

УДК 579.647

БАКТЕРИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УРОЖАЙНОСТИ СОИ

И.Э. Смирнова, А.К. Саданов

Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

Введение. Одной из проблем сельскохозяйственного сектора является дефицит белка в питании людей и недостаточность кормовой базы для развития животноводства. Возможным решением этих проблем является увеличение производства высокобелковых зернобобовых культур и, прежде всего, сои (*Glycine max* (L.) Merr.) [1]. В мировом масштабе соя по важности сопоставима с пшеницей, рисом и кукурузой. Высокое содержание в зерне полноценного по аминокислотному составу белка (до 45–48 %) и высококачественного масла (до 25 %) определяют её широкое применение [2].

Для повышения урожайности сои применяют минеральные азотные и фосфорные удобрения. Применение высоких доз этих удобрений позволяет добиться высоких урожаев, но при этом наносит существенный урон здоровью почвы. Одним из основных элементов питания растений является азот. Недостаток азота вызывает существенную задержку роста и развития растений, замедляет их цветение, завязывание бобов и вызывает общее ослабление иммунитета растений [3]. Для улучшения азотного питания сои применяют химические и биологические удобрения, но упор делается на применение препаратов на основе клубеньковых бактерий. В Казахстане также используют препараты под культуру сои на основе клубеньковых бактерий, но в основном, импортного происхождения, отечественных препаратов нет [4]. Однако применение импортных препаратов часто оказывается малоэффективным, что связано с неприспособленностью бактерий к почвенно-климатическим условиям Казахстана, плохой приживаемостью бактерий на корнях сои и антагонистическими взаимоотношениями с почвенной микрофлорой [5]. Другим не менее важным питательным элементом для сельскохозяйственных культур является фосфор, он ускоряет рост, развитие растений, процесс их созревания, увеличивает холодостойкость и устойчивость культур к вредителям и болезням [6]. Однако чрезмерное и систематическое использование фосфорных удобрений приводит к загрязнению воды, почвы и другим негативным последствиям [7]. Альтернативным путем повышения доступности фосфатов почвы является применение фосфатмобилизирующих микроорганизмов. Эти микроорганизмы способствуют мобилизации нерастворимых минеральных фосфатов и повышению их биодоступности растениями как из почвы, так и из минеральных фосфорных удобрений [8]. В результате их применения до 20–30 % труднодоступных фосфатов за вегетационный период превращаются в доступные растениям формы [9]. Целью данного исследования было выделение и получение высокоактивных штаммов клубеньковых и фосфатмобилизирующих бактерий, создание их ассоциаций для повышения урожайности сои. Новизна данного исследования заключается в том, что для повышения урожайности сои будут одновременно применяться биосовместимые штаммы разных групп почвенных бактерий. Использование таких бактерий в сельскохозяйственном производстве предлагает наиболее выгодное и экологически безопасное увеличение продуктивности сои без дополнительного внесения минеральных удобрений.

Материалы и методы. Выделение фосфатмобилизирующих бактерий проводили из почв, собранных в ризосфере сои в Алматинской области Казахстана. Почвы отбирали в соответствии с ГОСТ с соблюдением правил асептики и помещали в стерильную тару. [10]. Фосфатмобилизирующие бактерии выделяли на среде NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) [11]. Для выделения бактерий 15 г. почвы разводили 90 мл дистиллированной стерильной воды и перемешивали на шейкере при 180 об/мин в течение 2 часов. Посев микроорганизмов проводили из разведений в чашки Петри с агаризованной средой, затем чашки помещали в термостат при 28° С и выдерживали до появления четких прозрачных зон в среде (зон «гало») вокруг колоний бактерий (2–3 суток). Выделение клубеньковых бактерий проводили из клубеньков на корнях сои. От корня пинцетом были отделены крупные клубеньки, их помещали в 70 % раствор этанола на 30 секунд, затем обрабатывали 0,1 % HgCl_2 2 мин. После этого клубеньки многократно промывали стерильной водой, переносили в чашку Петри и скальпелем разрезали на части. Содержимое клубенька размазывали шпателем по поверхности агаризованной среды Мазе [12]. На среде Мазе клубеньковые бактерии образовывали бесцветные или молочно-белые слизистые колонии,

Биосовместимость фосфатмобилизирующих и клубеньковых бактерий изучали методом перпендикулярных штрихов [13]. Клубеньковые бактерии высевали штрихом по центру чашки Петри на агаризованную среду Мазе, фосфатмобилизирующие бактерии высевали перпендикулярно к штриху клубеньковых бактерий. Через 3–5 дней проводили изучение наличия или отсутствия зон задержки роста фосфатмобилизирующих бактерий от центрального штриха. Штаммы бактерий, не обладающие антагонизмом, будут расти в непосредственной близости от центрального штриха.

Для изучения способности клубеньковых бактерий образовывать клубеньки (нодуляция), бактерии выращивали в жидкой среде Мазе на шейкере при скорости 180 об/мин и температуре 28° С в течение 5 суток. Семена сои перед посевом инокулировали суспензией бактерий с титром клеток 10^8 кл/мл, в течение двух часов при температуре 23° С. Затем семена высевали в вегетационные сосуды. В качестве субстрата для роста растений использовали стерильный вермикулит, для питания проростков применяли жидкую среду Кноппа. Контролем служили семена без инокуляции бактериями. Подсчет количества и массы клубеньков проводили через 45 дней выращивания.

Фосфатмобилизирующую активность бактерий изучали по методике Сеги [14]. В агаризованной среде NBRIP, содержащей нерастворимый трикальцийфосфат в виде тонкого осадка, придающего питательной среде однородную мутность, пробивали стерильным буром лунки диаметром 7 мм и помещали 0,5 мл бактериальной суспензии с концентрацией 10^8 кл/мл. В качестве контроля в лунки помещали стерильную среду NBRIP. Чашки инкубировали при 28 °С в течение 3 суток до образования прозрачных зон (гало) вокруг лунок. Фосфатмобилизирующую активность бактерий оценивали по диаметру зон гало в мм.

Нитрогеназную активность клубеньковые бактерии определяли ацетиленовым методом [15]. Для этого бактерии выращивали на среде Мазе в условиях аэрации до концентрации 10^8 кл/мл. Суспензию бактерий помещали в сосуды на 10 мл, ацетилен вводили 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.

Для изучения влияния бактерий на всхожесть семян и развитие растений сои фосфатмобилизирующие и клубеньковые бактерии выращивали отдельно. Затем суспензии бактерий смешивали в соотношении 1:1. Семена перед посевом инокулировали ассоциацией бактерий с титром 10^8 клеток/мл в течение двух часов при 23 °С. Обработанные семена высевали в вегетационные сосуды объемом 500 мл, по 15 растений на сосуд. Контролем служили семена без обработки. Всхожесть семян определяли подсчетом количества проросших семян в вариантах и контроле. Для оценки ростостимулирующей активности измеряли длину стебля, корней, считали число листьев на одно растение и сравнивали их с показателями в контроле.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «STATISTICA 10.0» [16].

Результаты и обсуждение. Из почв Алматинской области Казахстана, собранных в ризосфере сои, были выделены фосфатмобилизирующие бактерии. Установлено, что численность бактерий в ризосфере сои была низкой и составляла 5–7 % от общей численности бактериальной микрофлоры. Всего было выделено 32 чистые культуры фосфатмобилизирующих бактерий. Установлено, что бактерий различались по основным культурально-морфологическим свойствам. Колонии, в основном, были округлые с ровным краем от 0,9 до 2,5 мм в диаметре, кремового и бледно-желтого цвета. Клетки бактерий были палочковидной формы, спорообразующими и неспорообразующими. Некоторые бактерии с возрастом приобретали кокковидную форму. Бактерии были грамположительными и грамотрицательными, и характеризовались подвижностью клеток. Исследование физиолого-биохимических признаков бактерий показало, что культуры были аэробами или факультативными анаэробами, каталазоположительными. Показано, что бактерии различались по способности утилизировать соединения углерода, образовывать индол, сероводород и разжижать желатину.

Идентификация бактерий молекулярно-генетическими методами показала, что были они, в основном, относятся к родам *Bacillus* и *Pseudomonas*.

Для оценки способности бактерий мобилизовать фосфаты, бактерии выращивали в жидкой среде NBRIP в течение 5 суток. Начальный титр бактерий составлял 10^5 КОЕ/мл. Через трое и пять суток определяли активность мобилизации фосфатов. В качестве контроля использовали среду того же состава. В таблице 1 представлены данные по изучению фосфатмобилизирующей активности шести штаммов, показавших наиболее высокие результаты.

Таблица 1 – Рост и активность мобилизации фосфатов штаммами бактерий

Штаммы бактерий	Длительность культивирования, сут.					
	3			5		
	КОЕ/мл	pH	Диаметр зоны гало, мм	КОЕ/мл	pH	Диаметр зоны гало, мм
Контроль	-	6,8	0	-	6,8	0
<i>Bacillus sp.</i> FL-2	$3,9 \times 10^6$	5,1	14,2	$7,8 \times 10^8$	4,3	17,8
<i>Bacillus sp.</i> FU-3	$3,5 \times 10^7$	4,9	13,9	$7,8 \times 10^8$	4,4	18,2
<i>Pseudomonas sp.</i> FT-4	$4,4 \times 10^7$	4,7	14,8	$7,6 \times 10^8$	4,2	18,3
<i>Pseudomonas sp.</i> FM-9	$4,0 \times 10^7$	4,5	12,9	$6,4 \times 10^8$	4,6	16,2
<i>Bacillus sp.</i> F-11	$4,1 \times 10^6$	4,6	11,7	$6,9 \times 10^8$	4,5	15,8
<i>Pseudomonas sp.</i> F-30	$3,3 \times 10^6$	4, 7	12,9	$6,3 \times 10^8$	4,4	16,1
Примечание: $p < 0,05$						

Данные таблицы 1 показывают, что бактерии обладали высокой способностью к мобилизации фосфатов. Из шести штаммов три штамма характеризовались средней активностью мобилизации фосфатов (15,8–16,2 мм) и три штамма FL-2, FU-3, FT-4 – высокой. Диаметр зон растворения фосфатов этими штаммами составлял 17,8–18,3 мм. Максимальную активность фосфатмобилизации отмечали у штамма FT-4 (18,3 мм). Установлено, что активность у штамма FU-3 была практически на уровне штамма FT-4.

Из клубеньков на корнях сои были выделены клубеньковые бактерии. Для выделения были собраны здоровые растения сои с хорошо развитой коневой системой. Был проведен мониторинг и выбраны растения с большим числом клубеньков на корнях. В результате проведенной работы из клубеньков было выделено 26 изолятов бактерий. Идентификация бактерий молекулярно-генетическими методами показала, что они относятся к родам *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*, к видам *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium cajanii*, *Bradyrhizobium liaoningense* и *Rhizobium lupini*.

Далее провели изучение нитрогеназной активности и нодуляции штаммов бактерий. Семена перед посевом обрабатывали суспензией клубеньковых бактерий как описано в разделе «Материалы и методы». В качестве контроля семена замачивали в воде. В таблице 2 приведены данные семи наиболее перспективных штаммов клубеньковых бактерий.

Таблица 2 – Активность нитрогеназы и образование клубеньков штаммами бактерий

Штаммы бактерий	Нитрогеназная активность, мкмоль C_2H_4 /мл/ч	Количество клубеньков на растение, шт.	Сухой вес клубеньков, мг/растение
Контроль	-	0	0
<i>B. liaoningense</i> RMA-1/27	3,87	16,8	128,3
<i>Rh. lupini</i> RH-2/19	2,32	14,6	130,2
<i>B. japonicum</i> RH-3/42	5,25	21,1	142,2
<i>R. lupini</i> RH-4/39	3,65	18,6	137,5
<i>B. japonicum</i> RH-6/47	6,31	27,2	153,2
<i>B. japonicum</i> RH-7/54	6,34	28,4	158,5
<i>B. japonicum</i> RH-8/21	7,84	32,3	198,4
Примечание: $p < 0,05$			

Результаты, приведенные в таблице 2 показывают, что штаммы бактерий активно фиксируют азот атмосферы и образуют клубеньки на корнях сои. Три штамма бактерий обладали средней активностью азотфиксации и нодуляции, один штамм выше средней и три штамма *B. japonicum* RH-6/47, *B. japonicum* RH-7/54 и *B. japonicum* RH-8/21 высокой способностью к нодуляции и фиксации азота. Максимальную активность отмечали у штамма RH-8/21.

Поскольку планируется создание совместное применение бактерий провели изучение биосовместимости штаммов фосфатмобилизирующих и клубеньковых бактерий. Установлено, что штаммы бактерий биосовместимы и не обладали антагонизмом по отношению к друг к другу.

На основе полученных данных были созданы ассоциации бактерий, в которые были включены наиболее активные и перспективные штаммы фосфатмобилизующих и клубеньковых бактерий. С созданными ассоциациями были поставлены модельные опыты по изучению их влияния на рост и развитие сои и образование клубеньков на ее корнях. Было показано, что все исследуемые ассоциации повышали всхожесть семян, увеличивали длину стебля и корня и число клубеньков на корнях сои. На рисунке 2 приведены данные влияния трех наиболее эффективных ассоциаций (Ассоциации 2, 5 и 17) на рост сои и нодуляцию корней.

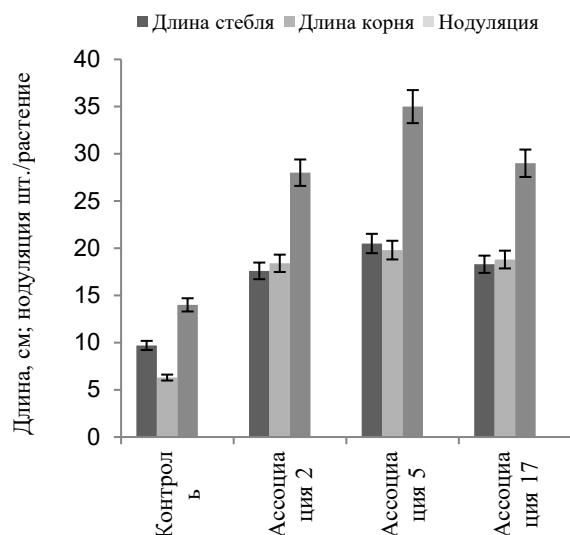


Рисунок – Влияние ассоциаций на длину стеблей, корней и образование клубеньков на корнях сои

На рисунке 2 видно, что ассоциации обладают высокой ростостимулирующей активностью. Так, инокуляция семян ассоциациями увеличивала длину стебля сои в среднем в 1,8–2,0 раза, корня – в 2,9–3,1 раза, количество клубеньков на одно растение возросло в 2,0–2,5 раза по сравнению с контролем (рисунок). Все это свидетельствует о высокой перспективности применения этих групп бактерий для выращивания сои.

Закключение. Клубеньковые и фосфатмобилизующие бактерии играют важную роль в питании растений. Однако их совместное влияние на рост, развитие и продуктивность сои изучено недостаточно. В нашем исследовании проведено выделение клубеньковых и фосфатмобилизующих бактерий из ризосферы сои и клубеньков на ее корнях. В общей сложности было выделено 32 чистые культуры фосфатмобилизующих и 26

культур клубеньковых бактерий. Проведено изучение основных культурально-морфологических признаков штаммов бактерий и установлено их таксономическое положение молекулярно-генетическими методами. Показано, что фосфатмобилизующие бактерии в основном принадлежат к родам *Bacillus* и *Pseudomonas*, а клубеньковые – к родам *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*, к видам *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium cajanii*, *Bradyrhizobium liaoningense* и *Rhizobium lupini*. Изучение способности бактерий к мобилизации фосфатов, исследование нитрогеназной активности и способности к нодуляции, позволило отобрать высокоактивные штаммы клубеньковых и фосфатмобилизующих бактерий. Проведено изучение биосовместимости отобранных штаммов. Установлено, что штаммы бактерий биосовместимы. На основе наиболее перспективных штаммов созданы три ассоциации бактерий. Показано, что ассоциации обладают высокой ростостимулирующей активностью, положительно влияют на формирование растений и увеличивают число клубеньков на корнях сои.

Результаты исследований указывают на высокую перспективность совместного использования клубеньковых и фосфатмобилизующих бактерий при возделывании сои. Под влиянием ассоциаций улучшается азотное и фосфорное питание растений сои. Полученные результаты позволяют предложить новые подходы к повышению продуктивности сои или других зернобобовых растений. Высокая ростостимулирующая активность, улучшение азотного и фосфорного питания растений, свидетельствуют о возможности совместного использования этих групп бактерий для повышения урожайности сои.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант AP09259080).

Литература

- Gaweda D., Nowak A., Haliniarz M. Yield and economic effectiveness of soybean grown under different cropping systems. *International Journal of Plant Production*. 2020. Vol. 14. P. 475–485. <https://doi.org/10.1007/s42106-020-00098-1>.
- Wijewardana C., Reddy K.R., Bellaloui N. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress. *Food Chemistry*. 2019. Vol. 278. P. 92–100. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.035.
- Ерматова Д.Е., Рахимова Х.М., Ибрагимова С.Ю. Рост и развитие соевых бобов при комбинированном внесении азотных удобрений с инокуляцией. *Молодой ученый*. 2018. Т. 17(203). С. 148–150.
- Кадырбекова Л.К. Биопрепараты в сельском хозяйстве. Аграрник Казахстана. <http://abkaz.kz/biopreparaty-v-selskom-hozyajstve>. (опубл. 10.06.2021).
- Pannecouque J., Goormachtigh S., Ceusters J., Debode J. Temperature as a key factor for successful inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* spp. under cool growing conditions in Belgium. *Journal of Agricultural Science*. 2018. Vol. 156. P. 493–503. <https://doi.org/10.1017/S0021859618000515>.
- Wiel C.C.M., Linden C.G., Scholten O.E. Improving phosphorus use efficiency in agriculture: opportunities for breeding. *Euphytica*. 2016. Vol. 207. P. 1–22. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1572-3>.
- Ali W., Nadeem M., Ashiq W. The effects of organic and inorganic phosphorus amendments on the biochemical attributes and active microbial population of agriculture podzols following silage corn cultivation in boreal climate. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9. ID 17297. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53906-8>.
- Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus*. 2013. Vol. 2. P. 587–591. doi: 10.1186/2193-1801-2-587.
- Alori E.T., Glick B.R., Babalola O.O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers Microbiology*. 2017. Vol. 2(8). P.971–978. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>.
- ГОСТ 17.4.4.02–2017. Охрана Природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. М.: Стандартинформ, 2017. 12 с.
- Mohamed A.E., Nessim M.G., Abou-el-Seoud I.I. Isolation and selection of highly effective phosphate solubilizing bacterial strains to promote wheat growth in Egyptian calcareous soils. *Bulletin of the National Research Centre*. 2019. Vol. 43. P. 203. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0212-9>.
- Stiles W. Trace Elements in Plants. New York: Cambridge University Press, 2013, 249 p. doi:10.1017/cbo9781316530412.
- Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология: теория и практика. М.: Юрайт, 2019. 315 с.
- Сегі Ю. Методы почвенной микробиологии. М.: Колос, 1983. 162 с.
- Das S., De T.K. Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay. *Methods X*. 2018. Vol. 5. P. 909–914. doi: 10.1016/j.mex.2017.11.010.
- Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. М.: Stat Soft, 2013. 268 с.

УДК 664

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЙОГУРТНОГО ПРОДУКТА С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ**Е.А. Пожидаева, Л.В. Голубева, Я.А. Дымовских, Е.С. Попов***Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия*

Экзополисахаридам, синтезируемым пробиотическими микроорганизмами в процессе ферментации молочных или безмолочных систем, отводится важная физиологическая и технологическая роль. Данные биообъекты могут выступать не только в качестве эффективного альтернативного заменителя пищевых добавок, улучшающего потребительские свойства продуктов, но и выступить в роли фактора, расширяющего спектр их функциональных свойств, например, повышения адгезионной активности лакто- и бифидобактерий на слизистых поверхностях желудочно-кишечного тракта [1, 2]. Имеются данные об антиканцерогенных, противовирусных, пребиотических, иммуномодулирующих и гипохолестеринемических свойствах экзополисахаридов [3, 4]. В результате синтеза микробных экзополисахаридов происходит их накопление в ферментируемой системе одновременно с накоплением кислоты, что сопровождается дополнительным связыванием влаги.

Исследуемые объекты – обезжиренные ферментированные пробиотические молочные продукты, содержащие лиофилизированные бактериальные заквасочные культуры прямого внесения YF-L812, YO-PROX 501, YO-PROX 753, YO-PROX 777. В состав заквасочных культур входили определенные штаммы микроорганизмов: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Перед внесением заквасочных культур обезжиренное молоко подвергалось пастеризации при 85⁰ С в течении 3–5 с и охлаждению до 38–40⁰ С. В подготовленную молочную среду вводили заквасочные культуры с последующей ферментацией в течении 4,5–5 часов до достижения в системе pH=4,6–4,7 и охлаждением до 4–6⁰ С.