

**АХТЕМОВА Г.А., ШТАРК О.Ю., ПЕРШИНА Е.В., ПИНАЕВ А.Г.,
АНДРОНОВ Е.Е., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А.**

*ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии,
Россия, 196608, Санкт-Петербург, ш. Подбельского, д.3,
e-mail: ahgulya@yandex.ru*

СОЗДАНИЕ НОВЫХ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ АДАПТИВНОГО СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

Известно, что полезные почвенные микроорганизмы улучшают минеральное питание и водный статус растений, синтезируют физиологически активные вещества — стимуляторы роста, предотвращают развитие патогенной микрофлоры в ризосфере, а также обеспечивают ряд важных признаков плодородия почвы [1–3]. Кроме того, показано, что различные полезные почвенные микроорганизмы могут проявлять синергизм, как в отношении друг друга, так и при воздействии на растение [4, 5].

Бобовые растения, являющиеся ключевым компонентом технологий адаптивного растениеводства (<http://www.grainlegumes.com/aep/>), формируют, по крайней мере, два типа мутуалистических эндосимбиозов: азотфиксирующий симбиоз с клубеньковыми бактериями и арбускулярную микоризу с грибами отдела *Glomeromycota*. Оба симбиоза характеризуются высокой степенью интеграции генетических систем партнеров и в значительной степени контролируются растением [6, 7]. Кроме того, бобовые образуют эктосимбиозы, или так называемые ассоциативные симбиозы, с различными полезными ризосферными бактериями, которые объединены под термином PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* — ризобактерии, стимулирующие рост растений) [1, 4, 5, 8, 9, 10]. Изучение генетического контроля формирования различных симбиозов бобовых привело к заключению, что бобовые обладают единой генетической системой, контролирующей развитие многокомпонентной растительно-микробной системы [7, 9–11].

Таким образом, становится очевидной возможность практического использования в сельском хозяйстве взаимовыгодных многокомпонентных растительно-микробных систем. Введение в сельскохозяйственную практику потенциала растительно-микробных взаимодействий означает, прежде всего, удаление и уменьшение роли синтетического компонента, и замену его натуральными компонентами, в том числе, биологическими микробными препаратами [5, 8, 10, 12].

Успешным примером многокомпонентного микробного препарата является “БисолбиМикс”, разработанный авторами в сотрудничестве с инновационной компанией “Бисолби-Интер”, содержащего высокоэффективные штаммы клубеньковых бактерий, полезных ризосферных бактерий и изоляты грибов арбускулярной микоризы из коллекций ГНУ ВНИИСХМ и “Бисолби-Интер” [13]. В полевых условиях была показана высокая эффективность этого препарата при использовании, как под бобовые [14], так и небобовые

культуры. В качестве субстрата-носителя в препарате используется фильтрационно-мочный осадок (ФМО) — отход производства сахара из сахарной свеклы, представляющий собой смесь фильтрационного осадка (ФО), или дефеката, и почвы. Первоначально использовали ФМО с сахарного завода пос. Сотницыно Рязанской области. Однако в связи с тем, что транспортировка субстрата требует значительных финансовых расходов, возникает необходимость перехода на региональное производство “БисолбиМикс” на основе ФМО местных сахарных заводов.

Вместе с тем, в последнее время все большее количество сельскохозяйственных угодий выводится из оборота в связи с загрязнением или складированием на них производственных отходов. В частности, свежие ФО составляют 8–12% от веса перерабатываемой свеклы, содержат до 60% влаги и около 30% извести; они локализованы вокруг промышленных предприятий по переработке сахарной свеклы и представляют собой значительные ареалы загрязнения почвенного покрова. На типовом сахарном заводе таких отходов накапливается до 90–120 тыс. тонн ежегодно [15, 16]. После высушивания ФО становятся рыхлой, легко рассыпчатой массой, с влажностью до 20–30% и технологически пригодными для внесения в почву. В таком виде дефекат целесообразно применять в качестве эффективного и дешевого мелиоранта на кислых и слабокислых почвах для коррекции pH и обеспечения более высоких урожаев сельскохозяйственных культур [15, 17]. ФМО являются более богатым субстратом для развития различных групп микроорганизмов, включая микробные консорциумы аборигенных почв районов произрастания сахарной свеклы и, следовательно, являются более интересным и перспективным объектом для использования в качестве субстрата-носителя при приготовлении микробиологических удобрений [10].

Цель данной работы состояла в исследовании ФМО с различных сахарных заводов РФ как потенциального компонента (субстрата-носителя) многокомпонентного микробного препарата.

Материалы и методы

В данной работе исследовали отвалы, образованные при складировании фильтрационно-мочного осадка с полей фильтрации ряда сахарных заводов из различных регионов России (Рязанская обл., Орловская обл., республика Башкирия). Для анализа, как правило, отбирали образцы свежих отвалов 1–3-х лет складирования, которые характеризовались редкой и скудной растительностью, образцы овалов среднего возраста 5–10-ти лет складирования и более поздних отвалов — 20–30-ти летнего складирования, покрытые разнообразной травяной растительностью.

Общую численность и таксономическое разнообразие культивируемых микроорганизмов учитывали традиционными методами на твердых агаризованных средах (глюкозопептонный агар, крахмалоаммиачный агар). Идентификацию штаммов бактерий, выделенных из образцов ФМО, определяли путем амплификации гена 16SpPHK методом ПЦР с последующим клонированием и секвенированием нуклеотидных последовательностей с исполь-

зованием автоматического капиллярного секвенатора CEQ8000 и реагентов фирмы Beckman Coulter (США). Таксономическое положение исследуемых штаммов определяли на основании сравнения полученных последовательностей с базой данных GeneBank, с использованием программы BLAST [18]. Для определения в образцах ФМО наличия азотфиксирующих бактерий и грибов арбускулярной микоризы были поставлены вегетационные опыты с растениями из семейства злаковых (гибрид сорго и суданской травы, *Sorghum sp.*) и бобовых (горох посевной, *Pisum sativum* L.).

Результаты и обсуждение

Был проведен агрохимический анализ образцов ФМО и анализ содержания тяжелых металлов. В ходе исследований было установлено, что отвалы во всех регионах характеризуются средними значениями агрохимических показателей, содержание тяжелых металлов ниже предельно-допустимых норм.

Было показано, что для свежих отвалов характерна низкая биологическая активность, щелочная реакция (рН от 8 до 9) и довольно высокое содержание бактерий (10^7 – 10^8 КОЕ в 1 г субстрата). Причем бактериальное сообщество характеризовалось низким уровнем разнообразия с преимуществом в доминировании грамположительных неспорообразующих бактерий (актинобактерий) из родов — *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*. Как известно, эти бактерии являются пионерами заселения экстремальных зон с труднодоступными питательными веществами [19, 20].

В свежих залежах ФМО, образованных на сахароперерабатывающих заводах республики Башкирия, не было установлено наличия аборигенных симбиотических микроорганизмов, таких как грибы арбускулярной микоризы и клубеньковые бактерии. В свежих отвалах Орловской и Рязанской областей практически не происходило микоризации растений, а на корнях гороха (*P. sativum*) было сформировано небольшое число клубеньков, что в итоге объяснило невысокий урожай.

Отвалы более позднего срока, которые складировались 10–30 лет, отличались слабощелочными и нейтральными значениями рН, с высокой биологической активностью по разложению целлюлозы, средними значениями общего количества гетеротрофных бактерий (10^6 КОЕ в 1 г субстрата), с довольно широким уровнем разнообразия. В бактериальном сообществе таких отвалов доминировали как грамположительные, так и грамотрицательные ризосферные микроорганизмы из рода *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* и *Bacillus*. Эти бактерии из группы PGPR колонизируют поверхность корня и активно участвуют во многих ключевых процессах, таких как биологический контроль фитопатогенов, циклы питания растения и выживаемость проростков. В частности, выделенный из ФМО штамм бактерий *Bacillus megaterium*, во всем проведенным тестам характеризовался как стимулирующий рост и развитие растений.

Кроме того, было отмечено, что в 10–30-летних отвалах бактерий актиномицетной линии в количественном значении больше, чем в свежих отвалах

и в почвах данного региона. Известно, что эти бактерии взаимосвязаны со структурами грибов арбускулярной микоризы, которые постоянно присутствуют в ризосфере растений и являются спутниками и активными участниками растительно-микробных симбиозов [21–23].

Залежи ФМО более поздних сроков хранения (старше 10 лет) характеризовались почти 100% микоризацией выращиваемых растений, более высокой степенью клубенькообразования и получением высоких урожаев.

Таким образом, ФМО позднего срока складирования характеризуются значениями рН, близкими к нейтральным, высокой биологической активностью, широким уровнем разнообразия ризосферных микроорганизмов, наличием аборигенных клубеньковых бактерий и грибов арбускулярной микоризы и, как следствие, определяют хороший рост и развитие растений, в том числе и ценных сельскохозяйственных культур. ФМО сахарных заводов со сроком складирования более 10 лет можно рекомендовать как компонент (субстрат-носитель) промышленных микробных препаратов для экологически ориентированного сельского хозяйства.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки (Государственные контракты №02.512.11.2280, 02.740.11.0276), грантов: президент РФ (НШ-3440.2010.4), РФФИ (09-04-13895, 09-04-91054, 09-04-91293, 10-04-00961, 10-04-01146), NWO-047.117.2005.006 (Нидерланды).

Литература

1. *Bloemberg C.V., Lugtenberg B.J.J.* // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001. 4: 343–350.
2. *Тихонович И.А., Борисов А.Ю., Цыганов В.Е., Овцына А.О., Долгих Е.А., Проворов Н.А.* // *Успехи современной биологии.* 2005. Т. 125. №3.— С. 227–238.
3. *Tsavkelova E.A., Klimova S.Yu., Cherdyntseva T.A. and Netrusov A.I.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006. 42: 117–126.
4. *Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon R., Azcon-Aguilar C.* // *J. Exp. Botany* 2005. 56: 1761–1778.
5. *Лабутова Н.М.* // *Микология и фитопатология,* 2009, Т. 43.— С. 3–19.
6. *Проворов Н.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А.* // *Журн. общ. биол.* 2002. Т.63, №6.— С. 451–472.
7. *Parniske M.* // *Nature Rev Microbiol,* 2008. 6: 763–775.
8. *Barea J.M.* // *Biological resource management: connecting science and policy (OECD).* INRA. 2000.— P. 110–125.
9. *Sanchez L., Weidmann S., Arnould C., Bernard A.R., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V.* *Plant Physiol.* 2005. 139: 1065–1077.
10. *Борисов А.Ю., Штарк О.Ю., Жуков В.А., Пинаев А.Г., Ахтемова Г.А., и др.* // *Материалы Всероссийской школы молодых селекционеров им. С.А. Кунакбаева.* 11–15 марта 2008. Уфа.— С. 105–120.
11. *Тихонович И.А., Проворов Н.А.* *Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего.* СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2009.— 210 с.
12. *Vance C.P.* // *Plant Physiol.* 2001. 127: 390–397.
13. *Чеботарь В.К., Казаков А.Е., Ерофеев С.В. и др.* “Способ получения комплексного микробиологического удобрения”. Патент №2318784, зарегистрирован 10.03.2008.

14. Штарк О.Ю., Данилова Т.Н., Наумкина Т.С. и др. // Экол. генет., 2006. Т.4, №2.— С. 22–28.
15. Василюк Г.В., Клебанович Н.В., Пехота А.П. Почвенные исследования и применение удобрений / Беларусь. Минск. 1995. Вып.23.— С. 92–100.
16. Джувеликян Х.А. Экология и человек. Воронеж. ВГУ, 1999.— 264 с.
17. Василюк Г.В., Богдевич И.М., Клебанович Н.В., Германович Т.М. Метод. реком. Института почвоведения и агрохимии НАН Беларуси. Минск. 2004.— 20 с.
18. Altschul S. F., Gish W., Miller W. [et al.] // J. mol. biol. 1990. 215: 403–410.
19. Карасев С.Г. Актинобактерии из многолетнемерзлых отложений Сибири. Автореферат диссертации на соискание ученой степени к.б.н. Пушино. 2007.
20. Никашина А.А., и др. // Известия СНЦ РАН. 2009. Т.11, №1(6).— С. 1355–1358.
21. Filippi C., Bagnoli G., Citernes A.S., Giovannetti M. // Symbiosis. 1998. 24: 1–12.
22. Tokala R.K., Strap J.L., Jung C.M. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. 68: 2161–2171.
23. Markmann K., Giczey G., Parniske M. // PLoS Biology, 2008. 6(3): 68.

Резюме

Показана возможность создания многокомпонентных микробных препаратов на основе отходов сахарного производства (фильтрационно-моющих осадков, ФМО) для адаптивного сельского хозяйства. Установлено, что отвалы ФМО с различных сахарных заводов от 10-ти годам складирования также имеют высокие показатели по содержанию собственной полезной почвенной микрофлоры.

Possibility of production of multi-component microbial bio-preparations for sustainable agriculture on the base of filtration washing pellet (FWP) of sugar industry was demonstrated. The 10-years dumps of FWP from different sugar factories have also been shown to contain high amounts of diverse own beneficial soil microbes.

БЛИНСЬКА О.В.¹, ТИМЧУК С.М.¹, ДУЛЬНЄВ П.Г.², ДЕРЕБІЗОВА О.Ю.¹

¹Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва Української академії аграрних наук
Україна, 61060, Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

²Науково-інженерний центр “АКСО” Інституту біоорганічної хімії і нафтохімії
Національної академії наук України 02160, Київ, Харківське шосе, 50,
e-mail: selit@ua.fm

ОЦІНКА МОРФОГЕНЕТИЧНОГО ЕФЕКТУ ПРИРОДНИХ І ХІМІЧНО МОДИФІКОВАНИХ КРОХМАЛІВ У СКЛАДІ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ МЕТОДОМ КУЛЬТУРИ ПИЛЯКІВ *IN VITRO*

Удосконалення складу штучних живильних середовищ для культивування *in vitro* рослинних клітин, тканин та органів насамперед полягає у встановленні дослідним шляхом оптимальних концентрацій стимуляторів росту і інших фізіологічно активних речовин як компонентів з найбільшим