

УДК 579.64

Совместное культивирование азотфиксирующего штамма *Azomonas macrocytogenes* и штамма-антагониста *Bacillus atrophaeus**Родовиков С.А., Хижняк С.В., Овсянкина С.В., Аболенцева П.А.**Красноярский государственный аграрный университет***Аннотация**

Изучена возможность совместного культивирования азотфиксирующего штамма *Azomonas macrocytogenes* OSV-2 и штамма-антагониста фитопатогенных грибов *Bacillus atrophaeus* B-13893 с целью использования в комплексном биопрепарате, обладающем азотфиксирующей и антимикотической активностью. Оба штамма выделены авторами из почв сельскохозяйственного назначения и идентифицированы по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Установлено, что штаммы не проявляют взаимного антагонизма и хорошо растут в совместной культуре на искусственной питательной среде. При измерении микроколоний не обнаружено статистически значимого ингибирования роста азотфиксирующего штамма *A. macrocytogenes* OSV-2 в присутствии штамма-антагониста *B. atrophaeus* B-13893. Таким образом, оба штамма могут быть использованы совместно для улучшения азотного питания растений и биологической защиты растений от грибных болезней.

Ключевые слова: БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ ОТ БОЛЕЗНЕЙ, ШТАММЫ-АНТАГОНИСТЫ, АЗОТФИКСИРУЮЩИЕ ШТАММЫ, *BACILLUS ATROPHAEUS*, *AZOMONAS MACROCYTOGENES*, СОВМЕСТНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

Введение

Одним из важнейших направлений в современном сельском хозяйстве является замена средств химизации на биологические препараты. Это достигается заменой химических удобрений на микробиологические – в первую очередь, на биопрепараты на основе азотфиксирующих микроорганизмов [1-3], а также заменой химических средств защиты растений на биопрепараты на основе штаммов, проявляющих антагонизм к

фитопатогенным микроорганизмам [4-6]. Наиболее перспективными являются комплексные биопрепараты, сочетающие в себе свойства микробиологических удобрений и средств биологической защиты растений за счёт подбора соответствующей комбинации штаммов. Однако для разработки подобных препаратов необходимо, чтобы входящие в их состав штаммы не проявляли взаимного антагонизма и были способны к росту в совместной культуре.

Настоящая работа посвящена изучению возможности совместного культивирования азотфиксирующего штамма *Azomonas macrocytogenes* OSV-2 и штамма-антагониста фитопатогенных грибов *Bacillus atrophaeus* В-13893 с целью использования в комплексном биопрепарате, обладающем азотфиксирующей и антимикотической активностью.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы, выделенные авторами из сельскохозяйственных почв Красноярского края и идентифицированные по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК в Национальном биоресурсном центре - Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов.

Штамм *A. macrocytogenes* OSV-2 представляет собой аспорогенные грамотрицательные аэробные палочки, способные фиксировать атмосферный азот; в молодой культуре – подвижные. Клетки плеоморфные, от коротких палочковидных в молодой культуре до округлых в стареющей культуре, одиночные, в парах, в тетрадах и в неправильных скоплениях, редко – в коротких цепочках. При старении культуры склонны к образованию слизистой капсулы; клетки под капсулами кокковидные, могут достигать больших размеров; размер палочковидных клеток 2,6–4,2x2,1–3,5 мкм; диаметр кокковидных клеток без капсул 1,8–2,5 мкм; диаметр кокковидных клеток под капсулами 2,6–4,0 мкм [7] (рис. 1). Таксономическое положение штамма: домен Bacteria, тип Pseudomonadota, класс Gammaproteobacteria, порядок Pseudomonadales, семейство Pseudomonadaceae, род *Azomonas*.

Штамм *B. atrophaeus* В-13893 представляет собой грамположительные подвижные спорообразующие палочки, молодые клетки – до 24 мкм длиной, клетки в зрелой культуре – 4,2–9,6 x 1,1–1,3 мкм; эндоспора – овальная, 1,5–2,4 x 0,7–1,3 мкм, расположение в клетке – центральное или субтерминальное; прорастание эндоспоры латеральное (рис. 2).

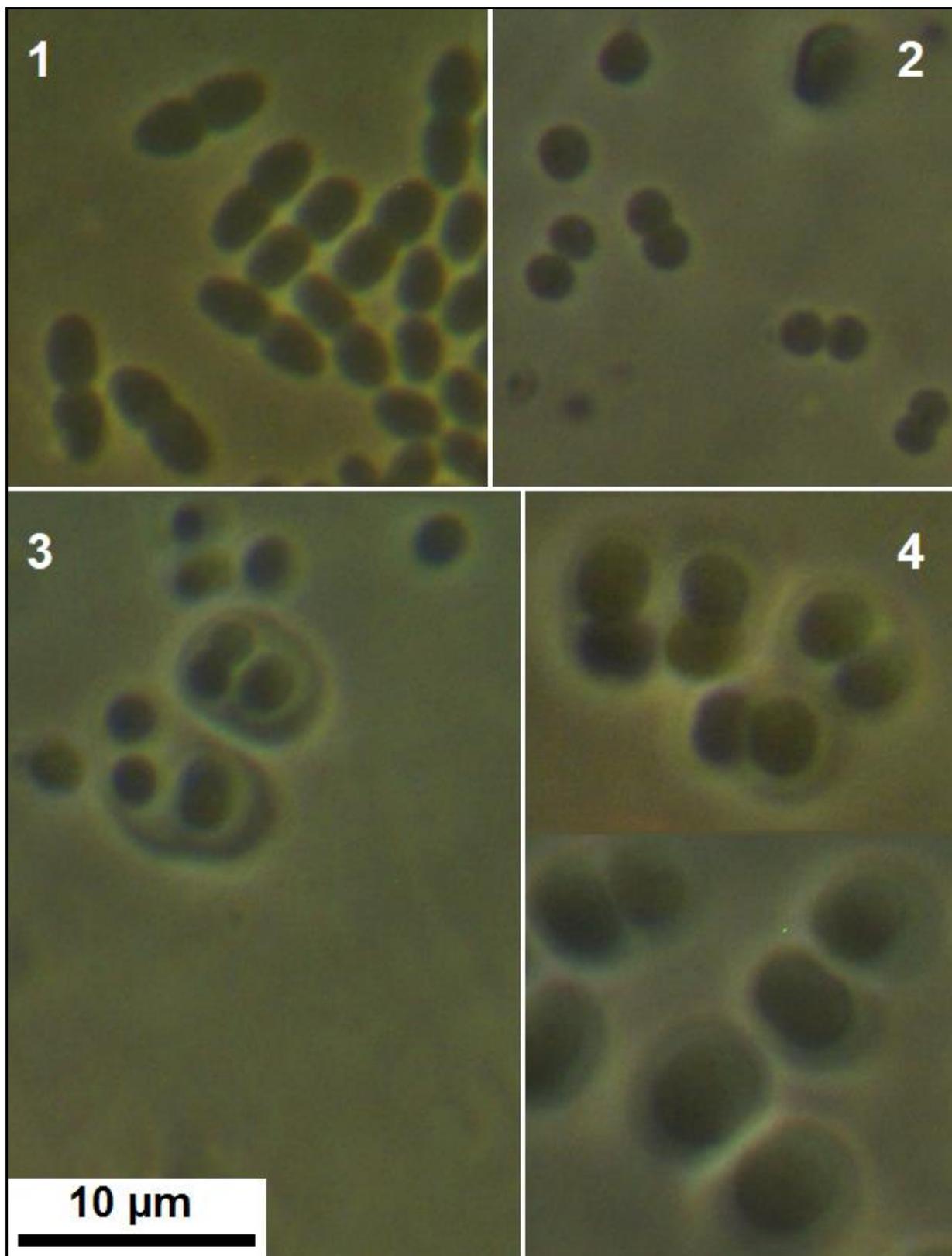


Рис. 1. Штамм *A. macrocytogenes* OSV-2: 1 – овальные клетки в молодой культуре; 2 – кокковидные клетки в зрелой культуре, 3,4 – клетки в старой культуре; длина масштабной полоски 10 мкм



Рис. 2. Штамм *B. atrophaeus* В-13893: 1 – клетки в молодой культуре, 2 – клетки со спорами, 3 – споры, 4 - прорастание спор; длина масштабной полоски – 10 мкм клетки и эндоспоры; длина масштабной полоски 10 мкм

Таксономическое положение штамма: домен Bacteria, тип Bacillota, класс Bacilli, порядок Bacillales, семейство Bacillaceae, роду *Bacillus*. Штамм успешно апробирован в лабораторных и полевых условиях в качестве биологического средства защиты сои и пшеницы от грибных болезней в ходе выполнения научно-исследовательских работ по заказу Министерства сельского хозяйства Российской Федерации "Разработка биопрепарата для защиты сои от грибных болезней в условиях Сибири" (2020 г.) и "Разработка комплексного биопрепарата для защиты пшеницы от фузариоза и улучшения обеспеченности пшеницы азотом в условиях Сибири" (2021 г.) и запатентован В-13893 в качестве продуцента для получения биопрепарата против возбудителей грибных болезней сои [8].

Для проверки возможности роста в совместной культуре суспензии штаммов с титром 10^6 клеток/мл смешивали и наносили микропипет-дозатором в виде капель объёмом 20 мкл на поверхность агаризованной питательной среды и инкубировали при температуре $+25^{\circ}\text{C}$ в течение 20 часов. После окончания инкубирования анализировали рост штаммов с использованием микроскопа Микмед-6 вар. 3 на разных увеличениях. При микроскопии на большом увеличении проверяли наличие морфологических изменений в клетках изучаемых штаммов при их совместном росте. При микроскопии на малом увеличении измеряли размер микроколоний штамма *A. macrocytogenes* OSV-2 для сравнения с контрольным вариантом, инкубированным параллельно в тех же условиях в отсутствие штамма-антагониста *B. atrophaeus* В-13893. Измерения проводили по микрофотографиям с помощью программы ImageJ.

Результаты исследований

Оба штамма продемонстрировали способность к совместному росту без образования аномальных клеток, характерных для антибиотического воздействия (рис. 3).

Средний размер микроколоний штамма *A. macrocytogenes* OSV-2 в совместной культуре со штаммом *B. atrophaeus* В-13893 был статистически значимо ($p < 0,001$) больше, чем в контрольном варианте в отсутствие штамма *B. atrophaeus* В-13893 (табл. 1).

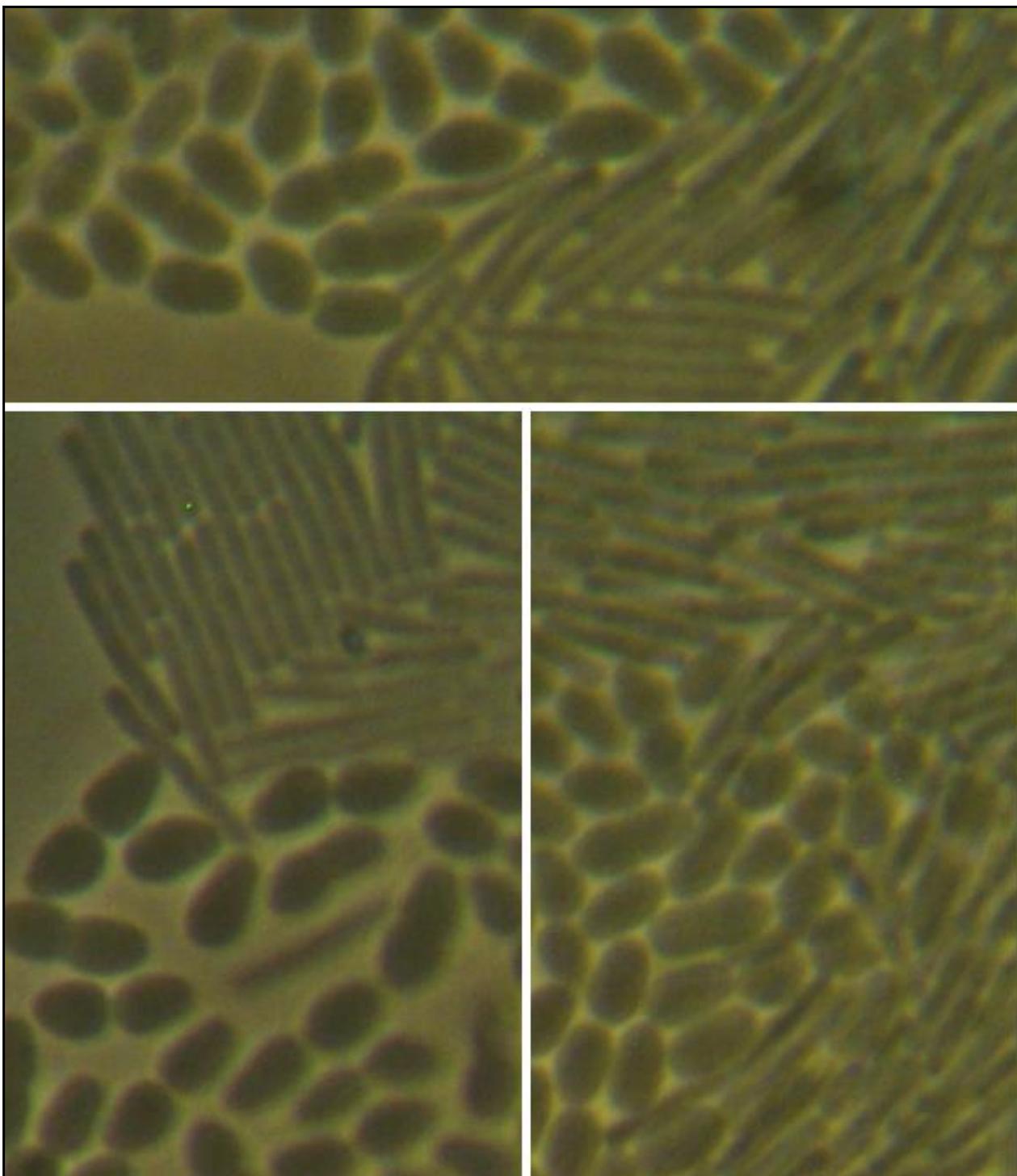


Рис. 3. Рост изучаемых штаммов в совместной культуре

Таблица 1. Диаметр микроколоний (мкм) штамма *A. macrocytogenes* OSV-2 в совместной культуре со штаммом *B. atrophaeus* В-13893 и в контрольном варианте

Показатель	Контроль	Совместная культура
Среднее	35,73±3,69	52,96±4,01
Стандартная ошибка	1,87	2,03
Медиана	26,32	49,51
Мода	19,16	31,39
Минимум	7,51	10,93
Максимум	120,15	148,77
Число измеренных колоний	166	141

Эти результаты могут свидетельствовать о стимуляции роста штамма *A. macrocytogenes* OSV-2 в присутствии *B. atrophaeus* В-13893. Тем не менее, анализ распределений размера колоний *A. macrocytogenes* OSV-2 в контрольном и опытном вариантах показывает, что увеличение среднего размера колоний в присутствии *B. atrophaeus* В-13893 обусловлено тем, что малоразмерные колонии *A. macrocytogenes* OSV-2 в совместной культуре маскируются ростом *B. atrophaeus* В-13893, и, соответственно, не учитываются при измерении (рис. 4-6).

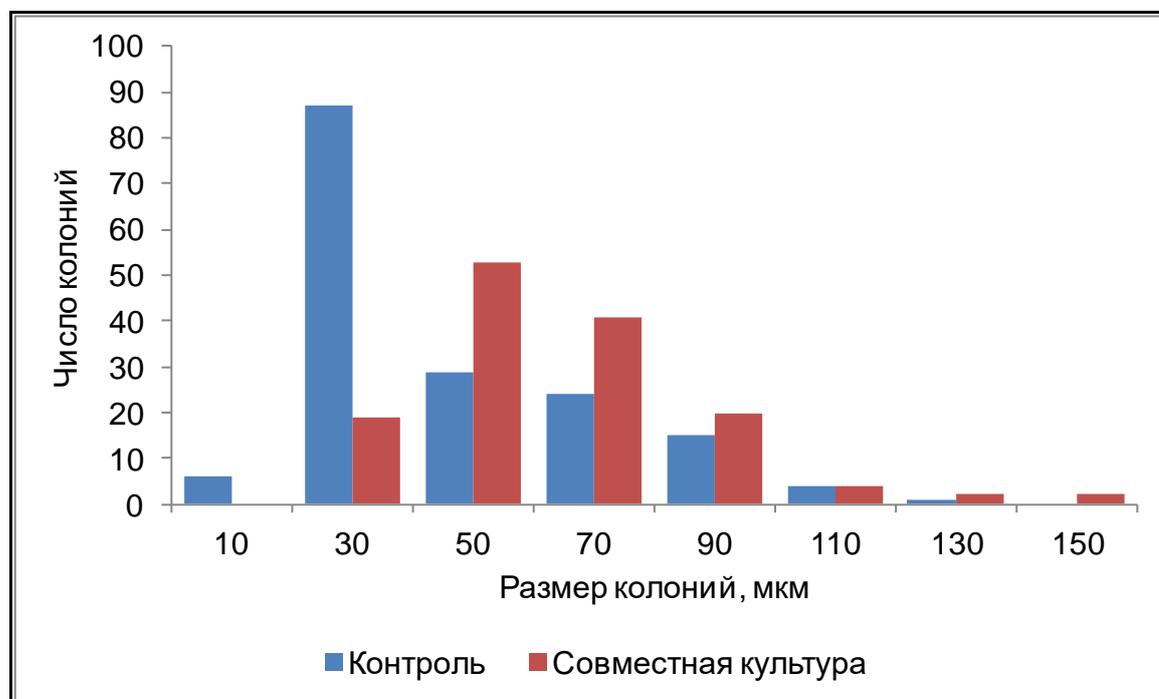


Рис. 4. Распределение микроколоний штамма *A. macrocytogenes* OSV-2 в совместной культуре со штаммом *B. atrophaeus* В-13893 и в контрольном варианте по диаметру; по оси абсцисс показаны верхние границы интервалов

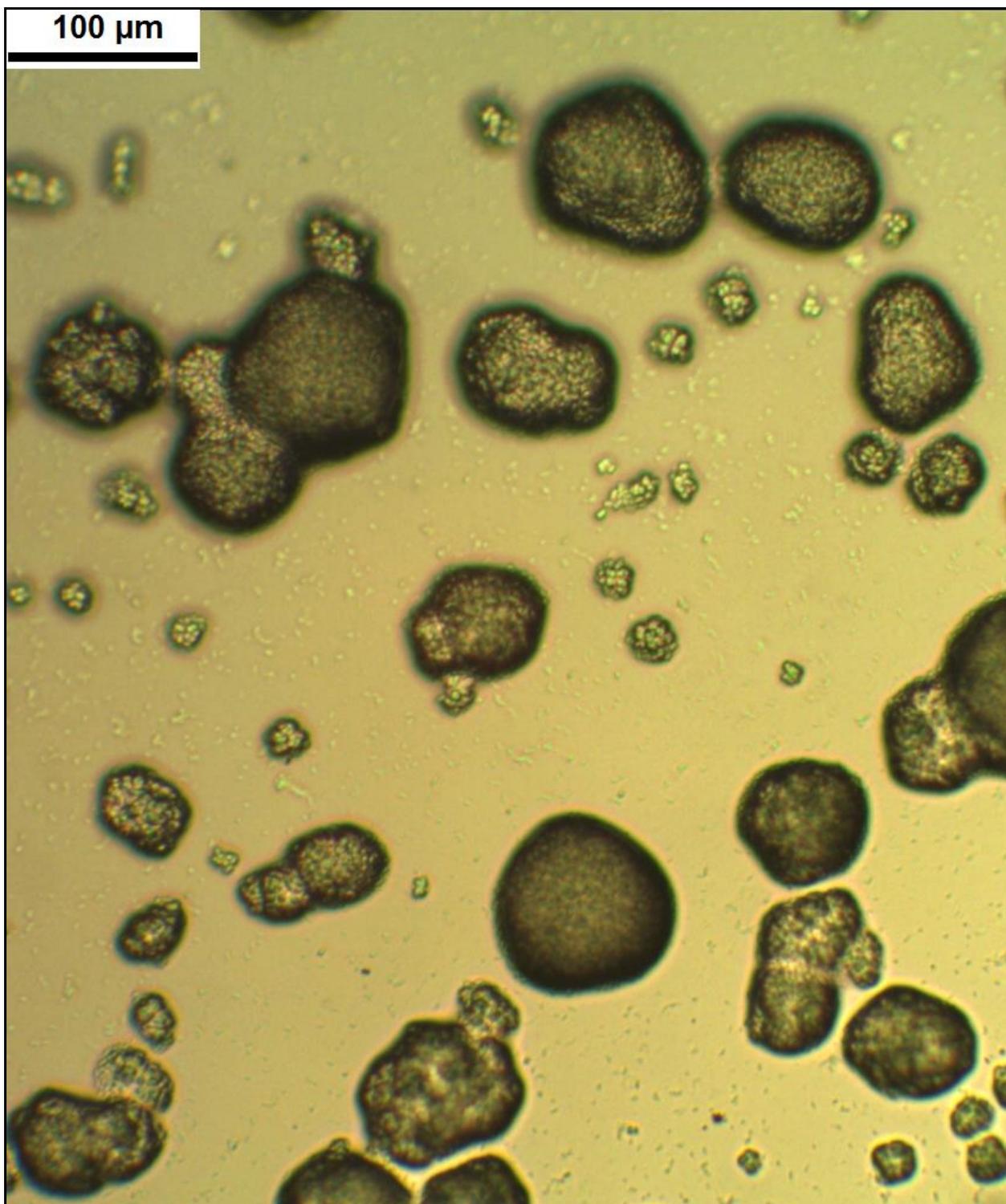


Рис. 5. Микроколонии штамма *A. macrocytogenes* OSV-2 в совместной культуре со штаммом *B. atrophaeus* B-13893 и в контрольном варианте; длина масштабной полоски 100 мкм

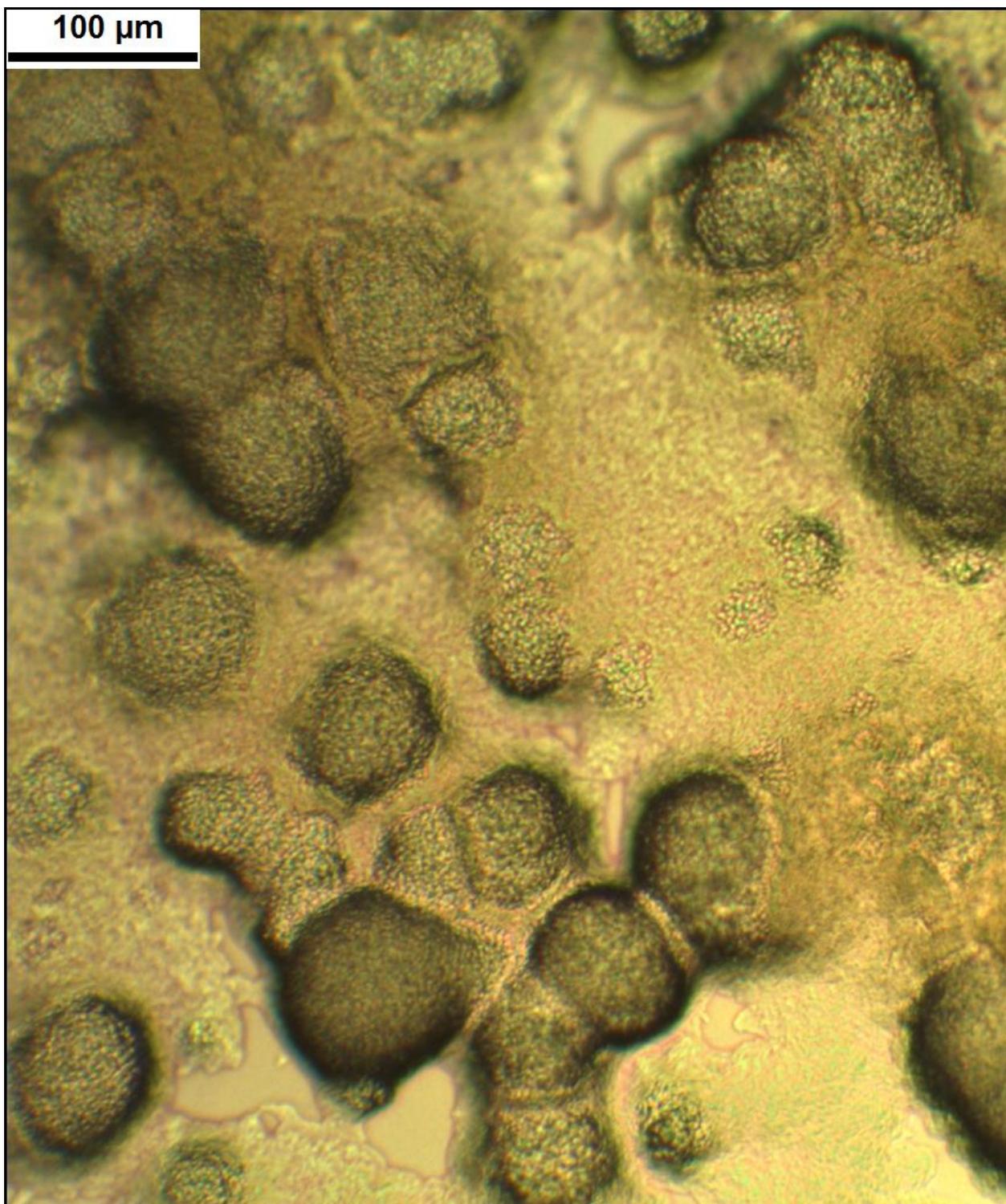


Рис. 6. Микроколонии штамма *A. macrocytogenes* OSV-2 в совместной культуре со штаммом *B. atrophaeus* B-13893; длина масштабной полоски 100 мкм

Несмотря на пониженное в сравнении с контролем число учитываемых на малом увеличении малоразмерных (менее 30 мкм в диаметре) микроколоний *A. macrocytogenes*

OSV-2 в совместной культуре со штаммом *B. atrophaeus* В-13893, эти колонии выявляются на большом увеличении (рис. 7).

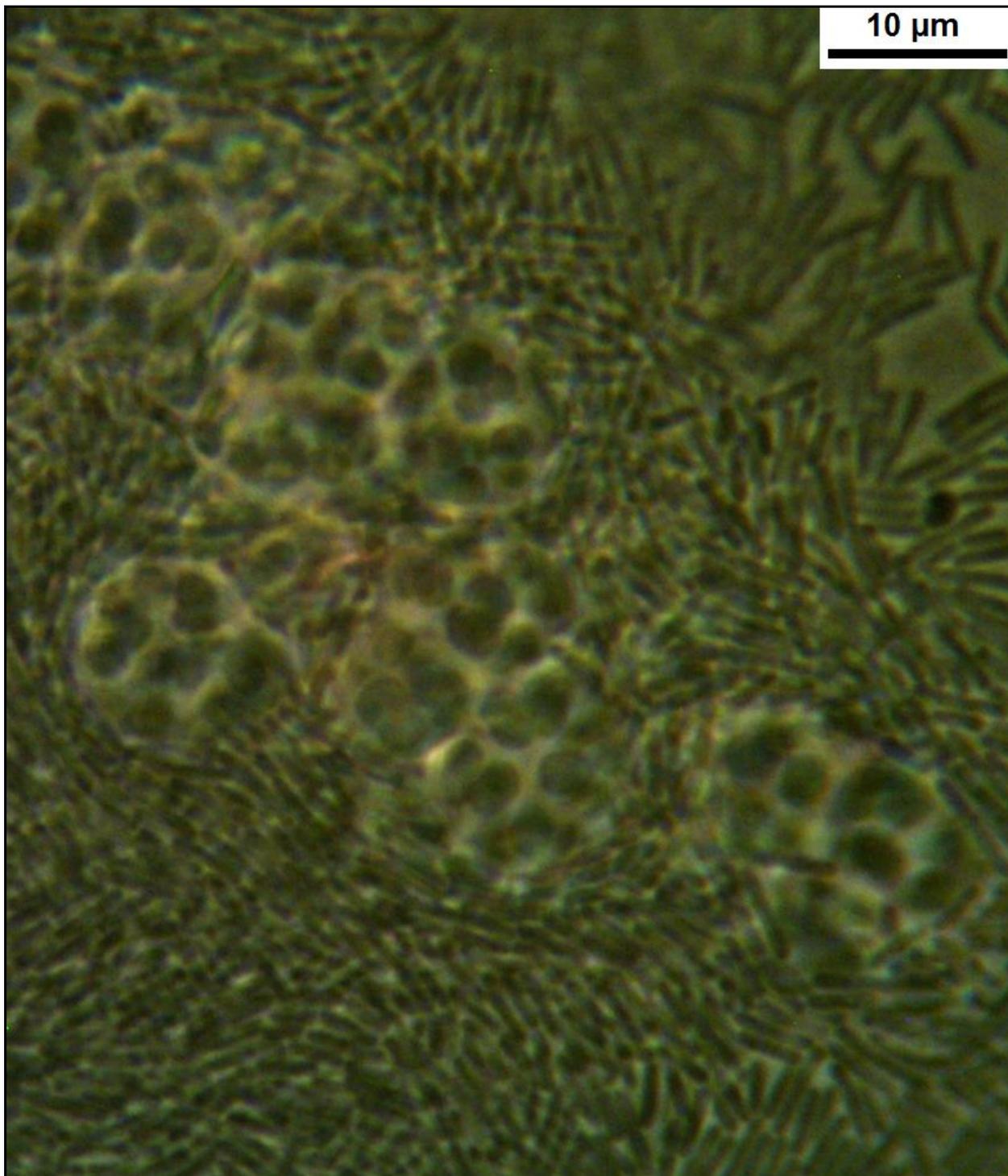


Рис. 7. Малоразмерные (менее 30 мкм в диаметре) микроколонии *A. macrocytogenes* OSV-2 в совместной культуре в окружении клеток *B. atrophaeus* В-13893

Таким образом, различия в распределении микроколоний *A. macrocytogenes* OSV-2 между контрольным и опытным вариантами по диаметру обусловлены тем, что в совместной культуре малоразмерные колонии *A. macrocytogenes* OSV-2 маскируются клетками *B. atrophaeus* В-13893. Исключение из статистической обработки колоний диаметром менее 30 мкм приводит к полному исчезновению различий между средним размером микроколоний штамма *A. macrocytogenes* OSV-2 в совместной культуре со штаммом *B. atrophaeus* В-13893 аналогичным показателем в контрольном варианте (табл. 2).

Таблица 2. Диаметр микроколоний (мкм) штамма *A. macrocytogenes* OSV-2 в совместной культуре со штаммом *B. atrophaeus* В-13893 и в контрольном варианте при исключении из обработки колоний диаметром менее 30 мкм

Показатель	Контроль	Совместная культура
Среднее	57,71± 4,75	57,85± 3,96
Стандартная ошибка	2,38	2,00
Медиана	52,84	52,95
Мода	-	44,28
Минимум	30,14	30,61
Максимум	120,15	148,77
Число измеренных колоний	73	122

Выводы

1. Оба протестированных штамма продемонстрировали отсутствие взаимного антагонизма и способность к росту в совместной культуре.

2. Азотфиксирующий штамм *A. macrocytogenes* OSV-2 может быть использован совместно со штаммом-антагонистом *B. atrophaeus* В-13893 в составе комплексного биопрепарата, предназначенного для улучшения азотного питания сельскохозяйственных растений при одновременной защите растений от комплекса фитопатогенных грибов.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» в рамках выполнения научных исследований и разработок по проекту № 2023030309439 «Разработка биопрепарата для защиты рапса от грибных болезней и стимулирования роста рапса в почвенно-климатических условиях Красноярского края».

Список использованных источников:

1. Soumare A., Diedhiou A.G., Thuita M., Hafidi M., Ouhdouch Y., Gopalakrishnan S., Kouisni L. Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture // Plants. - 2020. - 9(8). - URL: <https://doi.org/10.3390/plants9081011>
2. Aasfar A., Bargaz A., Yaakoubi K., Hilali A., Bennis I., Zeroual Y., Meftah Kadmiri I. Nitrogen Fixing Azotobacter Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability // Front. Microbiol. – 2021. - URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.628379/full>. DOI: [10.3389/fmicb.2021.628379](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628379)
3. Daniel A.I., Fadaka A.O., Gokul A., Bakare O.O., Aina O., Fisher S., Burt A.F., Mavumengwana V., Keyster M., Klein A. Biofertilizer: The Future of Food Security and Food Safety // Microorganisms. – 2022. – 10. – P. 1220. - URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061220>
4. Семькин В.А., Пигорев И.Я., Тарасов А.А., Глинушкин А.П., Плыгун С.А., Сычева И.И. Микробные препараты и регулятор роста как средства биологизации земледелия // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. - 2016. - Т. 11, № 59. - С.3-9.
5. Штерншис М.В., Беляев А.А., Цветкова В.П., Шпатова Т.В., Лемяк А.А., Бахвалов С.А. Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus* для управления здоровьем растений. - Новосибирск: СО РАН, 2016. - 284 с.
6. O'Brien P.A. Biological control of plant diseases // Australasian Plant Pathology. - 2017. - Vol. 46. - № 4. - P. 293-304.
7. Овсянкина С.В., Хижняк С.В., Аболенцева П.А., Смольникова Я.В., Олейникова Е.Н. Новая лиопротекторная среда для лиофилизации несимбиотических азотфиксирующих бактерий, перспективных для производства биоудобрений // Вестник КрасГАУ. - 2022. - № 12. - С. 54–61. DOI: [10.36718/1819-4036-2022-12-54-61](https://doi.org/10.36718/1819-4036-2022-12-54-61).
8. Патент RU 2791332 С1 Штамм бактерий *Bacillus atrophaeus* В-13893 для получения биопрепарата против возбудителей грибных болезней сои. Опубликовано: 07.03.2023 Бюл. № 7. Дата начала отсчета срока действия патента: 15.02.2022.

Цитирование:

Родовиков С.А., Хижняк С.В., Овсянкина С.В., Аболенцева П.А. Совместное культивирование азотфиксирующего штамма *Azomonas macrocytogenes* и штамма-антагониста *Bacillus atrophaeus* [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2023. – № 4. – Режим доступа: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2023/4/st_429.pdf. DOI: <https://doi.org/10.51419/202134429>.