%	Сахароза	18,2±0,1	8,2±0,4
<i>R. galega</i> шт.913	–	сахароза + гуматы 0,5%	38,1±0,2	13,0±0,2
	–	–	7,6±0,4	6,8±0,2
	–	сахароза + глицерин	12,0±0,2	10,1±0,2
	–	сахароза + меласса 2%	10,4±0,2	4,7±0,1
	–	сахароза + меласса 2% + глицерин	12,8±0,3	8,2±0,1
	–	сахароза + меласса 5 %	25,3±0,2	16,3±0,2

Таблица 3. Влияние температуры хранения на титр клубеньковых бактерий сои и козлятника (2 месяца хранения)

Штаммы бактерий	Титр бактерий, КОЕ·10 ⁹ /г	
	t° хранения (°С)	
	20-22	5-8
<i>B. japonicum</i> 634б	3,0±0,2	5,1±0,2
<i>B. japonicum</i> 640а	3,0±0,4	14,2±0,2
<i>B. japonicum</i> 645а	3,2±0,2	21,4±0,3
<i>R. galega</i> 913	7,5±0,3	63,0±0,2

В то же время при замораживании препаратов в течение 2 суток наблюдается полная гибель клубеньковых бактерий сои и 10-кратное снижение титра клубеньковых бактерий козлятника (табл. 4). При введении глицерина отмечено в 2,5 раза меньшее снижение количества клубеньковых бактерий козлятника. Более длительное хранение препаратов для козлятника при отрицательной температуре приводит к значительному снижению количества бактерий в препарате.

Таблица 4. Влияние отрицательных температур на титр клубеньковых бактерий козлятника в препарате

Штаммы бактерий	Титр бактерий, КОЕ·10 ⁹ /г				
	без замораживания	срок замораживания препаратов			
		2 дня		2 недели	
		без глицерина	с глицерином	без глицерина	с глицерином
<i>R. galega</i> шт.912	3±0,2·10 ⁹	2,2±0,2·10 ⁸	1,5±0,2·10 ⁹	2±0,3·10 ⁶	8±0,2·10 ⁶
<i>R. galega</i> шт.913	7±0,2·10 ⁹	7±0,2·10 ⁸	1±0,2·10 ⁹	1±0,2·10 ⁶	4,6±0,3·10 ⁶

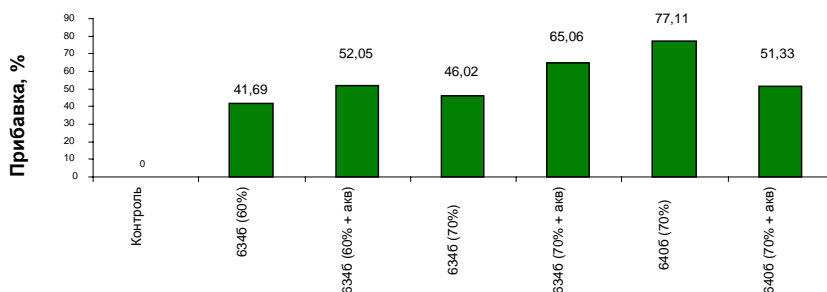
Влажность препарата имеет важное значение для сохранения в нём микроорганизмов. Для такого наполнителя как торф оптимальной считается влажность 60 %. В связи с переходом на новый тип носителя необходимо установить оптимальную для него влажность. По результатам лабораторных и полевых исследований нами было показано, что оптимальная влажность препаратов на основе вермикулита составляет 70 %, так как именно при такой влажности в нём наилучшим образом сохраняются ризобактерии. По прошествии месяца после приготовления препарата титр бактерий в препарате с влажностью 60 % был на порядок ниже, чем в препарате с влажностью 70 % (табл. 5). При более высокой влажности препарат теряет свою сыпучесть, вследствие чего доступ кислорода к бактериям затруднён, и их количество снижается.

В вегетационных опытах изучали эффективность совместного применения биопрепаратов с комплексным микроудобрением “Аквамикс”. Показано, что “Аквамикс” не может быть рекомендован к применению со всеми препаратами, поскольку он по-разному

влияет на штаммы бактерий, входящие в их состав (рис. 1, 2). Так, при совместном применении с препаратом на основе штамма *V. japonicum* 634б, он способствует увеличению урожайности сои, однако при использовании с препаратом на основе штамма *V. japonicum* 640б этого эффекта не наблюдается, урожайность сои снижается.

Таблица 5. Влияние влажности препарата на титр ризобактерий в препаратах (после 1 месяца хранения)

Штаммы бактерий	Титр бактерий, КОЕ/г	
	влажность препарата 60 %	влажность препарата 70 %
<i>Arthrobacter mysorens</i> , шт. 7	$5,6 \pm 0,2 \cdot 10^9$	$4,1 \pm 0,3 \cdot 10^{10}$
<i>Azospirillum brasilense</i> , шт. 8	$1,6 \pm 0,2 \cdot 10^9$	$2 \pm 0,2 \cdot 10^{10}$
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> , шт. 634б	$1,7 \pm 0,3 \cdot 10^9$	$1 \pm 0,3 \cdot 10^{10}$
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> , шт. 640б	$2,3 \pm 0,2 \cdot 10^9$	$1,5 \pm 0,2 \cdot 10^{10}$

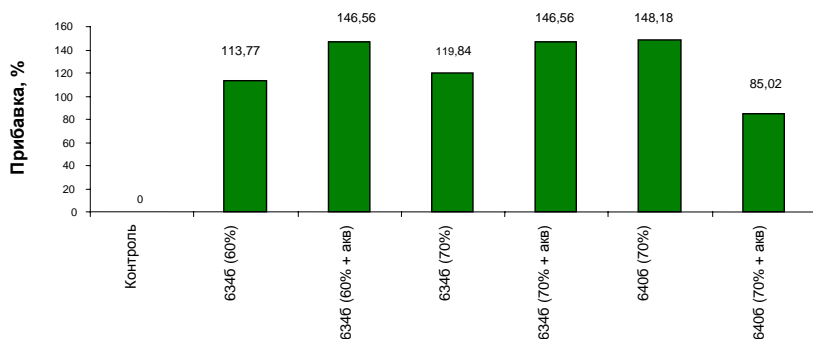


НСР = 5,4

Рис. 1. Влияние влажности препарата и стимулятора роста “Аквამикс” на урожайность сои сорта Дон 21

“Аквამикс” не всегда оказывает положительное действие на урожайность сои, хотя увеличивает количество клубеньков на растениях на 30-50 % (рис. 3).

Нами установлено, что препарат клубеньковых бактерий сои (шт. 634б) с влажностью 70 % способствует образованию большего количества клубеньков, чем аналогичный препарат с влажностью 60 % (рис. 3).



НСР=3,8

Рис. 2. Влияние влажности препарата и стимулятора роста “Аквaмикс” на урожайность сои сорта Дива

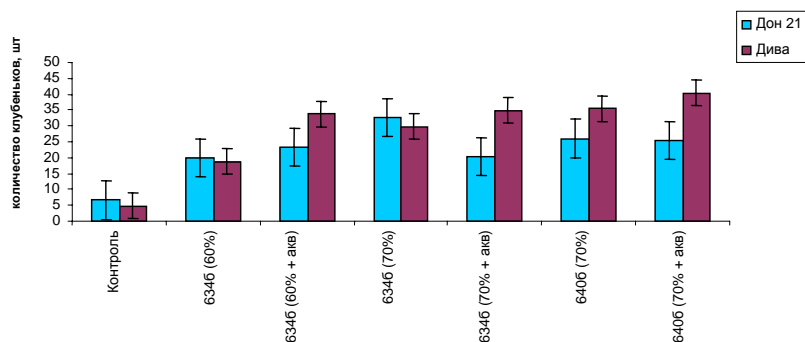
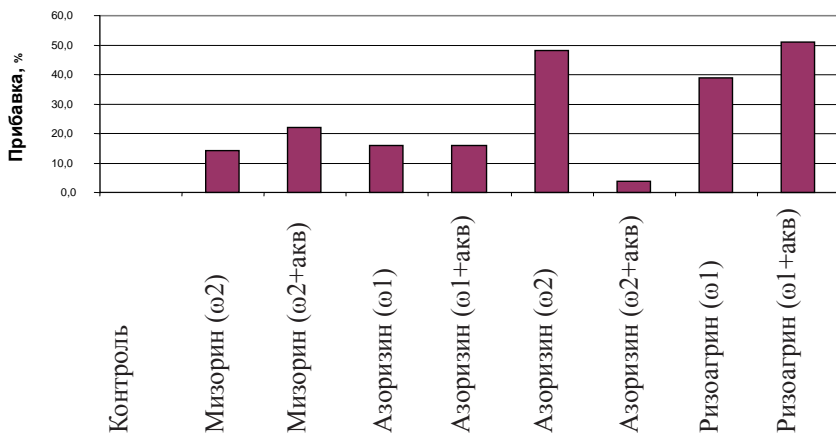


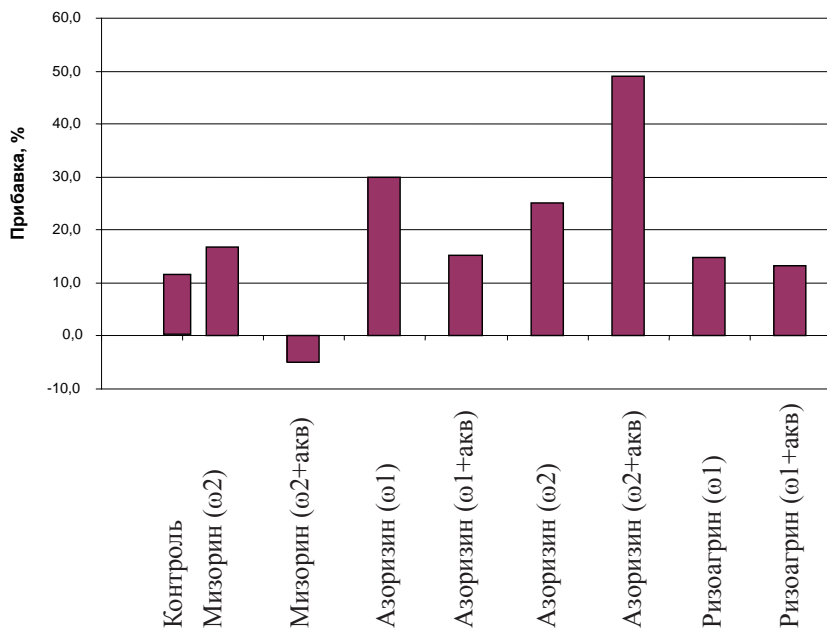
Рис. 3. Влияние влажности препарата и стимулятора роста “Аквaмикс” на образование клубеньков на растениях сои

На кукурузе также не выявлено чёткой закономерности влияния “Аквaмикса” на рост и развитие растений. Так, на кукурузе сорта Зерноградский 330 МВ наилучшее действие отмечено при использовании Азоризина (*A. mysorens* шт.8) влажностью 70 % (рис. 4). Прибавка урожайности в этом варианте составляла 48 %, при совместной обработке с “Аквaмиксом” – 4 %. Следовательно, применение “Аквaмикса” снижало эффективность биопрепарата в 10 раз. В то же время обработка семян кукурузы сорта Зерноградский 282 МВ биопрепаратом обеспечила прибавку урожая, составляющую 24 %, при совместной же обработке с “Аквaмиксом” – 49 % относительно контроля (рис. 5).



НСР = 7,1

Рис. 4. Влияние влажности препарата и стимулятора роста "Аквამикс" на урожайность кукурузы сорта *Зерноградский 330 МВ*



НСР = 8,24

Рис. 5. Влияние влажности препарата и стимулятора роста "Аквамикс" на урожайность кукурузы сорта *Зерноградский 282 МВ*

То есть, использование биопрепаратов совместно со стимулятором роста “Аквამикс” не всегда способствует повышению урожайности сельскохозяйственных культур. Этот факт необходимо учитывать при разработке новых микробных препаратов и технологии их применения.

Таким образом, введение в среду препарата “Дарина” и гуматов приводит к значительному повышению титра клубеньковых бактерий в препарате. Глицерин, введённый в препарат в концентрации 1-2 %, не способствует возрастанию титра, но действует как стабилизатор титра бактерий.

Показано, что хранение препаратов при температуре 5-8 °С (холодильник) позволяет сохранить титр клубеньковых бактерий в 10-100 раз более высокий, чем при хранении при 20-22 °С. Замораживание препаратов под сою на 2 суток полностью убивает клетки бактерий сои и в 10 раз снижает титр клубеньковых бактерий козлятника. При введении глицерина титр бактерий козлятника снижается в 2,5 раза меньше.

Для препаратов клубеньковых бактерий на основе вермикулита оптимальной является влажность 70 %. При этой влажности микроорганизмы в препарате максимально быстро развиваются и титр препарата поддерживается на высоком уровне более длительное время по сравнению с вариантами препаратов с другой влажностью.

Стимулятор роста растений “Аквამикс” оказывает неодинаковое действие на разные штаммы азотфиксирующих бактерий и на разные культуры растений, поэтому не может быть рекомендован к применению во всех случаях.

1. Дятлова К. Д. Микробные препараты в растениеводстве / К. Д. Дятлова // Соросовский образовательный журнал. — 2001. — Т. 7, № 5. — С. 17–22.

2. Завалин А. А. Биопрепараты, удобрения и урожай / А. А. Завалин. — М. : Изд-во ВНИИА, 2005. — 302 с.

3. Завалин А. А. Оценка эффективности микробных препаратов в земледелии / А. А. Завалин. — М. : РАСХН, 2000. — 82 с.

4. Хотянович А. В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе (методические рекомендации) / А. В. Хотянович. — Л. : Б. и., 1991. — 60 с.

5. Фробишер М. Основы микробиологии / М. Фробишер ; пер. с

англ. В. А. Шорина. — М. : Мир, 1965. — 678 с.

6. Ашмарин И. П. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов / И. П. Ашмарин, Н. Н. Васильев, В. А. Амбросов. — Л. : Изд-во МГУ, 1971. — С. 75.

7. Доспехов В. А. Методика полевого опыта / В. А. Доспехов. — М. : Агропромиздат, 1985. — 351 с.

8. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Учебное пособие ; под ред. Д. Г. Звягинцева. — М. : Изд-во МГУ, 1991. — 304 с.

СТВОРЕННЯ НОВИХ ФОРМ ПРЕПАРАТІВ СИМБІОТИЧНИХ ТА АСОЦІАТИВНИХ РИЗОБАКТЕРІЙ З ПІДВИЩЕНОЮ ЕФЕКТИВНІСТЮ

Лактіонов Ю.В., Кожемяков А.П., Попова Т.А.

Всеросійський науково-дослідний інститут сільськогосподарської мікробиології, Санкт-Петербург, Пушкін, Росія

Надані результати вивчення нового носія мікроорганізмів на основі вермікуліту, а також впливу вологості, температури зберігання, різних наповнювачів, елементів живлення, стабілізаторів та інших речовин на титр бактерій у препараті. Показано, що за оптимального поєднання компонентів препарат здатен тривалий час зберігати високий титр бактерій.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum, Rhizobium galega, Arthrobacter mysorens, Azospirillum brasilense, бульбочкові бактерії, біопрепарат, соя, кукурудза.*

CREATION OF NEW DRUG FORMS OF SYMBIOTIC AND ASSOCIATIVE RHIZOBACTERIA WITH AN IMPROVED EFFICIENCY

Laktionov Y.V., Kozhemyakov A.P., Popova T.A.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology,
St.-Petersburg, Pushkin, Russia

Results of study of the new carrier of microorganisms on the basis of vermiculit, and also influence of humidity, temperatures of storage, various fillers, nutrient elements, stabilizers and other substances on a titer of bacteria in a drug are represented. It is shown that it is possible to keep a high titer of bacteria in a preparation for a long time at an optimum combination of components in the drug.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum, Rhizobium galega, Arthrobacter mysorens, Azospirillum brasilense, nodule bacteria, bacterial drugs, soya, corn.*