

УДК 579.6:606:63

Л. Е. КАРТЫЖОВА, И. В. СЕМЕНОВА, Н. В. КОРОЛЕНКО,  
З. М. АЛЕЩЕНКОВА, Л. В. РОМАНОВА

## ЭФФЕКТИВНЫЙ ШТАММ МЕДЛЕННОРАСТУЩИХ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* 84KL – ОСНОВА БИОУДОБРЕНИЯ СОЯРИЗ

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: Liliya\_Kartyzhova@mail.ru

(Поступила в редакцию 14.10.2013)

**Введение.** Актуальность белковой проблемы для кормопроизводства Беларуси требует введения в сельскохозяйственное производство республики нетрадиционных бобовых культур, таких как соя (*Glycine max*). Известно, что соевый белок по питательной ценности приближается к белкам животного происхождения. Разнообразный химический состав семян сои позволяет использовать их для пищевых, кормовых и технических целей.

Для продуктивного возделывания сои в Беларуси важным и необходимым приемом агротехники является инокуляция семян специфичными клубеньковыми бактериями *B. japonicum*. В связи с их отсутствием в почвах республики требуется выделение и отбор симбиотически активных штаммов *B. japonicum* из клубеньков сои, возделываемой в почвенно-климатических условиях Беларуси, и разработка на их основе энергосберегающей технологии получения биоудобрения.

Цель исследования – разработка технологии получения биоудобрения СояРиз для обработки семян и эффективного возделывания сои в Беларуси.

**Объекты и методы исследования.** *Микробиологические:* штамм медленнорастущих клубеньковых бактерий *B. japonicum* 84KL, выделенный из клубеньков *Glycine max*, возделываемой на опытном поле Института генетики и цитологии НАН Беларуси, и отобранный как наиболее эффективный, обладающий ростстимулирующей и азотфиксирующей активностью, вступающий в эффективный симбиоз с возделываемыми в Беларуси сортами сои. *Почвенные:* дерново-подзолистая супесчаная, подстилаемая с глубины 30–50 см песком, почва опытного поля «Экспериментальная база им. Суворова» Узденского района РУП «Институт почвоведения и агрохимии». Агрохимические показатели пахотного горизонта исследуемой почвы: содержание гумуса 2,0–2,2 %, подвижных форм фосфора (0,2 н HCl) 180–200 мг/1 кг почвы, обменного калия (0,2 н HCl) 150–200 мг/1 кг почвы, pH<sub>(KCl)</sub> 5,8–6,0. *Растения:* соя сорта «Полесская-201».

Глубинное культивирование медленнорастущих клубеньковых бактерий *B. japonicum* проводили на лабораторной качалке (180–200 об/мин) в колбах Эрленмейера, объемом 250 мл со 100 мл жидкой питательной среды.

Состав питательных сред, г/л: *маннитно-люпиновая* – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,5; MgSO<sub>4</sub> – 0,2; NaCl – 0,2; CaSO<sub>4</sub> – 0,1; маннит – 10,0; аммоний молибденово-кислый – 0,05 (следы); люпиновый экстракт – 100 мл (5 г семян люпина с проростками стерилизуют в 100 мл воды в автоклаве при ¾ в течение 20 мин) [1]; *меласно-люпиновая* – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,5; MgSO<sub>4</sub> – 0,2; NaCl – 0,2; CaSO<sub>4</sub> – 0,1; аммоний молибденово-кислый – 0,05 (следы); меласса – 20,0; люпиновый экстракт – 100 мл (5 г семян люпина с проростками стерилизуют в 100 мл воды в автоклаве при ¾ в течение 20 мин); *меласно-гороховая* – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,5; MgSO<sub>4</sub> – 0,2; NaCl – 0,2; CaSO<sub>4</sub> – 0,1; аммоний молибденово-кислый – 0,05 (следы); меласса – 20,0 г; гороховый экстракт – 100 мл (5 г семян гороха с оболочкой стерилизуют в 100 мл воды в автоклаве при ¾ в течение 20 мин); *меласно-кукурузная* – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,5; MgSO<sub>4</sub> – 0,2; NaCl – 0,2; CaSO<sub>4</sub> – 0,1; аммоний молибденово-кислый – 0,05 (следы); меласса – 20,0;

кукурузный экстракт – 6,0; меласно-дрожжевая –  $K_2HPO_4$  – 0,5;  $MgSO_4$  – 0,2; NaCl – 0,2;  $CaSO_4$  – 0,1; аммоний молибденово-кислый – 0,05 (следы); меласса – 20,0; дрожжевой экстракт – 2,0.

Отбор оптимальной питательной среды проводили по следующим показателям: максимальная численность клеток штамма *V. japonicum* 84KL за минимальный период роста в процессе глубинного культивирования; симбиотические и биометрические показатели сои в условиях светокультуры при инокуляции семян клубеньковыми бактериями *V. japonicum*. Отработку условий и параметров глубинного культивирования штамма *V. japonicum* 84 KL и разработку лабораторной технологии получения биоудобрения проводили на лабораторном ферментере АНКУМ, объемом 10,0 л. Для засева ферментера использовали 5–7-суточный посевной материал в количестве 10 и 20 % от объема питательной среды. Количество клеток штамма *V. japonicum* 84KL в инокуляте и биоудобрении СояРиз определяли посевом последовательных разведений на агаризованную маннитно-люпиновую среду. Эффект инокуляции семян сои устанавливали в условиях светокультуры: проростки стерильных семян инокулировали культуральной жидкостью клубеньковых бактерий и приготовленной из биоудобрения суспензией. В полевых условиях инокуляцию семян сои проводили рабочим раствором биоудобрения. Эффективность инокуляции семян сои культуральной жидкостью и биоудобрением устанавливали по биометрическим (высота, вес растений) и симбиотическим (вирулентность, нодулирующая способность, азотфиксирующая активность) показателям, качественным и количественным урожайным данным (сырой белок, вес 1000 зерен, урожай зерна с 1 га) [2–4].

**Результаты и их обсуждение.** Разработка технологии получения биоудобрения СояРиз осуществлялась с использованием выделенного симбиотически активного штамма медленнорастущих клубеньковых бактерий *V. japonicum* 84KL. Симбиотические показатели *V. japonicum* 84KL, полученные в условиях светокультуры в симбиозе с соей сорта Ясельда, превышали показатели штамма-эталона *V. japonicum* 604К : количество сформировавшихся клубеньков составило 24 шт/1 раст., что на 26 % больше, чем у штамма-эталона, ростстимулирующий эффект – 45 %, а фиксация азота атмосферы увеличилась в 8,5 раз и составила в условиях светокультуры 1,7 мкг N/1 раст. за 30 мин, в микровегетационном опыте – 5,04 мкг N/1 раст. за 30 мин. Штамм депонирован в коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси под номером БИМ – В-501.

Разработка технологии производства биоудобрения на основе эффективного штамма клубеньковых бактерий *V. japonicum*, стимулирующего рост и развитие сои, состояла из подбора оптимальной питательной среды, объема используемого посевного материала, проверки стабильности симбиотических свойств и эффективности инокуляции семян сои в светокультуре и полевых испытаниях. Как известно, оптимальной питательной средой для активного развития медленнорастущих клубеньковых бактерий является маннитно-люпиновая среда, в которой в качестве источника углерода применяется маннит. Изучали возможность замены маннита другими источниками углерода, менее дорогостоящими, что позволило бы не только оптимизировать питательную среду при использовании конкретного штамма *V. japonicum*, но и решить вопрос о рентабельности разрабатываемого биоудобрения. В связи с этим в процессе глубинного культивирования клубеньковых бактерий сои в течение 120 ч на лабораторной качалке при 200 об/мин на питательных средах при температуре 28 °С было изучено влияние новых компонентов среды на размножение клеток штамма *V. japonicum* 84KL. В качестве источника углерода для эксперимента была использована меласса, содержащая 40–55 % сахарозы и зольные вещества и являющаяся отходом сахарного производства. На фоне нового источника углерода в качестве факторов роста использовали люпиновый, гороховый, кукурузный и дрожжевой экстракты.

В табл. 1 представлена динамика роста клеток штамма *V. japonicum* в течение 120 ч глубинного культивирования на разных питательных средах. Установлено, что максимальный титр клеток штамма клубеньковых бактерий *V. japonicum* получен через 120 ч культивирования на трех питательных средах и составил на маннитно-люпиновой среде  $1,5 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл, на меласно-дрожжевой и меласно-люпиновой – 1,02 и  $1,8 \cdot 10^9$  КОЕ/мл соответственно, минимальный – на меласно-гороховой среде ( $3,8 \cdot 10^8$  КОЕ/мл). Через 12 ч глубинного культивирования клубеньковых бактерий сои на меласно-кукурузной среде клетки культуры не обнаружены. Полученная в течение 120 ч культивирования культуральная жидкость была использована для инокуляции семян сои.

Т а б л и ц а 1. Численность клеток штамма *B. japonicum* 84 KL при глубинном культивировании в колбах на качалке

Время культивирования, ч	КОЕ/мл на средах				
	маннитно-люпиновая	мелассно-люпиновая	мелассно-гороховая	мелассно-кукурузная	мелассно-дрожжевая
0	$2,0 \pm 0,06 \cdot 10^7$	$3,7 \pm 0,2 \cdot 10^7$	$2,7 \pm 0,3 \cdot 10^7$	$1,2 \pm 0,3 \cdot 10^7$	$1,8 \pm 0,02 \cdot 10^7$
12	$6,6 \pm 0,2 \cdot 10^6$	$3,5 \pm 0,3 \cdot 10^7$	$3,4 \pm 0,6 \cdot 10^7$	–	$0,8 \pm 0,1 \cdot 10^7$
24	$8,1 \pm 0,2 \cdot 10^6$	$6,0 \pm 0,03 \cdot 10^7$	$6,5 \pm 1,2 \cdot 10^7$	–	$4,0 \pm 0,2 \cdot 10^6$
72	$2,7 \pm 0,1 \cdot 10^7$	$7,9 \pm 1,04 \cdot 10^7$	$1,0 \pm 0,02 \cdot 10^8$	–	$5,6 \pm 0,4 \cdot 10^7$
96	$3,3 \pm 0,08 \cdot 10^8$	$1,2 \pm 0,01 \cdot 10^8$	$1,2 \pm 0,06 \cdot 10^8$	–	$8,9 \pm 1,2 \cdot 10^8$
120	$1,5 \pm 0,04 \cdot 10^{10}$	$1,8 \pm 0,03 \cdot 10^9$	$3,8 \pm 0,1 \cdot 10^8$	–	$1,02 \pm 0,8 \cdot 10^9$

Наблюдения за ростом и развитием растений в условиях светокультуры показали, что инокуляты, полученные на мелассно-люпиновой, мелассно-гороховой и мелассно-дрожжевой питательных средах способствуют стимуляции роста растений в высоту, накоплению фитомассы и развитию мощной корневой системы. Однако полученные данные не превышали контрольные показатели (маннитно-люпиновая среда). Установлено, что при обработке семян сои инокулятом, полученным на мелассно-дрожжевой среде, нодулирующая способность клубеньковых бактерий штамма увеличивалась на 113 % по сравнению с контрольным вариантом. Образование клубеньков отмечено также и в варианте с использованием инокулята, полученного на мелассно-гороховой среде, однако их количество на корнях сои было ниже на 50 %, а вирулентная активность штамма снизилась на 34 %.

Установлено, что использование менее дорогостоящих источников углерода и энергии при глубинном культивировании медленно растущих клубеньковых бактерий штамма *B. japonicum* 84 KL не обеспечивает стабильности их азотфиксирующей активности (рис. 1). Окончательный отбор оптимальной питательной среды, обеспечивающей активное размножение клубеньковых бактерий штамма *B. japonicum* 84 KL с сохранением его физиолого-биохимических свойств, проводился по показателям азотфиксирующей активности. Способность клубеньковых бактерий сои фиксировать азот атмосферы была утеряна при культивировании на мелассно-кукурузной среде.

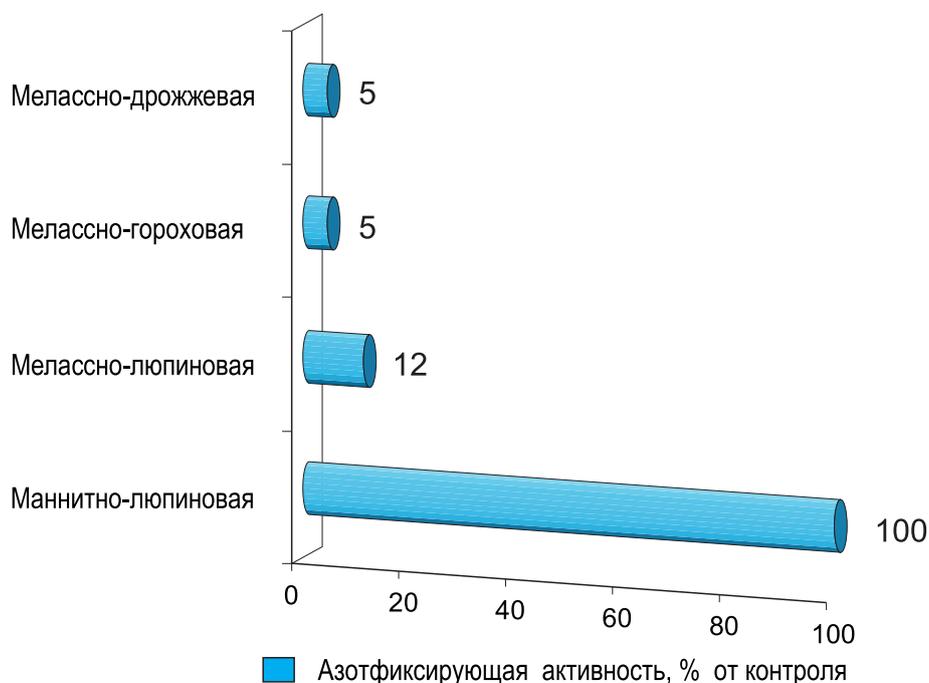


Рис. 1. Степень сохранения азотфиксирующей активности штамма *B. japonicum* 84 KL

Снижение азотфиксирующей активности на 95 % установлено в вариантах с использованием меласно-горохой и меласно-дрожжевой сред. Глубинное культивирование клубеньковых бактерий сои в меласно-люпиновой среде оказало в меньшей степени ингибирующее влияние на азотфиксирующую способность, чем в вариантах с меласно-гороховой и меласно-дрожжевой средами. Экспериментально установлено, что наиболее оптимальной питательной средой для размножения клеток штамма клубеньковых бактерий *V. japonicum* 84 KL является маннитно-люпиновая среда. Инокулят, полученный в данном варианте, ускоряет прорастание семян, обеспечивает ростстимуляцию растений. Максимальная азотфиксирующая активность штамма *V. japonicum* 84 KL установлена в варианте с обработкой семян сои инокулятом, полученным на маннитно-люпиновой среде.

Использование разных объемов (10 и 20 %) посевного материала для наработки инокулята на маннитно-люпиновой среде на качалке в течение 168 ч обеспечивает разный уровень насыщенности культуральной жидкости клетками ризобий. Максимальный титр штамма клубеньковых бактерий сои, полученный при использовании 10 % посевного материала через 120 ч глубинного культивирования, составил  $6,5 \pm 0,32 \cdot 10^9$  КОЕ/мл среды, что на порядок ниже, чем при использовании 20 % посевного материала ( $2,8 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл среды), который необходим для иммобилизации на субстрате-носителе (рис. 2). Установлены существенные различия по степени влияния инокулятов с разной степенью насыщенностью клетками клубеньковых бактерий на растение-хозяина и формирование с ним симбиотических отношений в условиях светокультуры. Концентрация клеток в инокуляте, полученном с использованием 20 % посевного материала, способствует формированию более мощной корневой системы и надземной части растений, стимулирует вирулентную активность клубеньковых бактерий в 4 раза, а нодулирующую способность – в 9 раз по сравнению с инокулятом, полученным с использованием 10 % посевного материала (рис. 3). Таким образом, для дальнейших исследований отобран оптимальный объем посевного материала, составляющий 20 % и обеспечивающий стабильность симбиотических свойств клубеньковых бактерий штамма *V. japonicum* 84 KL в симбиозе с растением-хозяином.

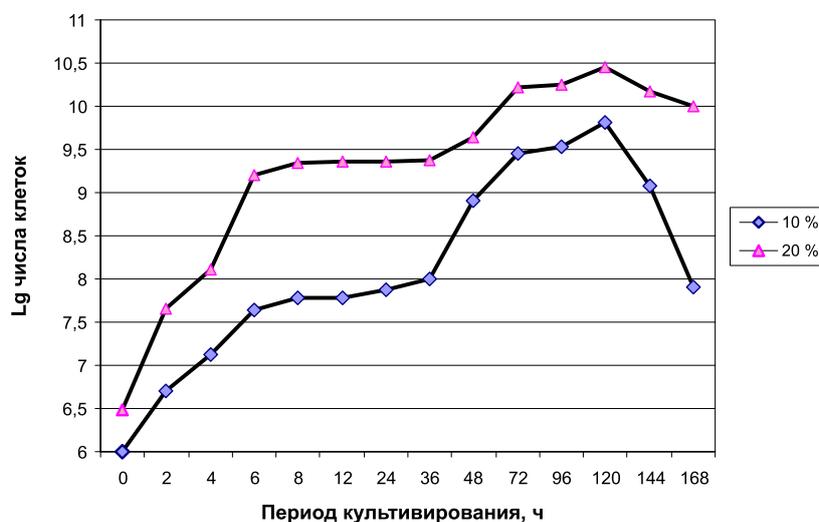


Рис. 2. Динамика роста клеток штамма *V. japonicum* 84 KL при разном объеме вносимой бактериальной суспензии

Определена оптимальная кислотность питательной среды, обеспечивающая активность и высокий титр клеток клубеньковых бактерий сои, сохранение ими симбиотических свойств и создание эффективного симбиоза с растением-хозяином. Установлено, что при  $\text{pH}_{\text{среды}} 6,8$  клубеньковые бактерии сои интенсивно размножаются и через 5 сут глубинного культивирования на маннитно-люпиновой среде в колбах на качалке получен максимальный титр клеток штамма *V. japonicum* 84 KL, который составил  $2,8 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл среды, тогда как при  $\text{pH}_{\text{среды}} 6,05$  –  $1,0 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. При глубинном культивировании в лабораторном ферментере в течение 120 ч на маннитно-люпиновой среде при температуре культивирования  $28^\circ\text{C}$ , аэрации 1 л воздуха/1 л



Рис. 3. Влияние инокулята, полученного с использованием разных объемов посевного материала (от объема питательной среды), на нодулирующую способность штамма *B.japonicum* 84 KL в симбиозе с соей: а – 20 %, б – 10 %

среды/мин, вращении мешалки 200 об/мин и  $\text{pH}_{\text{среды}}$  6,8–7,0 получен максимальный титр клеток штамма *B.japonicum* 84 KL, который составил  $1,44 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл.

Биоудобрение СояРиз (торфяная форма) получали путем иммобилизации на торфяном субстрате-носителе клубеньковых бактерий сои в количестве 90 мл культуральной жидкости на 200 г стерильного торфяного субстрата. Биоудобрение представляет собой сыпучую увлажненную торфяную массу темного цвета с высокой степенью разложения торфа (30–35 %), однородную,  $\text{pH}$  6,8, с влажностью 42 % и содержанием клеток штамма *B.japonicum* 84 KL не менее  $1,02 \cdot 10^8$  КОЕ/г. Гектарная порция биоудобрения составляет 200 г.

Проведенные полевые испытания биоудобрения СояРиз подтвердили эффективность его применения (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Симбиотические показатели сои при обработке семян клубеньковыми бактериями (полевые испытания)

Вариант опыта	Нодулирующая способность, шт/раст.	Азотфиксирующая активность	
		мкг N/на 1 раст. за 1 ч	мкг N/м <sup>2</sup>
$\text{P}_{50} \text{K}_{120}$	–	–	–
$\text{P}_{50} \text{K}_{120} + B.japonicum$ 84 KL (культуральная жидкость)	10	0,11	6,1
$\text{P}_{50} \text{K}_{120} + B.japonicum$ 84 KL (СояРиз)	8	0,19	10,5

В результате полевых испытаний установлено, что применение биоудобрения обеспечило получение прибавки урожая семян по сырому белку в количестве 345 кг/га (61 %), увеличение содержания белка в семенах на 5,4 %, а также способствовало накоплению в почве аммиачного азота (4,3–6,3 мг/кг) и снижению содержания нитратного азота на 60–70 %.

**Заключение.** Проведены исследования по подбору и оптимизации состава питательной среды и ее кислотности для активного размножения клубеньковых бактерий сои, оптимизирован объем посевного материала штамма *B.japonicum* 84 KL для получения инокулята с высоким титром клеток медленно растущих клубеньковых бактерий сои, обеспечивающим создание эффективного симбиоза с соей. Оптимизированы условия глубинного культивирования штамма *B.japonicum* 84 KL в ферментере АНКУМ-10 (время культивирования 120 ч, маннитно-люпиновая среда,  $\text{pH}_{\text{среды}}$  6,8, температура +28 °С, объем подаваемого воздуха – 1 л воздуха/1 л среды/мин при вращении мешалки 200 об/мин), при которых получен максимальный титр клеток штамма *B.japonicum* 84 KL, составивший  $1,44 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл. Биоудобрение СояРиз (торфяная

форма) получено путем иммобилизации на стерильном торфяном субстрате-носителе клубеньковых бактерий сои в количестве 90 мл инокулята/200 г стерильного торфяного субстрата. Титр клеток штамма *B. japonicum* 84KL в 1 г субстрата-носителя составляет не менее  $1,02 \cdot 10^8$  КОЕ/г. Период хранения жидкого инокулята – 3 мес, биоудобрения СояРиз – 6 мес. Предпосевная инокуляция семян сои биоудобрением СояРиз способствовала увеличению урожайности семян сои на фоне  $P_{50}K_{120}$  на 7,8 ц/га, что обеспечило сбор белка на 345 кг/га больше, чем в контроле, накоплению в почве аммиачного азота в количестве 4,3–6,3 мг/кг, снижению содержания нитратного азота на 60–70 %.

### Литература

1. Методы исследования клубеньковых бактерий: метод. реком. Л., 1981.
2. Звягинцев Д. Г., Асеева И. В., Бабьева И. П., Мирчик Т. Г. // Методы почвенной микробиологии и биохимии. М., 1980. С. 63–130.
3. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии: В 3 т. М., 1983. Т. 1.
4. Методические указания по использованию ацетиленового метода при селекции бобовых культур на повышение симбиотической азотфиксации. Л., 1982.

L. E. KARTYZHOVA, I. V. SEMYONOVA, N. V. KOROLYONOK, Z. M. ALESCHENKOVA, L. V. ROMANOVA

#### EFFICIENT STRAIN OF SLOW-GROWING NODULATING BACTERIA *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* 84KL AS A BASIS OF BIOFERTILIZER SOYARHIZ

### Summary

Most efficient competitive strain of slow-growing nodulating bacteria *Bradyrhizobium japonicum* 84KL possessing growth-promoting and nitrogen-fixing activities was isolated and selected from nodules of *Glycine max.* cultivated in Belarus. Technological parameters and conditions for submerged fermentation of a new bacterial strain were defined, and survival rate of the strain during storage in liquid culture and upon immobilization on substrate-carrier was examined. It was found that pre-sowing inoculation of soya seeds with biofertilizer Soyarhiz promoted rise in soya seed productivity stimulated by mineral  $P_{50}K_{120}$  supply by 7.8 c/ha, 5.4 % increase in seed protein content, accumulation of ammonium nitrogen in soil in amount 4.3–6.3 mg/kg with concomitant fall of nitrate nitrogen level by 60–70 %.