

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-52

**РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ
НА ОСНОВЕ ШТАММОВ АЗОТОФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ***

**THE ELABORATION OF A HIGHLY EFFECTIVE MICROBIOLOGICAL FERTILISER BASED
ON STRAINS OF NITROGEN-FIXING BACTERIA**

Г. С. Бошляков, Е. В. Гришина, А. О. Пайбердин, Д. В. Пак,
А. М. Петрова, Е. М. Родионов, И. А. Юрина, М. С. Золотарева

Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва

G. S. Boshlyakov, E. V. Grishina, A. O. Paiberdin, D. V. Pak,
A. M. Petrova, E. M. Rodionov, I. A. Yurina, M. S. Zolotareva

Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow

✉ grigori200328@gmail.com

Аннотация

Минеральные удобрения теряют эффективность, ее можно повысить добавлением микробиологических удобрений. Выделены и охарактеризованы 6 штаммов бактерий, изучен их агрономический потенциал. Оптимизирована плотная питательная среда. Обнаружено 2 штамма, вступающие в антагонистические отношения с *P. chlororaphis* 449. Определена видовая принадлежность штаммов методами спектрометрии и секвенирования по Сенгеру.

Abstract

Mineral fertilizers lose their effectiveness. It improved by adding microbiological fertilizers. Six bacterial strains were isolated and characterized, and their agronomic potential was studied. A dense nutrient medium was optimized. Two strains were found to enter into antagonistic relationships with *P. chlororaphis* 449. Spectrofluorometry showed the accumulation of siderophores. Strains were determined using spectrometry and Sanger sequencing methods.

На сегодняшний день минеральные удобрения широко распространены. Однако их использование сопряжено с рядом недостатков. Так, неконтролируемое применение удобрений приводит к засаливанию и эрозии почвы, минеральные удобрения вымываются и попадают в грунтовые воды и могут вредить организмам симбионтам. В результате их продолжительного применения на посевных территориях количество удобрений достигло предельно допустимых значений, из-за чего повышение концентрации практически не влияет на урожайность сельскохозяйственных культур, с такой проблемой уже столкнулся Китай [1]. Применение же микробиологических удобрений сочетает в себе высокую эффективность и экологичность: способствует росту растений и восстановлению почвы, а также повышает усвояемость минеральных удобрений, препятствует развитию фитопатогенных организмов.

В ходе работы из образцов почвы Ботанического сада РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева было получено 6 чистых культур азотфиксирующих бактерий, способных к фитостимуляции. Изучены их макро- и микроморфологические свойства, подобраны оптимальные субстраты для роста и культивирования. Культуры на агаре представляют собой бесцветные слизистые колонии округлой формы с диаметром от 1 до 5 мм, клетки — граммотрицательные неспорообразующие бациллы, способные образовывать покоящиеся формы.

Были выполнены опыты, направленные на изучение агрономического потенциала микроорганизмов в качестве удобрений. При проведении эксперимента семена огурцов Либелле F1 замачивались в суспензии микроорганизмов, а затем высаживались в землю (выборка производилась из 160 семян, по 20 на каждый штамм, 20 на контроль и 20 на препарат «Азотовит®»). В результате эксперимента была проведена оценка фитостимулирующей активности, показавшая, что все обнаруженные штаммы, ассоциированные с *Quercus robur*, *Ficus carica*, *Fabaceae* spp., *Sorbus aucuparia*, *Monstera deliciosa*, *Aucuba japonica*, способствуют ускоренному прорастанию семян, раннему появлению истинных листьев и увеличению стебля растения. Полученные данные по развитию

* Исследование выполнено при поддержке гранта «Акселератор 4.0 РГУ МИРЭА вторая волна».

ростков подтверждают преимущество выделенных микроорганизмов перед препаратом «Азотовит®», что делает их перспективными компонентами для биоудобрения.

Была оптимизирована плотная питательная среда для культивирования выделенных чистых культур с помощью добавления к ней отвара бобовых, что может быть использовано в дальнейшем производстве при подготовке инокулята культуры перед культивированием в биореакторе.

Обнаружено, что штаммы, ассоциированные с *S. aucuparia*, *Fabaceae spp.*, вступают в антагонистические отношения с фитопатогенной бактерией *P. chlororaphis*. Все культуры накапливают сидерофоры — родственники азотобактина в ответ на антигены *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. chlororaphis*. Регистрация спектров флуоресценции происходила при длине волны 490 нм на анализаторе жидкости «Флюорат-02-Панорама» (спектрофлуориметр). По результатам спектрофлуориметрии были получены спектры испускания данных образцов, на которых наблюдался пик при длине волны 350 нм, что соответствует литературным данным по азотобактину. Эти штаммы являются перспективными агентами биоконтроля сельскохозяйственных культур [2].

Методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией на приборе MALDI-TOF MS с высокой достоверностью было определено, что два исследуемых штамма относятся к *A. radiobacter*. Используя данные штаммы, можно разработать новые устойчивые к внешним факторам сельскохозяйственные культуры [3].

Методом секвенирования по Сэнгеру, проведенным компанией «Евроген» на генетическом анализаторе 3500xL Applied Biosystems, с высокой достоверностью определены виды выделенных бактерий. Так, штамм, ассоциированный с *F. spp.*, является *Ancylobacter defluvii*, *M. deliciosa* — *Agrobacterium radiobacter*, *F. carica* — *Agrobacterium sp.*, *A. japonica* — *Agrobacterium sp.*

Литература

1. Textor C. Consumption of agricultural fertilizers in China from 2014 to 2021, by nutrient. URL: <https://www.statista.com/statistics/1330039/fertilizer-consumption-by-nutrient-china/>
2. Li K., Guo Y. et al. A transient transformation system for gene characterization in upland cotton (*Gossypium hirsutum*) // Plant Methods. 2018. Vol. 14. P. 50.
3. Sumbul A. et al. Azotobacter: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management // Saudi J. Biol. Sci. 2020. Vol. 27, No. 12.