

НОВЫЙ СПОСОБ ПРОДЛЕНИЯ СРОКА ХРАНЕНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ НЕМАЦИД И АУРИН

A new method of extending the expiry date of biopesticides Nemacide and Aurine by using Lignohumate has been developed. Most effective is Nemacide storage in the presence of Lignohumate B sodium (1,5 %); for Aurine the optimum is adding Lignohumate B sodium and BM potassium (0,5 %).

Одной из актуальных биотехнологических задач в настоящее время является создание эффективных и безопасных биологических средств защиты растений для борьбы с заболеваниями сельскохозяйственных культур в процессе их возделывания. Следует отметить, что биопестицидные препараты на основе живых бактериальных культур по сравнению с химическими пестицидами обладают рядом преимуществ: являются полифункциональными (эффективны в отношении широкого спектра фитопатогенов и нематод), способны стимулировать рост растений и улучшать их минеральное питание, а также индуцировать у них системную устойчивость к возбудителям заболеваний. Кроме того, биологические препараты обладают пролонгированным действием, поскольку микроорганизмы, входящие в их состав, способны заселять ризосферу и филосферу растений и активно размножаться в ходе их вегетации; считаются экологически безопасными (входящие в состав препаратов бактериоантагонисты являются естественными обитателями ризосферы и филосферы растений), не изменяют состав агробиоценозов, безвредны для человека, животных и растений. Аналогичными свойствами обладают также препараты на основе продуктов переработки торфа, проявляющие высокую ростостимулирующую активность в отношении растений, а также обладающие защитным действием от некоторых патогенов.

Особенно перспективными в качестве основы для создания биопестицидных препаратов являются ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, синтезирующие, как известно, антибиотики, сидерофоры, гидролитические ферменты и т. д., определяющие способность бактерий эффективно препятствовать

развитию возбудителей таких опасных заболеваний сельскохозяйственных растений, как гнили корневой шейки зерновых и плодовых культур, сосудистое и паренхиматозное поражение картофеля и капусты, ожоги листьев, пятнистость плодов, бактериальный рак, некрозы коры и т. д. [1, 2]. Кроме того, некоторые штаммы *Pseudomonas* обладают акарицидным действием – способны подавлять развитие нематод *Ditelenchus destructor*, *Globodera rostochiensis* и *Aphelenchoides asterocaudatus* [3].

На основе бактерий рода *Pseudomonas* нами (в НИЛ молекулярной генетики бактерий БГУ) разработаны новые биопестицидные препараты Немацид (ТУ ВУ 300042160.011-2009), Аурин (ТУ ВУ 300042160.012-2009), предназначенные как для защиты сельскохозяйственных культур от фитопатогенов, так и для стимуляции роста растений. В ходе испытаний указанные биопрепараты показали высокую эффективность применения, однако их существенным недостатком является малый срок хранения (2÷3 месяца при комнатной температуре), что ограничивает объем производства и сроки реализации продукции.

Известно, что совмещение биопрепаратов на основе живых культур микроорганизмов и препарата Лигногумат (гуминовое удобрение с микроэлементами в хелатной форме со свойствами регулятора роста и антистрессанта) способствует увеличению сроков хранения биопрепаратов [4].

Существенным преимуществом технологий, основанных на использовании бактериальных и гуминовых препаратов, выступает снижение затрат на химические средства защиты растений и их подкормку. Немаловажно, что при этом решается комплекс экологических проблем, обусловленных ведением интенсивного земледелия. Перевод отдельных отраслей сельскохозяйственного производства на безвредный уровень, предусматривающий внедрение в практику новых технологий возделывания и защиты сельскохозяйственных культур с использованием биологических методов, является основным подходом к улучшению экологической обстановки и получению экологически чистой продукции.

Цель данной работы – разработка нового способа продления сроков хранения биопестицидов Немацид и Аурин с использованием препарата Лигногумат.

Материал и методика

Способность бактерий *Pseudomonas aurantiaca* В-162 и *Pseudomonas putida* U подавлять рост фитопатогенных микроорганизмов изучали с использованием метода «отсроченного антагонизма» [5].

Исследования по оценке эффективности препарата Аурин для защиты огурца от болезней проведены на базе тепличного хозяйства Республиканского унитарного экспериментально-опытного сельскохозяйственного предприятия «Восход» Минского района на сорте Компанист. Опыт заложен в 4-кратной повторности, площадь опытной делянки 15 м². Препарат применили по следующей схеме: полив рассады в фазе двух-трех настоящих листьев 1 % суспензией препарата (расход рабочей жидкости 3 л/м²); при появлении первых признаков болезни 3-кратное опрыскивание с интервалом 7÷10 сут 1 % суспензией препарата (расход рабочей жидкости 1000 л/га).

Оценка эффективности препарата Аурин для защиты томата от серой гнили (стеблевая форма) проведена на Минском областном унитарном предприятии «Старо-Борисов» Борисовского района Минской области на томате сорта Бруклин. Опыт проведен в 4-кратной повторности, площадь опытной делянки 15 м². Схема применения препарата включала полив рассады в фазе семядольных листьев и через 3 сут после пикировки 1 % суспензией препарата (расход рабочей жидкости 3 л/м²) и при появлении первых признаков серой гнили 3-кратное опрыскивание с интервалом 7÷10 сут 1 % суспензией препарата (расход рабочей жидкости 1000 л/га).

Схема опытов по оценке биологической эффективности биопрепарата Немацид: семена огурцов высаживают в стерильную почву и выращивают до стадии одного-двух настоящих листьев, затем переносят в почву, зараженную нематодой. В ходе высадки растения обрабатывают 1 % суспензией препарата Немацид путем подлива в лунку. За период вегетации растения дважды обрабатывают 0,1 % суспензией препарата Немацид, разведенного 1:1000, путем подлива под корень с интервалом 2 недели. Эффективность препарата определяется через 30 сут с момента высадки растений в почву, зараженную нематодой.

Критерием оценки жизнеспособности бактерий при хранении с препаратом Лигногумат служил титр клеток – количество клеток, определяемое стандартным методом. Высевы из смеси производили на поверхность агаризованной среды на основе гидролизата кильки, инкубировали при 28 °С в течение 24 ч. Опыты проводили в трехкратной повторности.

Результаты и их обсуждение

В серии предварительных экспериментов установлено, что бактерии *P. aurantiaca* В-162 способны подавлять вегетативную и генеративную функции фитопатогенных грибов, относящихся к родам *Fusarium*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Sclerotinia*, *Phytophthora* и *Botrytis* (21 штамм), а также рост всех без

исключения фитопатогенных культур: *E. aroideae*, *E. carotovora*, *P. atrofaciens*, *P. glycinea*, *P. lachrymans*, *P. lupine*, *P. pisi*, *P. syringae*, *P. vignae*, *P. xanthochlora* (42 штамма) [5].

Известно, что антимикробная активность бактерий рода *Pseudomonas* обусловлена способностью синтезировать антибиотики различного строения: ациклические, ароматические, β -лактамы, производные хинолина, аминогликозиды и др. При этом более половины от всего числа антимикробных соединений, синтезируемых бактериями *Pseudomonas* и обладающих широким спектром действия по отношению к патогенным бактериям и грибам, составляют антибиотики феназинового ряда [1, 6]. На следующем этапе с использованием HPLC-анализа было установлено, что комплекс феназиновых антибиотиков бактерий *P. aurantiaca* В-162 представлен феназином, 1-оксифеназином и их общим предшественником феназин-1,6-дикарбоксилатом [7]. Далее, с использованием химического мутагенеза и последующим отбором на токсических аналогах метаболитов ароматического пути были получены регуляторные аналого-резистентные мутанты штамма В-162, способные к сверхпродукции антибиотиков феназинового ряда. Наибольший уровень синтеза феназиновых соединений, зарегистрированный у мутанта В-162/498, составлял $205,32 \pm 1,91$ мг/л, что в $2,8 \div 3$ раза превышает таковой у исходного штамма и в 10 раз – у известных в этом отношении бактерий *P. chlororaphis* и *P. aeruginosa*. На основании мутантных бактерий *P. aurantiaca* В-162/498 создан полифункциональный препарат Аурин, предназначенный для защиты растений и стимуляции их роста [5].

Были проведены испытания биологического препарата Аурин по защите огурца и томата, выращиваемых в закрытом грунте, от болезней. Анализ фитопатологической ситуации во время вегетации огурца показал, что растения поражались корневой гнилью, белой гнилью, альтернариозом. Применение препарата способствовало снижению распространенности корневой гнили на $24 \div 31$ %, развития болезни – на $14 \div 30$ %, распространенности и развития белой гнили плодов – на 10 и 42 % соответственно [8]. Несколько ниже эффективность препарата была в отношении альтернариоза – распространенность и развитие болезни снижались на 10 и 12,8 % соответственно.

Оценка фитопатологической ситуации показала, что препарат Аурин оказывал защитное действие на томатах сорта Бруклин в отношении серой гнили (стеблевая форма) (табл. 1). Биологическая эффективность препарата по защите томата от серой гнили составила $45,7 \div 45,9$ %.

Таблица 1

Влияние препарата Аурин на развитие серой гнили растений томатов

Вариант	Распространенность, %	Развитие болезни, %
Контроль	29	15
Опыт	16	8

Примечание. Контроль – растения выращивали без обработки препаратом Аурин; опыт – растения обрабатывали препаратом Аурин.

Следует отметить, что, помимо антагонистической активности, препарат Аурин способен также стимулировать рост и развитие растений: при внесении его в почву наблюдается стимуляция роста побегов в 1,45 раза и корневой системы в 1,19 раза (возраст растений 2 мес.) [9]. Известно, что рост растений может стимулироваться такими продуктами бактериального биосинтеза, как гиббереллины, ауксины и цитокинины, а также витамины группы В. Установлено, что уровень синтеза гиббереллинов бактериями *P. aurantiaca* В-162/498 составляет 13,2 мкг/мл, а ауксинов – $6,54 \pm 0,23$ мкг/мл. Кроме того, эти бактерии способны к активной колонизации корней и характеризуются высокой выживаемостью в ризосфере. Таким образом, помимо антифунгальной активности, препарат Аурин также способен стимулировать рост и развитие растений.

Помимо Аурина нами создан высокоактивный фитопротекторный биопрепарат Немацид, предназначенный для защиты овощных культур от галловой нематоды. Основу препарата составляют флуоресцирующие ризосферные бактерии *P. putida* U.

Ранее было показано, что бактерии *P. putida* являются ризосферными микроорганизмами, обладающими выраженной антибактериальной, антифунгальной и антинематодной активностями, а также оказывающими стимулирующее действие на рост и развитие растений-хозяев [10]. Установлено, что данные бактерии способны синтезировать и выделять в среду желто-зеленый флуоресцирующий пигмент пиовердин P_m , выполняющий функцию сидерофора [11]. При этом пиовердин P_m может образовывать прочный комплекс с ионами железа и переводить их в недоступную для других микроорганизмов (бактерий и грибов) форму, защищая таким образом растения от инфицирования фитопатогенами. Антимикробную активность пиовердина P_m изучали методом отсроченного антагонизма.

Проведенные исследования показали, что мутантные штаммы *P. putida*, не синтезирующие пиовердин P_m , не проявляют антибактериальной активности.

С помощью химического мутагенеза и последующего отбора на средах, содержащих ЭДТА, получен мутантный штамм *P. putida* U, обладающий повышенной продукцией пиовердина P_m в присутствии ионов железа [12].

Для анализа действия препарата по снижению инвазии галловой нематоды на растениях огурца сортов Элизе и Родничок был заложен опыт в условиях светотеплицы. Из результатов проведенного эксперимента, представленных в табл. 2, видно, что обработка препаратом Немацид в лабораторных условиях позволяет снизить поражаемость растений огурцов галловой нематодой на 60 % для сорта Элизе и на 67 % для растений сорта Родничок. При этом снижалась как интенсивность поражения растений в 2 и в 1,6 раза соответственно, так и развитие болезни на 38,3 и 35 %.

Таблица 2

Влияние препарата Немацид на развитие мейлядогноза растений огурцов

Вариант опыта	Распространенность, %	Интенсивность поражения, балл	Развитие болезни, %
Родничок, опыт	33	1,4	23,3
Родничок, контроль 1	–	–	–
Родничок, контроль 2	100	2,3	58,3
Элизе, опыт	40	1,3	26,7
Элизе, контроль 1	–	–	–
Элизе, контроль 2	100	2,6	65

Примечание. Контроль 1 – растения выращивали в почве без нематоды и обрабатывали соответствующим количеством воды; контроль 2 – растения выращивали в почве с нематодой и обрабатывали соответствующим количеством воды. Опыт – растения выращивали в почве с нематодой и обрабатывали препаратом Немацид.

Регистрационные испытания препарата Немацид, проведенные в КСУП «Светлогорская овощная фабрика» Гомельской области и ДП «Свислочская сельхозтехника» Гродненской области, подтвердили полученные ранее данные.

Препараты Немацид и Аурин (согласно ТУ ВУ) хранят в сухих, защищенных от атмосферных осадков помещениях при температуре не выше +10 °С и не ниже +4 °С, в качестве стабилизатора используют 0,5 % бензоат натрия. Однако хранение больших объемов препаратов в холодильных камерах нецелесообразно, вследствие чего возникла необходимость увеличения срока хранения биопрепаратов в температурном режиме от 10 до 22 °С.

Были проведены исследования жизнеспособности бактерий *P. aurantiaca* В-162/498 и *P. putida* U, являющихся основой биопрепаратов Аурин и Немацид соответственно, при хранении в смеси с Лигногуматами. В работе использованы препараты Лигногумата следующих марок: Б и БМ калийный, Б и БМ натриевый и ВМ-NPK калийный. Лигногумат марки Б представляет собой 20 % водный раствор натриевой или калийной соли гуминовых кислот, а Лигногумат БМ получают добавлением к Лигногумату Б микроэлементов. В состав Лигногумата ВМ-NPK помимо микроэлементов входят макроэлементы – азот, фосфор и натрий. Для закладки на хранение биопрепараты Аурин и Немацид смешивали с препаратами Лигногумата (конечная концентрация 0,5 и 1,5 %). Значение pH Лигногумата предварительно доводили до 6,5–7,0 и стерилизовали автоклавированием при 0,5 атм в течение 30 мин. Образцы хранили при комнатной температуре в течение 7 мес.

Таблица 3

Жизнеспособность бактерий *P. putida* U в смеси с Лигногуматом

Вариант хранения	Процент жизнеспособных клеток						
	1 мес.	2 мес.	3 мес.	4 мес.	5 мес.	6 мес.	7 мес.
Немацид							
+ вода 0,5 %	2	4,6	2,9	5,5	1,8	0,4	0,9
+ Б калийный 0,5 %	5,8	5,4	4,8	3,7	2,9	1,1	0,9
+ Б калийный 1,5 %	20,0	19,4	17,8	15,5	14,6	9,2	3,5
+ БМ калийный 0,5 %	7,3	7,0	5,5	4,4	3,5	2,1	1,4
+ БМ калийный 1,5 %	22,4	19,9	16,6	16,1	15,5	10,1	5,4
+ Б натриевый 0,5 %	4,8	4,1	3,6	2,9	2,5	1,5	1,1
+ Б натриевый 1,5 %	30,1	27,1	24,8	19,9	19,3	18,7	10,0
+ БМ натриевый 0,5 %	2,7	2,4	2,1	1,9	1,5	1,1	0,7
+ БМ натриевый 1,5 %	24,4	23,5	22,8	21,9	20,3	16,2	10,1
+ ВМ-NPK калийный 0,5 %	4,7	7,4	4	3,9	2,5	0,1	1,1
+ ВМ-NPK калийный 1,5 %	19,0	17,1	14,8	15,9	17,3	0,12	0,5

Примечание. Исходный титр составил $7,6 \cdot 10^9$ кл./мл.

Как видно из представленных в табл. 3 и 4 результатов, жизнеспособность клеток бактерий *P. putida* U и *P. aurantiaca* В-162/498 в присутствии Лигногумата выше, чем при хранении в стандартных условиях. При этом клетки *P. putida* U, составляющие основу биопрепарата Немацид, сохраняются в течение 6 мес. при внесении Лигногумата в конечной концентрации 1,5 % (количество жизнеспособных клеток равнялось $9,2 \div 18,7$ %), а клетки *P. aurantiaca* В-162/498 – основа препарата Аурин – при внесении Лигногумата в конечной концентрации 0,5 % (содержание физиологически активных клеток колебалось в пределах $10,5 \div 21,1$ %).

Таблица 4

Жизнеспособность бактерий *P. aurantiaca* В-162/498 в смеси с Лигногуматом

Вариант хранения	Процент жизнеспособных клеток						
	1 мес.	2 мес.	3 мес.	4 мес.	5 мес.	6 мес.	7 мес.
Аурин	17	20	15,7	16,8	11,0	13	1,62
+ вода 0,5 %							
+ Б калийный 0,5 %	82,1	81,4	69,9	53,1	39,5	10,5	1,63
+ Б калийный 1,5 %	40,0	33,3	28,4	27,7	25,7	12,1	9,8
+ БМ калийный 0,5 %	65,3	59,1	47,8	39,7	26,9	17,5	10,5
+ БМ калийный 1,5 %	39,4	34,4	28,8	23,3	21,5	11,1	6,8
+ Б натриевый 0,5 %	71,1	69,3	57,4	49,9	39,5	21,1	11,6
+ Б натриевый 1,5 %	33,3	31,1	29,5	27,7	22,2	16,1	1,9
+ БМ натриевый 0,5 %	55,5	47,7	39,3	31,8	24,5	13,7	2,4
+ БМ натриевый 1,5 %	31,9	28,5	22,6	18,4	15,1	9,9	3,1
+ ВМ-НРК калийный 0,5 %	90,1	83,3	77,2	63,2	49,4	14,4	1,6
+ ВМ-НРК калийный 1,5 %	40,2	35,1	29,1	27,4	25,5	6,8	0,8

Примечание. Исходный титр составил $7,2 \cdot 10^9$ кл./мл.

Таким образом, разработан новый способ увеличения сроков хранения биопрепаратов Немацид и Аурина с использованием препарата Лигногумат. Наиболее эффективным является хранение препарата Немацид в присутствии Лигногумата марки Б натриевый (1,5 %), для Аурина оптимально внесение Лигногуматов марок Б натриевый и БМ калийный (0,5 %).

- Whipps J. M. // J. Experiment. Botany. 2001. Vol. 52. P. 487.
- Dwivedi D., Johri B. N. // Current Science. 2003. Vol. 85. P. 1693.
- Siddiqui I. A., Haas D., Heeb S. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71. P. 5646.
- <http://www.humate.spb.ru/>
- Феклистова И. Н., Максимова Н. П. // Земляробства і ахова раслін. 2006. № 2. С. 42.
- Cook R. J., Thomashow L. S., Weller D. M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. P. 4197.
- Feklistova I. N., Maksimova N. P. // Microbiology. 2008. Vol. 77. P. 176.
- Prishepa L., Voitka D., Feklistova I. et al. // Zeszyty problemowe Postępów Nauk Polniczych. 2008. Z. 529. P. 149.
- Feklistova I. N., Maksimova N. P. // Plant growth substances: intracellular hormonal signaling and applying in agriculture: Abstracts 2nd international symposium, Kyiv, 8–12 october 2007 г. Kyiv, 2007. P. 123.
- Штамм бактерий *Pseudomonas putida* – биостимулятор роста растений: Пат. 2051586 РФ / Максимова Н. П., Лысак В. В., Игнатович О. В., Фомичев Ю. К. № 2051586; Заявл. 12.07.1991; Опубл. 10.01.1996. 5 с.
- Максимова Н. П., Блажевич О. В., Лысак В. В. и др. // Микробиология. 1994. Т. 63. С. 1038.
- Максимова Н. П., Храпцова Е. А., Феклистова И. Н. и др. // Мол. и прикл. генетика. 2008. Т. 8. С. 143.

Поступила в редакцию 02.03.10.

Ирина Николаевна Феклистова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры генетики.
Диана Викторовна Маслак – научный сотрудник кафедры генетики.
Инна Витальевна Можарова – научный сотрудник кафедры генетики.
Леонид Васильевич Тугаринов – генеральный директор ООО «Лигногумат» (Санкт-Петербург, Россия).