

В.А. Бабак, Е.Ж. Жакупов, И.А. Пунтус, А.К. Мухамеджанов, Б. Ергазы, А.Г.Мертасов

Товарищество с ограниченной ответственностью «BIOTRON Progress», Степногорск, Казахстан

(E-mail: vgavm2003@mail.ru, zhakupov_bio@mail.ru, puntusira@mail.ru, mk-aslan@mail.ru, bergengul_pvl@mail.ru, mertassov@mail.ru)

Конструирование биологического удобрения на основе азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих бактерий

Аннотация: В статье приведены описание оптимальных параметров глубинного суспензионного культивирования штаммов *Raoultella oxytoca* 15MS и *Serratia plymuthica* 35MS, технологии их масштабирования. Изучены азотфиксирующие свойства штамма *R. oxytoca* 15MS методом ПЦР и определены фосфатмобилизирующие свойства штамма *S. plymuthica* 35MS на селективной питательной среде. Дана оценка биоудобрения по физико-химическим и биологическим показателям, изучена его стабильность (титр энтеробактерий через 6 месяцев хранения остается на уровне экологически значимой величины (от 22,0 до 36,0 млн КОЕ/мл).

Ключевые слова: ризобактерии, азотфиксирующие бактерии, фосфатмобилизирующие бактерии, биологическое удобрение, плодородие, почва, культивирование.

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2020-130-1-14-22>

Введение. Почва – основное средство сельскохозяйственного производства. Присущее ей свойство - плодородие - широко используется в практике для производства всех необходимых человеку видов сельскохозяйственной продукции. При использовании почвы её плодородие снижается, поскольку для производства растениеводческой продукции расходуются органические вещества и элементы минерального питания, ухудшаются условия водно-воздушного режима и другие параметры.

Особенностью развития современного сельского хозяйства является необходимость наращивания производства сельскохозяйственной продукции и восстановление почвенного плодородия.

Экономический и экологический кризис, снижение качества продукции растениеводства, падение естественного плодородия почв обуславливают всевозрастающее внимание к биологическому земледелию, суть которого заключается в использовании потенциальных возможностей естественных экосистем, в частности, почвенных микроорганизмов [1, 2].

Микрофлора почвы оказывает непосредственное влияние на её плодородие и состав и, как следствие, на урожайность растений. Почвенные микроорганизмы в процессе роста и развития улучшают структуру почвы, накапливают в ней питательные вещества, минерализуют различные органические соединения, превращая их в легко усвояемые растениями компоненты питания. Для стимуляции этих процессов применяют различные бактериальные удобрения с полезными микроорганизмами, обогащающими ризосферный слой почвы, прилегающий к корням растения, питательными веществами. Микроорганизмы, используемые для производства бактериальных препаратов, способствуют снабжению растений не только элементами минерального питания (азотом и фосфором), но и физиологически активными веществами (фитогормонами, витаминами и др.) [3,4]. Положительное действие многих биопрепаратов также обусловлено их фитосанитарной функцией – за счет вытеснения патогенных почвенных микроорганизмов и ингибирования их размножения.

Почвенная микрофлора разлагает органические субстанции и разрабатывает ценные формы гумуса в глубинных слоях земли. Жизненные процессы в почве играют ключевую роль для ее строения, плодородия, роста и развития растений.

Самую обширную и разнообразную по своим свойствам группу почвенных микроорганизмов представляют свободноживущие и симбиотические азотфиксирующие бактерии. Они способны

усваивать азот атмосферы посредством ассоциативных связей с корневой системой или наземной вегетативной частью растений злаковых, пасленовых и др. семейств [5].

Фосфор, как известно, является одним из важнейших биогенных элементов, при участии которого в животных и растительных организмах протекают процессы синтеза нуклеиновых кислот, белков, углеводов и осуществляется энергетический обмен. И одновременно фосфор является основным лимитирующим элементом питания для растений в почве. Недостаток фосфора в ранний период развития растения уже нельзя будет компенсировать обильным фосфорным питанием в последующие фазы роста [6]. Фосфатмобилизирующие микроорганизмы почвы способствуют растворению труднодоступных неорганических и органических фосфатов до усвояемых растениями водорастворимых форм.

Разнообразные биохимические процессы, протекающие в почве, обусловлены, прежде всего, жизнедеятельностью многочисленной армии микроорганизмов. Между микрофлорой почвы и растениями эволюционно сформировались сложные взаимоотношения как симбиотического, так и антогонистического характера [7]. Симбиоз между растениями и почвенными бактериями имеет в основном трофическую природу. Растения, выделяя через корни различные специфические органические соединения, способствуют формированию определенного типа микробиоценоза в зоне своей ризосферы. Жизнедеятельность микроорганизмов, в свою очередь, в значительной степени определяет режим корневого питания растений, их устойчивость к заболеваниям и неблагоприятным условиям среды, а в конечном итоге – урожайность [8].

Экспериментально установлено, что азот, фиксированный микроорганизмами, на 100% усваивается растениями, в то время как азот минеральных удобрений – всего на 50%. Помимо этого, биологический азот практически бесплатный, так как бактерии для осуществления азотфиксации используют энергию органических веществ, синтезированных растениями в процессе фотосинтеза [9].

Цель исследований. Целью наших исследований являлось конструирование и комплексная оценка комбинированного биологического удобрения для повышения плодородия почв на основе фосфатмобилизирующих и азотфиксирующих бактерий и масштабирование технологии его производства.

Методы исследований. Объектами исследований являлись штаммы бактерий *Raoultella Oxytoca* 15MS (азотфиксирующий компонент, АФК) и *Serratia Plymuthica* 35MS (фосфатмобилизирующий компонент, ФМК) из музейной коллекции ТОО «BIOTRON GROUP».

Для получения посевного материала использовали агаризованные плотные питательные среды. При накоплении микроорганизмов в большом количестве использовали жидкие питательные среды для пилотного и промышленного масштабирования.

Для сравнительной оценки культивирования азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих бактерий использовали несколько вариантов жидкой питательной среды. Базовыми вариантами являлись среды:

- среда Эшби с мелассой;
- среда кукурузно-меласная жидкая;
- бобовая среда жидкая.

Морфологическую оценку культивируемых штаммов проводили в световом микроскопе ZeissStandart 25 с темнопольной и фазово-контрастной приставкой.

Оптимизацию компонентного состава питательной среды и режимов культивирования (температура, аэрация, инокулят, pH и др.) проводили традиционными микробиологическими и биохимическими методами, основанными на законах, описывающих протекание фундаментальных процессов микробиосинтеза - накопление биомассы, изменение содержания компонентов питательной среды, прохождение физиологических фаз в периодической культуре.

Масштабирование производственных культур проводили в ферментерах объемом 120, 630 и 5000 литров, с использованием режимов раздельного и совместного культивирования.

Подсчет количества выросших колоний производили после 72 часового выращивания культуры в термостате при температуре $29 \pm 1^\circ \text{C}$, а также на всех этапах масштабирования процесса.

Оценку качества биоудобрения проводили по органолептическим, физико-химическим и микробиологическим показателям в соответствии с требованиями стандарта организации.

Оценку выживаемости фосфатмобилизирующих и азотфиксирующих бактерий проводили в нескольких температурных режимах при хранении до 6-ти месяцев.

Результаты исследований. Пересев культуры производили в пробирки с остывшим скопленным агаром с кукурузно-меласной средой из пробирок с рабочей культурой бактерий, после чего засеянные пробирки выдерживали в термостате при температуре $+(28 \pm 1)^\circ \text{C}$ в течение 2-3-х суток.

Стеклянные колбы-качалки со стерильной питательной средой засеивали свежей 2-3-х суточной рабочей культурой бактерий *R. Oxytoca* 15MS и *S. Plymuthica* 35MS из пробирок.

Подбор оптимальной среды выращивания, обеспечивающей высокий титр исследуемых микроорганизмов, проводили в процессе отдельного суспензионного культивирования монокультур штаммов на лабораторной термостатируемой качалке. На рисунке 1 представлены данные роста на 3-х питательных средах (среда Эшби с мелассой жидкая, среда кукурузно-меласная жидкая, бобовая среда жидкая) при внесении 10% инокулюма от объема среды, при температуре $+(28 \pm 0,5)^\circ \text{C}$, скорости вращения качалки – (190 ± 25) об./мин, времени культивирования – 48 часов.

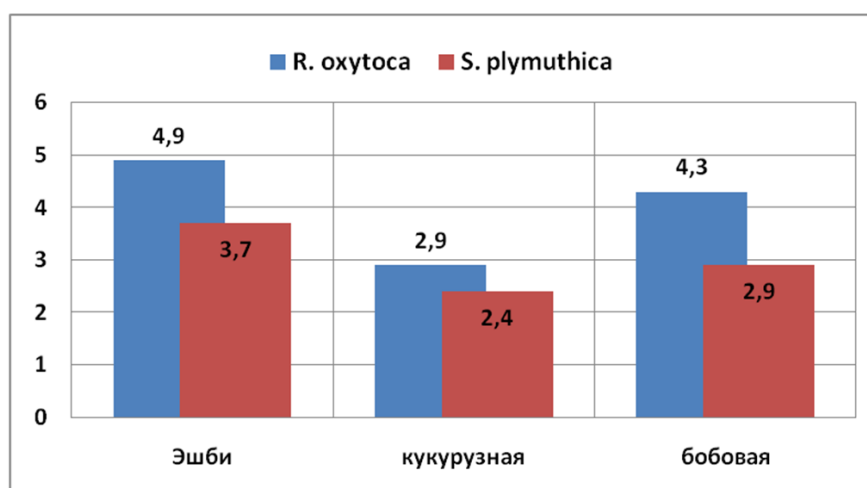


Рисунок 1 – Динамика численности *R. Oxytoca* 15MS и *S. plymuthica* 35MS в процессе отдельного глубинного культивирования в жидких средах

Результаты эксперимента, приведенные на рисунке 1, свидетельствуют, что все испытанные среды пригодны для выращивания микроорганизмов. Более высокие титры культур обеспечивала среда Эшби с мелассой, в которой число жизнеспособных клеток *R. Oxytoca* 15MS через двое суток культивирования в 1,6 раза выше, чем в кукурузно-меласной среде. Аналогичная тенденция выявлена и для *S. plymuthica* 35MS: титр биоагента в среде Эшби с мелассой превышает таковой в двух других средах в среднем в 1,4 раза. Бобовая среда показывала удовлетворительные результаты по накоплению обоих штаммов, однако ее закисление происходило быстрее, чем в других вариантах. Поэтому дальнейшая экспериментальная работа была продолжена с использованием среды Эшби с мелассой, с некоторым ее обогащением.

Инокулят для загрузки производственных штаммов в биоферментеры накапливали в 3-х литровых металлических колбах на жидкой питательной среде Эшби с мелассой, при температуре $+(28 \pm 0,5)^\circ \text{C}$, скорости вращения качалки – (160 ± 20) об./мин, времени культивирования – 48 часов, объем заполнения колбы – 35-40%.

Качество посевного биоматериала является важным параметром успеха суспензионного глубинного культивирования штаммов *R. Oxytoca* 15MS и *S. plymuthica* 35MS, как при раздельном так и при смешанном их глубинном культивировании.

При оценке качества посевного материала использовали и контролировали следующие параметры микробиологического контроля:

- определение чистоты раскладки – контаминация не допускается;
- типоспецифичность роста на селективных питательных средах (оценка морфологии используемых культур на среде "мясо-сусловый агар" и среде "глюкозо-аспарагиновый агар");
- определение концентрации посевного материала (титр жизнеспособных клеток, не менее КОЕ/мл);
- определение азотфиксирующих свойств штамма *R. oxytoca*15MS;
- определение фосфатмобилизирующих свойств штамма *S. plymuthica* 35MS.

Культивирование ризобактерий в опытно-промышленных условиях. Раздельное глубинное культивирование продуцентов комплексного биоудобрения проводили в биоферментерах объемом 120 и 630 л при следующих условиях: среда культивирования – Эшби с мелассой, объем инокулюма – от 5 до 15% объема среды, интенсивность аэрации – 1,0-1,5 л воздуха/л среды/мин, скорость вращения мешалки – 180-220 и 120-160 об/мин, соответственно, температура- $+(29 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$, исходный pH среды – 6,5–7,0, оптимальное поддержание pH - на уровне 6,7-7,0 единиц; количество растворенного кислорода -DO2 – 12-18%; контроль пенообразования – не более 4-6 см (PID коррекция); режим коррекции- pH и DO в ручном и PID параметрах. Длительность культивирования – 48 часов. При обильном пенообразовании вносится пеногаситель пропиол Б-400. В процессе культивирования через каждые 12 часов стерильно отбирали пробы для определения титра жизнеспособных клеток бактерий и контроля контаминирующей микрофлоры (таблица 1).

Таблица 1 – Численность продуцентов при раздельном глубинном культивировании *Raoultella oxytoca*15MS и *Serratia plymuthica* 35MS в биоферментере объемом 120 л

Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл			
	<i>R. oxytoca</i> 15MS (АФК комплексного биоудобрения)		<i>S. plymuthica</i> 35MS (ФМК комплексного биоудобрения)	
	продуцент	контаминация	продуцент	контаминация
0	$(8,36 \pm 0,34) \times 10^7$	отсутствуют	$(4,10 \pm 0,47) \times 10^7$	отсутствуют
12	$(3,85 \pm 0,51) \times 10^8$		$(1,53 \pm 0,13) \times 10^8$	
24	$(1,32 \pm 0,23) \times 10^9$		$(1,90 \pm 0,25) \times 10^9$	
36	$(4,01 \pm 0,48) \times 10^9$		$(4,46 \pm 0,70) \times 10^9$	
48	$(7,31 \pm 0,34) \times 10^9$		$(6,55 \pm 0,39) \times 10^9$	

Высокие титры продуцентов получены через 48 часов культивирования, их значения составили 7,31млрд (*Raoultella oxytoca* 15MS) и 6,5 млрд КОЕ/мл (*Serratia plymuthica* 35MS) при культивировании в ферментере объемом 120 л. Активность производственных штаммов в ферментере объемом 630 л через 48 часов культивирования составила $5,89$ и $4,63 \times 10^9$ КОЕ/мл соответственно.

Нами установлен нижний предел титра жизнеспособных клеток ассоциативного diaзотрофа *R. oxytoca* 15MS в АФК не менее 4,1 млрд КОЕ/мл, фосфатмобилизующего гетеротрофа *S. plymuthica* 35MS в ФМК – не менее 4,2 млрд КОЕ/мл. Содержание контаминирующей микрофлоры – не выше $1,0 \cdot 10^4$ КОЕ/мл.

Нами было проведено усовершенствование параметров суспензионного пилотного глубинного культивирования фосфатмобилизующего штамма *Serratia plymuthica* 35MS. В результате проведенных работ была подобрана оптимальная схема загрузки пилотного биоферментера и параметры культивирования микроорганизмов в режиме продленного непрерывного культивирования с подпиткой и последующим масштабированием процесса в этом же биоферментере. Рациональный объем предзагрузки емкости составляет 20-25 литров

с количеством посевного материала 2,5-3,5 литра. В процессе роста культуры объем ростовой питательной среды доводится до 30-35 литров в течение 24-36 часов, а через 24-36 часов проводится кратное увеличение до 95-100 литров и продолжается до 36-48 часов. Необходимость корректировки посевного биоматериала до 12-15% связана с менее интенсивным ростом культуры *S. plymuthica* 35MS.

Применение в производственном цикле непрерывной продленной методики глубинного суспензионного накопления позволит сократить время культивирования в колбах-качалках, снизить объем гетерогенной раскладки и риски ее контаминации, позволит получать чистую однородную раскладку в достаточном количестве, с поддержанием оптимальных параметров роста культуры.

АФК и ФМК комплексного биоудобрения, полученные при раздельном культивировании бактерий, смешивали в соотношении 1:1. Для этого АФК и ФМК стерильным воздухом перекачивали из ферментеров в стерильный накопительный реактор для готового жидкого комплексного биоудобрения. После составления серии препарата и тщательного перемешивания с одновременным охлаждением продукта проводили фасовку через дозирующее устройство с соблюдением правил асептики в ПЭТ-бутылки емкостью 10, 20 и 30 дм³.

Оценка комплексного биоудобрения. Комплексное жидкое биологическое удобрение на основе фосфатмобилизирующих и азотфиксирующих бактерий должно соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблице 2.

Таблица 2 – Основные показатели комплексного жидкого биоудобрения

Наименование показателя	Характеристика и значение
Внешний вид	жидкость
Запах	специфический
Цвет	светло-коричневый
Титр жизнеспособных клеток <i>R. oxytoca</i> 15MS, КОЕ/мл, не менее	$4,1 \cdot 10^9$
Титр жизнеспособных клеток <i>S. plymuthica</i> 35MS, КОЕ/мл, не менее	$4,2 \cdot 10^9$
Общий титр жизнеспособных клеток <i>R. oxytoca</i> 15MS и <i>S. plymuthica</i> 35MS, КОЕ/мл, не менее	$4,3 \cdot 10^9$
Количество контаминирующих микроорганизмов, КОЕ/мл, не более	$1,0 \cdot 10^4$

Сконструированное нами комплексное жидкое биологическое удобрение соответствует нормам и характеристикам, заявленным в таблице 2, а по показателям биологической активности (титр клеток) превосходит минимальные значения.

На рисунке 2 представлена типоспецифичность роста *R. oxytoca*15MS и *S. plymuthica* 35MS на селективных питательных средах.

Штамм *R. oxytoca* 15MS – грамотрицательный факультативный анаэроб. На плотной питательной среде "мясо-сусловый агар (МСА)" форма колоний округлая, поверхность гладкая, цвет бежевый, размеры крупные (диаметр более 4 мм). Морфологические признаки штамма (фазово-контрастная микроскопия): клетки имеют палочковидную форму, размеры 0,5–0,6 x 1,2–1,5 мкм, неподвижны, окружены капсулой.

Штамм *S. plymuthica* 35MS – грамотрицательный факультативный анаэроб. Морфология колоний на МСА: на 2–3 сутки роста кремовые, слизистые, непрозрачные, блестящие, выпуклые, край колоний ровный. Морфология клетки (фазово-контрастная микроскопия): прямые палочки, диаметр 0,5–0,8 x 0,9–2,0 мкм.

Определение азотфиксирующих свойств штамма R. oxytoca 15MS проводили в ПЦР. Для получения ПЦР-фрагмента гена *nifH* использованы праймеры *nifH*-1F и *nifH*-1R. Продукты ПЦР анализировали с помощью гель-электрофореза – рисунок 3.

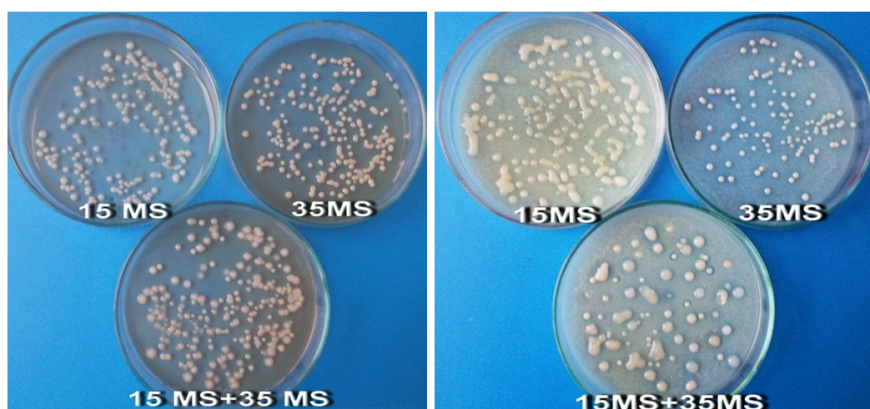


Рисунок 2 – Типоспецифичность роста *R. oxytoca* 15MS и *S. plymuthica* 35MS на селективных средах среда МСА (слева), ГАА (справа), разведение 10^{-6}

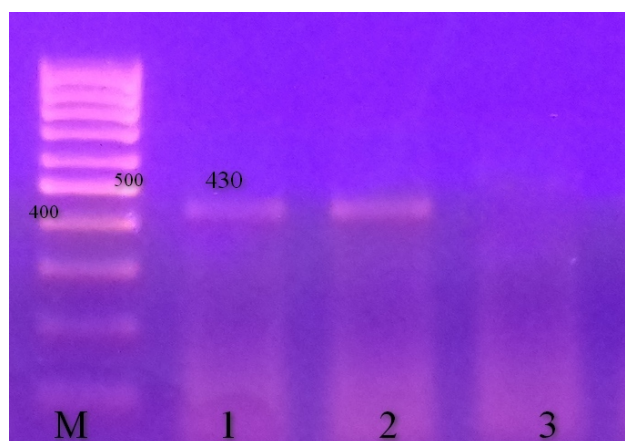


Рисунок 3 – М – маркер молекулярной массы ДНК (100 bp), 1 – *Rhanella aquatilis* БИМ В-704Д (положительный контроль); 2 – *Raoultella oxytoca* 15MS; 3 – *E. coli* XL-Blue (отрицательный контроль)

Амплификация участка гена с использованием праймеров nifH-1F и nifH-1R показала, что специфический ПЦР-продукт размером ~ 430 п.о. есть у штамма *Raoultella oxytoca* 15MS, а у контрольного штамма *E. coli* XL-Blue – отсутствует. Исходя, из полученных данных, можно утверждать, что проверяемый штамм *Raoultella oxytoca* 15MS является азотфиксатором.

Определение фосфатмобилизирующих свойств штамма S. plymuthica 35MS. Изучение свойств фосфатрастворяющих бактерий проводили чашечным методом на агаризованной среде, предложенной Муромцевым. Метод основан на образовании зон «гало» вокруг колоний микроорганизмов, колонии которых образовывали зоны окисления при растворении фосфатов кальция – их считали фосфатмобилизирующими – рисунок 4.

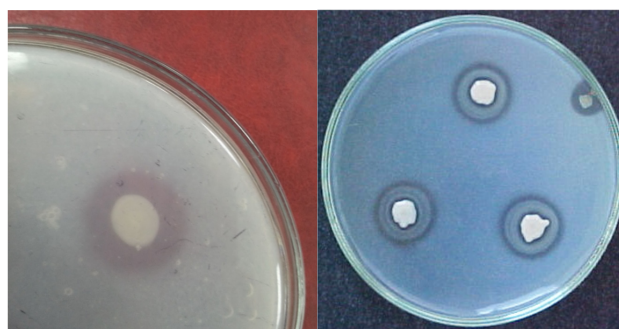


Рисунок 4 – Растворение фосфатов кальция (слева), железа (справа) в виде зоны «гало» (просветление агар) вокруг колоний штамма *S. plymuthica* 35MS

Диаметр зон «гало» вокруг колоний изолятов *S. plymuthica* 35MS достигал 3–10 мм. При этом изолят 35MS растворял фосфат кальция наиболее активно (8,2–10,5 мм), чем другие изучаемые нами штаммы (3,0–5 мм).

Таким образом, установлено, что чистая культура изолята 35MS солибилизовала труднорастворимые фосфаты кальция и железа, что подтверждает активные фосфатмобилизующие свойства штамма *S. plymuthica* 35MS.

Оценка стабильности препарата. Важным критерием эффективного использования микробных препаратов и биоудобрений является выживаемость их компонентов при хранении. Динамика выживаемости бактерий – компонентов комплексного биоудобрения жидкого в течение 6-ти месяцев хранения в холодном помещении при температуре $+(4-8)^{\circ}\text{C}$ представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Выживаемость *R. oxytoca* 15MS и *S. plymuthica* 35MS в составе комплексного биоудобрения жидкого (хранение при $t + 4-8^{\circ}\text{C}$)

Длительность хранения, мес.	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл		
	<i>R. oxytoca</i> 15MS	<i>S. plymuthica</i> 35MS	<i>R. oxytoca</i> 15MS + <i>S. plymuthica</i> 35MS
0	$(5,22 \pm 0,18) \cdot 10^9$	$(4,84 \pm 0,39) \cdot 10^9$	$(4,85 \pm 0,27) \cdot 10^9$
1	$(2,86 \pm 0,05) \cdot 10^9$	$(2,30 \pm 0,12) \cdot 10^9$	$(2,75 \pm 0,14) \cdot 10^9$
3	$(4,75 \pm 0,21) \cdot 10^8$	$(4,10 \pm 0,17) \cdot 10^8$	$(5,60 \pm 0,15) \cdot 10^8$
6	$(2,80 \pm 0,69) \cdot 10^7$	$(2,20 \pm 0,81) \cdot 10^7$	$(3,60 \pm 0,37) \cdot 10^7$

Как следует из приведенных в таблице данных, в течение 30 суток хранения комплексного биоудобрения жидкого при пониженной температуре общий титр продуцентов в нем снизился в 1,76 раза (в монокультуре *R. oxytoca* 15MS – в 1,8, *S. plymuthica* 35MS – в 2,1 раза). Спустя три месяца хранения численность продуцентов в монокультуре и общая численность *R. oxytoca* 15MS и *S. plymuthica* 35MS в комплексном биоудобрении жидком снизилась в среднем на 1 порядок и составила 4750, 410 и 560 млн КОЕ/мл соответственно. Через полгода хранения титр энтеробактерий остается на уровне экологически значимой величины (от 22,0 до 36,0 млн КОЕ/мл). Контаминирующая микрофлора в препарате, хранившемся при пониженной температуре, не обнаруживалась.

Полученные данные свидетельствуют о высоком биотехнологическом потенциале *R. oxytoca* 15MS и *S. plymuthica* 35MS в плане их выживаемости, что позволяет использовать комплексное биоудобрение жидкое по назначению после его хранения в течение 3 месяцев при низкой температуре.

Закключение.

1. Подобрана питательная среда Эшби с мелассой для культивирования штаммов *Raoultella oxytoca* 15MS и *Serratia plymuthica* 35MS в лабораторных и производственных условиях, которая позволяет накапливать не менее $4,1 \times 10^9$ КОЕ/мл каждого штамма.
2. Отработаны оптимальные параметры глубинного суспензионного культивирования производственных штаммов *Raoultella oxytoca* 15MS и *Serratia plymuthica* 35MS и технология их масштабирования и составления.
3. Проведена оценка комплексного биоудобрения по физико-химическим и биологическим показателям, изучены морфологические признаки используемых штаммов и

- типоспецифичность роста *R. Oxytoca* 15MS и *S. plymuthica* 35MS на селективных питательных средах "мясо-сусловый агар" агар и "глюкозо-аспарагиновый агар".
4. Изучены азотфиксирующие свойства штамма *R. oxytoca* 15MS методом в ПЦР по ПЦР-фрагменту гена *nifH*. Проведено определение фосфатмобилизирующих свойств штамма *S. plymuthica* 35MS на селективной питательной среде с выявлением зон «гало» вокруг колоний изолятов *S. plymuthica* 35MS.
 5. Изучена стабильность показателей биоудобрения при хранении в течение 1-6 месяцев. Через полгода хранения титр энтеробактерий остается на уровне экологически значимой величины (от 22,0 до 36,0 млн КОЕ/мл). Полученные данные о выживаемости бактерий свидетельствуют об оптимальном сроке хранения биоудобрения в течение 3 месяцев при низкой температуре.
 6. Сконструированные образцы комбинированного биологического удобрения для повышения плодородия почв на основе фосфатмобилизирующих и азотфиксирующих бактерий будут испытаны в лабораторных и полевых условиях на различных сельскохозяйственных культурах при различных схемах применения и обработки.

Список литературы

- 1 Терещенко Н.Н. Биоудобрение на основе микроорганизмов: учебное пособие. -Томск.: Томский государственный университет, 2003. –60 с.
- 2 Сытников Д.М. Биотехнология микроорганизмов азотфиксаторов и перспективы применения препаратов на их основе // Биотехнология. -2012. -Т. 5. -№ 4. -С. 34-45.
- 3 Кретович В.Л. Биохимия усвоения азота воздуха растениями. -М.: Наука, 1994. 168 с.
- 4 Игнатов В.В. Биологическая фиксация азота и азотфиксаторы // Сорос. образоват. журн. -1998. -№ 9. -С. 28-33.
- 5 Пацко Е.В., Воробей Н.А., Паршикова Т.В., Коць С.Я. Перспективность использования ассоциаций азотфиксирующих микроорганизмов для повышения урожайности растений // Бюл. Моск. общ. исп. прир. - Москва, 2009. -Т. 114, вып. 2. -С. 84-86 .
- 6 Злотников А.К., Алёхин В.Т., Андрианов, А.Д. Биопрепарат Альбит для повышения урожая и защиты растений: опыты, рекомендации, результаты применения. - М.: ООО Издательство "Альбит" , 2008. - 248 с.
- 7 Швартау В.В., Гуляев Б.И., Карлова А.Б. Особенности реакции растений на дефицит фосфора // Физиология и биохимия культурных растений -2009. -Т. 41. -№ 3. -С. 208-212.
- 8 Park J., Bolan N., Mallavarapu M. Enhancing the solubility of insoluble phosphorus compounds by phosphate solubilizing bacteria // 19-th World Congress of Soil Science, Brisbane, Australia, 2010. - Brisbane, 2010. -P.65-68.
- 9 Strom P.F. Effect of Temperature on Bacterial Species Diversity in Thermophilic Solid-Waste Composting // Applied and Environmental Microbiology. –1985. –Т. 50. –№4. –Р. 899-905.
- 10 Strom P.F. Identification of Thermophilic Bacteria in Solid-Waste Composting // Applied and Environmental Microbiology. –1985. –Т. 50. –№4. –Р. 906-913.

В.А. Бабак, Е.Ж. Жакупов, И.А. Пунтус, А.К. Мухамеджанов, Б. Ергазы, А.Г.Мертасов

«BIOTRON Progress» Жауапкершілігі шектеулі серіктестігі, Степногорск, Қазақстан

Азотфиксациялайтын және фосфатмобилизациялайтын бактериялар негізінде биологиялық тыңайтқыштарды құрастыру

Аннотация. Мақалада *Raoultella oxytoca* 15MS және *Serratia plymuthica* 35MS штамдарын терең суспензиялық өсірудің оңтайлы параметрлерінің сипаттамасы, оларды масштабтау технологиясы келтірілген. ПЦР әдісімен *R. oxytoca* 15MS штаммының азотфиксациялаушы қасиеттері зерттелді және селективті қоректік ортада *S. plymuthica* 35MS штаммының фосфатмобилизациялаушы қасиеттері анықталды. Физикалық-химиялық және биологиялық көрсеткіштер бойынша биотыңайтқышқа баға берілді, оның тұрақтылығы зерттелді (энтеробактерияның титрі 6 айдан кейін экологиялық маңызды шама деңгейінде қалады (22,0-ден 36,0 млн КОЕ/мл-ге дейін).

Түйін сөздер. ризобактериялар, азотфиксациялаушы бактериялар, фосфат мобилизациялайтын бактериялар, биологиялық тыңайтқыш, құнарлылық, топырақ, өсіру.

V. A. Babak, E. Zh. Zhakupov, I. A. Puntus, A. K. Mukhamedzhanov, B. Ergazy, A.G. Mertassov

«BIOTRON Progress» Limited liability company, Stepnogorsk, Kazakhstan

Construction of biological fertilizer based on nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing bacteria

Abstract. The article describes the optimal parameters of deep suspension cultivation of *Raoultella oxytoca* 15MS and *Serratia plymuthica* 35MS strains, and their scaling technology. The nitrogen-fixing properties of the *Raoultella oxytoca* 15MS strain were studied by PCR and the phosphate-stabilizing properties of the *S. plymuthica* 35MS strain were determined on a selective nutrient medium.

The assessment of biofertilizer by physical, chemical and biological parameters was given, its stability was studied (the titer of enterobacteria after 6 months of storage remains at the level of an environmentally significant value (from 22.0 to 36.0 million CFU/ml).

Keywords. rhizobacteria, nitrogen-fixing bacteria, phosphate-mobilizing bacteria, biological fertilizer, fertility, soil, cultivation.

References

- 1 Tereshhenko N.N. Bioudobrenie na osnove mikroorganizmov [Bio-fertilizer based on micro-organisms]. Textbook (Tomsk state University, Tomsk, 2003, 60 p.).[in Russian].
- 2 Sytnikov D.M. Biotehnologija mikroorganizmov azotfiksatorov i perspektivy primeneniya preparatov na ih osnove [Biotechnology of nitrogen fixing microorganisms and prospects for the use of drugs based on them], Biotehnologija [Biotechnology] , 5(4), 34-45(2012).
- 3 Kretovich V.L. Biohimija usvoeniya azota vozduha rastenijami [Biochemistry of air nitrogen assimilation by plants] (Nauka, Moscow, 1994, 168 p.).[in Russian].
- 4 Ignatov V.V. Biologicheskaja fiksacija azota i azotfiksatory [Biological nitrogen fixation and nitrogen-fixing bacteria], Soros. obrazovat. zhurn. [Soros. educated. journal], (9), 28-33 (1998).
- 5 Packo E.V., Vorobej N.A., Parshikova T.V., Koc' S.Ja. Perspektivnost' ispol'zovaniya asociacij azotfiksirujushih mikroorganizmov dlja povysheniya urozhajnosti rastenij [Prospects for using associations of nitrogen-fixing microorganisms to increase plant productivity]. Bjul. Mosk. obshh. isp. prir. [Bulletin of the Moscow society of nature testers. Department of biology], Volume 14. Issue 2. P.84-86.
- 6 Zlotnikov A.K., Aljohin V.T., Andrianov, A.D. Biopreparat Al'bit dlja povysheniya urozhaja i zashhity rastenij: opyty, rekomendacii, rezul'taty primeneniya [Biopreparation Albit for yield increase and plant protection: experiences, recommendations, results of application] (Izdatel'stvo Agrorus, Moscow, 2008, 248 p.).
- 7 Shvartau V.V., Guljaev B.I., Karlova A.B. Osobennosti reakcii rastenij na deficit fosfora [Features of plants' reaction to phosphorus deficiency], Fiziologija i biohimija kul'turnyh rastenij [Physiology and biochemistry of cultivated plants], 3(41), 208-212(2009).
- 8 Park J., Bolan, N., Mallavarapu, M. Enhancing the solubility of insoluble phosphorus compounds by phosphate solubilizing bacteria. 19-th World Congress of Soil Science (Brisbane, Australia, 2010, P. 65-68).
- 9 Strom P.F. Effect of Temperature on Bacterial Species Diversity in Thermophilic Solid-Waste Composting, Applied and Environmental Microbiology, 50(4), 899-905(1985).
- 10 Strom P.F. Identification of Thermophilic Bacteria in Solid-Waste Composting, Applied and Environmental Microbiology, 50(4), 906-913(1985).

Сведения об авторах:

Бабак В.А. - кандидат ветеринарных наук, инженер-технолог, ТОО "BIOTRON Progress", Промышленная зона 4, комплекс 7, Степногорск, Казахстан.

Жакупов Е.Ж.- руководитель проекта, ТОО "BIOTRON Progress", Промышленная зона 4, комплекс 7, Степногорск, Казахстан.

Пунтус И.А.- исследователь, ТОО "BIOTRON Progress", Промышленная зона 4, комплекс 7, Степногорск, Казахстан.

Мухамеджанов А.К.- инженер-технолог, ТОО "BIOTRON Progress", Промышленная зона 4, комплекс 7, Степногорск, Казахстан.

Ергазы Б.- исследователь, ТОО "BIOTRON Progress", Промышленная зона 4, комплекс 7, Степногорск, Казахстан.

Мертасов А.Г. - исследователь, ТОО "BIOTRON Progress", Промышленная зона 4, комплекс 7, Степногорск, Казахстан.

Babak V. A. - PhD in Veterinary Science, engineer-technologist, «BIOTRON Progress» LLT, Industrial zone 4, complex 7, Stepnogorsk, Kazakhstan.

Zhakupov E.Zh.- project manager, «BIOTRON Progress» LLT, Industrial zone 4, complex 7, Stepnogorsk, Kazakhstan.

Puntus I.A.- researcher, «BIOTRON Progress» LLT, Industrial zone 4, complex 7, Stepnogorsk, Kazakhstan.

Mukhamedzhanov A.K.- engineer-technologist, «BIOTRON Progress» LLT, Industrial zone 4, complex 7, Stepnogorsk, Kazakhstan.

Ergazy B. - researcher, «BIOTRON Progress» LLT, Industrial zone 4, complex 7, Stepnogorsk, Kazakhstan.

Mertassov A.G.- researcher, «BIOTRON Progress» LLT, Industrial zone 4, complex 7, Stepnogorsk, Kazakhstan.

Поступила в редакцию 04.02.2020