

РАЗРАБОТКА РЕЦЕПТУРЫ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ  
ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ AZOTOBACTER

## DEVELOPMENT OF NUTRIENT MEDIA FORMULATION FOR AZOTOBACTER BACTERIA CULTIVATION

**Ключевые слова:** плодородие, почва, азотфиксация, бактерии рода *Azotobacter*, биоудобрения, культивирование, питательная среда, биомасса, бобовые культуры, отвар.

**Keywords:** fertility, soil, nitrogen fixation, genus *Azotobacter* bacteria, bio-fertilizers, cultivation, nutrient medium, biomass, legumes, broth.

Субстрат в биопроизводстве является одним из основных факторов, влияющих на быстрый рост микроорганизмов, накопления биомассы и максимальный синтез ими различных биологически активных веществ. Целью работы явилось совершенствование субстратов, используемых при биопроизводстве препаратов, содержащих *Azotobacter chroococcum*. В качестве тест-объекта использовали культуру *Azotobacter chroococcum*, выделенную из почвы пахотного слоя сельхозугодий Павлодарского региона. Для достижения максимального выхода биомассы использовали питательные среды различного состава, а также различные условия культивирования продуцента. Состав питательных сред разрабатывался с учетом физиолого-биохимических характеристик продуцента, также исходили из того, что наиболее перспективно использование природного сырья, которое должно быть дешевым, доступным. Присутствие факторов роста в питательных средах обеспечивали путем введения в состав автолизата дрожжей. С целью сокращения сроков культивирования и повышения выхода биомассы в качестве основы разрабатываемой питательной среды было решено использовать отвар семян бобовых культур. В ходе исследований получена плотная питательная среда для поверхностного периодического культивирования *Azotobacter chroococcum*, содержащая отвар чечевицы, сернокислый магний, хлорид натрия, гидроортофосфат калия, сернокислое железо, сернокислый аммоний, агар, глюкозу, автолизат дрожжей. В составе данной питательной среды дрожжевой автолизат является источником добавочных питательных и ростовых веществ, т.к. в указанном количестве продуцент компенсирует свои потребности в азоте за счет имеющихся минеральных соединений азота.

The substrate in bio-production is one of the main factors affecting the rapid growth of microorganisms, accumulation of biomass and their maximum synthesis of various biologically active substances. The research goal was to improve the substrates used in the bio-production of preparations containing *Azotobacter chroococcum*. *Azotobacter chroococcum* culture isolated from the soil of the arable layer of farmlands in the Pavlodar Region was used as a test object. To achieve the maximum biomass yield, nutrient media of different composition were used as well as different conditions for the cultivation of the producer. The composition of nutrient media was developed taking into account the physiological and biochemical characteristics of the producer, and proceeding from the fact that the use of natural raw materials was the most promising, and the raw materials should be cheap and affordable. The presence of growth factors in nutrient media was provided by incorporating yeast autolyzate into the composition. In order to reduce the time of cultivation and increase the yield of biomass, it was decided to use broth of seeds of leguminous crops as the basis of the developed nutrient medium. During the research, a dense nutrient medium for surface periodic cultivation of *Azotobacter chroococcum* containing lentil broth, magnesium sulphate, sodium chloride, potassium hydrogen phosphate, ferrous sulphate, ammonium sulphate, agar, glucose, and yeast autolyzate. In the composition of this nutrient medium, yeast autolyzate is a source of additional nutrients and growth substances, since in the specified amount, the producer compensates for its nitrogen requirements due to the available mineral nitrogen compounds.

**Урюмцева Татьяна Игоревна**, к.в.н., доцент, проф., Инновационный Евразийский университет, г. Павлодар, Республика Казахстан. E-mail: vbh2@mail.ru.

**Кабдрасилова Айнар Маулитбековна**, магистрант, каф. «Сельское хозяйство и биоресурсы», Инновационный Евразийский университет, г. Павлодар, Республика Казахстан. E-mail: k.ainara.m@mail.ru.

**Uryumtseva Tatyana Igorevna**, Cand. Vet. Sci., Assoc. Prof., Prof., Innovative Eurasian University, Pavlodar, Republic of Kazakhstan. E-mail: vbh2@mail.ru.

**Kabdrasilova Aynar Maulitbekovna**, master's degree student, Innovative Eurasian University, Pavlodar, Republic of Kazakhstan. E-mail: k.ainara.m@mail.ru.

### Введение

В сельскохозяйственном производстве Казахстана отмечается низкий уровень использования органических удобрений, изучение данного вопроса в разрезе областей говорит о снижении их применения в растениеводстве по сравнению с последним десятилетием двадцатого века более чем в 150 раз [1].

Удобрения, вносимые в почвы сельхозугодий Казахстана, создают проблему изменения почвенной биоты: возрастает доля олиготрофных бактерий, а также бактерий денитрификаторов, что ведет к истощению почв. Наряду с этим нет научно обоснованных данных о влиянии использования минеральных удобрений и пестицидов на микрофлору почвы, гумус и содержание органического азота. Экологическое состояние земельных ресурсов ряда регионов Казахстана является критическим, требующим неотложных мероприятий по повышению плодородия [2].

Таким образом, большие надежды возлагаются на биологизацию земледелия, которая предусматривает приоритетность биологического фактора, обеспечивающего получение экологически чистой продукции в соответствии с санитарными нормами. В биологическом земледелии восстановление плодородия осуществляется путем внедрения специализированных севооборотов с культурами, имеющими наибольшую корневую систему, обеспечение использования органических отходов и др. [3]. Также к биологическому земледелию можно отнести мероприятия по внесению в почву бактерий рода *Azotobacter*. Бактерии азотификсаторы играют одну из основных ролей в круговороте азота в природе, они способны переводить молекулярный азот, содержащийся в атмосфере, в растворимую, доступную для растений форму. Также данный вид бактерий практически не проявляет антагонистические свойства по отношению к другим почвенным микроорганизмам и фиксирует азот в количестве, не приводящем к его избыточному накоплению в почве [4]. Продуктивность выращивания сельскохозяйственных культур на таких почвах повышается на 15-20%, что подтверждает необходимость использования препаратов азотобактера в сельхозпроизводстве на современном этапе развития. В связи с этим совершенствование технологии производства биопрепаратов, содержащих в своем составе бактерии *Azotobacter chroococcum*, весьма актуально.

Неотъемлемой частью технологического процесса по производству биопрепаратов, содержащих в своем составе живые микроорганизмы, является использование питательных субстратов. Субстрат в биотехнологическом производстве является одним из основных факторов, влияющих на интенсивность роста производственных культур, накопления биомассы и продуктов биосинтеза. **Целью** работы явилось совершенствование субстратов, используемых при биопроизводстве препараты, содержащие *Azotobacter chroococcum*.

### Объекты и методы

В качестве тест-объекта использовали культуру *Azotobacter chroococcum*, выделенную из почвы пахотного слоя сельхозугодий Павлодарского региона. Выделение продуцента осуществляли путем посева 1 мл почвенной суспензии на плотную среду Эшби в чашках Петри из двух последних разведений. Взвесь втирали в поверхность среды стерильным стеклянным шпателем. Посевы культивировали при 30°C в течение 5 сут., учитывали колонии азотобактера [5].

Среду Эшби готовили из расчета на 1000 мл дистиллированной воды: маннит – 20 г,  $K_2HPO_4$  – 0,2 г;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,2 г; NaCl – 0,2 г;  $K_2SO_4$  – 0,1 г;  $CaCO_3$  – 5 г; агар – 20 г.

Для достижения максимального выхода биомассы использовали питательные среды различного состава, а также различные условия культивирования продуцента. Состав питательных сред разрабатывался с учетом физиолого-биохимических характеристик продуцента, также исходили из того, что наиболее перспективно использование природного сырья, которое должно быть дешевым, доступным.

Присутствие факторов роста в питательных средах обеспечивали путем введения в состав автолизата дрожжей, который получали путем помещения 100 г пекарских прессованных дрожжей в 500 мл воды, выдерживая при температуре от 58°C в течение 48 ч, встряхивая 2 раза в сутки. Конец автолиза устанавливали по полному разжижению дрожжей. Полученный автолизат автоклавировали при 120°C 15 мин.

Отвар семян бобовых культур готовили, заливая сырье дистиллированной водой комнатной температуры, помещая на кипящую водяную баню, и варили в течение 60 мин., после чего настаивали 10 мин. Затем отвар процеживали, стерилизовали при 1,5 атм 120°C в течение 30 мин.

Для определения титра бактерий четырехсуточную агаровую культуру смывали стерильным изотоническим раствором. Для титрования высевали последовательные десятикратные разведения микробной суспензии на среду Эшби, учет производили на 4-5-е сут.

### Экспериментальная часть

При возделывании культурных травянистых растений, клубнеплодов, зерновых использование азотобактерина является малоэффективным, т.к. азотобактер способен хорошо развиваться в хорошо окультуренных почвах [6].

В почвах с высоким содержанием органических веществ повышается положительная роль азотобактера. Использование азотобактерина оправдано при возделывании овощных культур, т.к. их выращивание осуществляется на почвах с внесением перегноя.

При получении азотобактерина производственную культуру обычно культивируют в стерильной почве со значением рН близким к семи с доступным для азотобактера источником азота и высоким содержанием гумуса. При получении маточной культуры используют питательные среды, имеющие в своем составе нитриты и нитраты, а также соли аммония и различные аминокислоты. Однако на средах с минеральными источниками азота клубеньковые бактерии развиваются слабее. Многие клубеньковые бактерии нуждаются в наличии аминокислот (например, тирозина), очень хорошо используют аспарагиновую кислоту и аспарагин [7].

Бактерии рода *Azotobacter* способны воспринимать широкий круг органических соединений – моносахариды, дисахариды, крахмал, различные спирты и органические кислоты. Для синтетического обмена азотобактера большое значение имеют источники минерального питания, в первую очередь, фосфор и кальций. Для полноценного осуществления процесса фиксации азота данному микроорганизму необходимы микроэлементы, наибольшее значение имеет молибден, являющийся составной частью ферментов, участвующих в процессах усвоения азота [8, 9].

Для сокращения сроков культивирования и повышения выхода биомассы в качестве основы разрабатываемой питательной среды было решено использовать отвар семян бобовых культур.

Чечевица характеризуется высоким содержанием многих витаминов и минеральных веществ, также заменимых и незаменимых аминокислот, пектина и пр. Чечевица богата фолиевой кислотой, витамином В<sub>1</sub>, пантотеновой кислотой, витамином В<sub>6</sub>, гамма-токоферолом, холином, витамином РР, витамином В<sub>2</sub>.

Минеральный состав чечевицы разнообразен и богат макро-, микро- и ультрамикроэлементами. В нем преобладают: бор, кремний, кобальт молибден, никель, литий, ванадий, марганец, медь, хром, фосфор, железо, титан, цинк, калий, рубидий, цирконий, магний, сера, мышьяк, селен.

Достаточно высоко в чечевице содержание суммы углеводов (17,2%), в составе которых преобладают клетчатка и пектин. Чечевица содержит значительное количество крахмала, мальтозу и небольшое количество сахарозы.

Фасоль характеризуется высоким содержанием витаминов группы В, многих минеральных элементов, белков, незаменимых и заменимых аминокислот, фитостеролов, клетчатки, крахмала и пуринов. Она богата витаминами В<sub>9</sub>, В<sub>1</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>5</sub>, пиридоксином, холином, витамином В<sub>2</sub>. Минеральный состав фасоли разнообразен и богат макро-, микроэлементами. Фасоль содержит в значительных количествах достаточно редкие для пищевых продуктов микроэлементы – бром и германий. Фасоль выделяется по содержанию белков, незаменимых и заменимых аминокислот. Также богата фасоль незаменимыми аминокислотами изолейцином и валином; среди заменимых аминокислот преобладают глутаминовая кислота и глицин. В фасоли содержится достаточно много углеводов. В углеводном составе преобладают клетчатка и крахмал. Фасоль содержит сахарозу, галактозу и пектин [10].

Важно также, что азотобактер является продуцентом метилового эфира алифатической тетраеновой кислоты, обладающего фунгистатической активностью против многих фитопатогенов, для биосинтеза и накопления которого необходимы источники калия и фосфора, содержащиеся в семенах бобовых культур.

В качестве источников углеводов использовали глюкозу и маннит.

В среды № 1, 2, 3 и 4 вносили автолизат дрожжей.

Питательные среды для культивирования *Azotobacter chroococcum*

Компоненты	Содержание компонентов питательной среды, г/1000 мл							
	среда							
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8
Отвар чечевицы			1000	1000			1000	1000
Отвар фасоли красной	1000	1000			1000	1000		
MgSO <sub>4</sub>	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
NaCl	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
FeSO <sub>4</sub>	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Агар	20	20	20	20	20	20	20	20
Глюкоза		20		20		20		20
Маннит	20		20		20		20	
Автолизат дрожжей	0,7	0,7	0,7	0,7				

Производили посев взвеси *Azotobacter chroococcum* ( $3 \times 10^2$  КОЕ) из расчета 1 мл на чашку. Культивирование осуществляли при 28°C. По истечении 24 ч рост не зафиксирован ни на одной из питательных сред. Скорость роста оценивали на 2-, 3- и 4-е сут. Первый видимый рост зафиксирован на через 48 ч на средах № 2 и 4. Через 72 ч рост зафиксирован на всех средах, колонии круглые выпуклые блестящие непрозрачные слизистой консистенции размером 2-3 мм (рис.). По истечении 5 сут. самый обильный рост зафиксирован в среде № 4. Существенного отличия морфологических, тинкториальных и культуральных характеристик не наблюдалось.

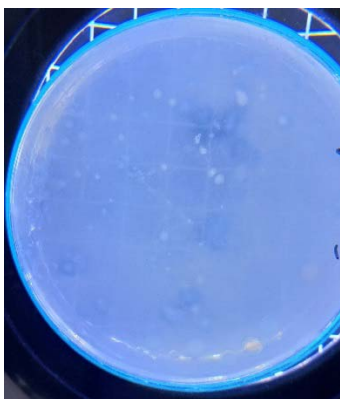


Рис. Культивирование *Azotobacter chroococcum* на питательной среде № 4

### Заключение

Подбор питательной среды при промышленном производстве биопрепаратов является решающим фактором успешного наращивания

биомассы. При производстве препаратов, в состав которых входят азотфиксаторы, необходимы среды, содержащие углеводы, соли органических кислот, спирты, источники азота, в качестве которых могут быть использованы нитраты, ионы аммония и аминокислоты. В ходе исследований получена плотная питательная среда для поверхностного периодического культивирования *Azotobacter chroococcum*, содержащая отвар чечевицы, магний сернокислый, натрия хлорид, гидроортофосфат калия, сернокислое железо, аммоний сернокислый, агар, глюкозу, автолизат дрожжей. В составе данной питательной среды дрожжевой автолизат является источником добавочных питательных и ростовых веществ, т.к. в указанном количестве продуцент компенсирует свои потребности в азоте за счет имеющихся минеральных соединений азота.

### Библиографический список

- Петровский А. Формула плодородия // Казахстанская правда. – 2003. – № 4. – С. 3.
- Климов Е., Климова М. Органическое сельское хозяйство // Экология и общество. – 2009. – № 3, 4. – С. 9-12.
- Добровольский Г.В., Никитин Е.Д. Функции почв в биосфере и экосистеме. – М.: Наука, 1990. – 261 с.
- Гарбуз С.А., Корытова В.Е. Подбор оптимальной питательной среды для гомогенного, периодического культивирования *Azotobacter chroococcum* // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – № 12 (54). – Ч. 1. – С. 12-14.

5. Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. New York: Springer-Verlag, 2001.

6. Биопрепараты в сельском хозяйстве: методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве / Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. науч.-исслед. ин-т с.-х. микробиологии; И.А. Тихонович и др. – М.: Россельхозакадемия, 2005. – 153 с.

7. Доросинский Л.М. Клубеньковые бактерии и нитрагин. – Л.: Колос, 1990. – 190 с.

8. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы экобиотехнологии: учебное пособие для студентов. – М.: Мир, 2006. – 504 с.

9. Мишустин Е.Н. Микроорганизмы и продуктивность земледелия. – М.: Наука, 1992. – 342 с.

10. Маккензи Р.А., Уиддоусон Э.М., Основные таблицы // Справочник Макканса и Уиддоусона. Химический состав и энергетическая ценность пищевых продуктов / под ред. А.К. Батурина. – 6-е изд. – СПб.: Профессия, 2006. – 416 с.

#### References

1. Petrovskiy A. *Formula plodorodiya // Kazakhstanskaya pravda*. – 2003. – No. 4. – S. 3.

2. Klimov Ye., Klimova M. *Organicheskoe selskoe khozyaystvo // Ekologiya i obshchestvo*. – 2009. – No. 3-4. – S. 9-12.

3. Dobrovolskiy G.V., Nikitin Ye.D. *Funktsii pochv v biosfere i ekosisteme*. – М.: Nauka, 1990. – 261 s.

4. Garbuz S.A., Korytova V.Ye. *Podbor optimalnoy pitatelnoy sredy dlya gomogenogo, periodicheskogo kultivirovaniya Azotobacter chroococcum // Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal*. – 2016. – No. 12 (54). – Ch. 1. – S. 12-14.

5. Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. New York: Springer-Verlag, 2001.

6. *Biopreparaty v selskom khozyaystve: metodologiya i praktika primeneniya mikroorganizmov v rastenievodstve i kormoproizvodstve / Ros. akad. s.-kh. nauk, Vseros. nauch.-issled. in-t s.-kh. mikrobiologii; I.A. Tikhonovich i dr.* – М.: Rosselkhozakademiya, 2005. – 153 s.

7. Dorosinskiy L.M. *Klubenkovye bakterii i nitragin*. – L.: Kolos, 1990. – 190 s.

8. Kuznetsov A.Ye., Gradova N.B. *Nauchnye osnovy ekobiotekhnologii: uchebnoe posobie dlya studentov*. – М.: Mir, 2006. – 504 s.

9. Mishustin Ye.N. *Mikroorganizmy i produktivnost zemledeliya*. – М.: Nauka, 1992. – 342 s.

10. Makkenzi R.A., Uiddouson E.M. *Osnovnye tablitsy // Spravochnik Makkansa i Uiddousona. Khimicheskii sostav i energeticheskaya tsennost pishchevykh produktov / pod red. A.K. Baturina*. – 6-е изд. – СПб.: Professiya, 2006. – 416 s.



УДК 631:53(571.15)

С.В. Макарычев  
S.V. Makarychev

## ОРОШЕНИЕ ЧЕРНОЗЕМОВ КОЛОЧНОЙ СТЕПИ АЛТАЙСКОГО КРАЯ ДОЖДЕВАНИЕМ И ЕГО ПОСЛЕДСТВИЯ

### SPRINKLING IRRIGATION OF THE CHERNOZEMS OF THE ALTAI REGION'S FOREST-OUTLIER STEPPE AND ITS AFTER-EFFECTS

**Ключевые слова:** черноземы, орошение, дождевание, дисперсность, влагоемкость, теплоемкость, теплопроводность, температуропроводность.

Гидротехнические мелиорации оказывают наиболее сильное воздействие на экологическую обстановку территории. Практикуемые оросительные нормы, как правило, разработаны при учете лишь водно-физических почвенных показателей. В результате превышение поливных норм приводит к выщелачиванию почв, развитию процессов оподзоливания и осолодения. Максимальным изменениям в орошаемых черноземах подвержены плот-

ность сложения и порозность аэрации. Орошение приводит к уплотнению генетических горизонтов почв. Так, средняя плотность корнеобитаемого слоя при этом повышается на 6-8%. Многолетнее орошение вызывает определенные, в основном отрицательные, изменения теплофизических свойств почвы. Это, прежде всего, относится к объемной теплоемкости и температуропроводности, тогда как теплопроводность исследованных разрезов варьирует в небольших пределах (2-5%). Мелиорированные почвы имеют более узкий диапазон оптимальной температуропроводности. При этом снижается и теплофизический бонитет орошаемых почв. Исследова-