

СОЗДАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА СИСТЕМНОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS SP.* И ГИДРОГУМАТА ТОРФА

Based on the *P. aureofaciens* bacteria A 8–6 cells and peat hidrohumate the Gulliver complex biological preparation has been developed. The preparation has high biological efficiency in respect of causative agents of diseases (*Pseudomonas corrugate*, *Botrytis cinere* and *Fusarium oxysporum*) of the agricultural cultures. The application of Gulliver both allows to reduce the dissimination of diseases, such as grey mold and fusarios fading and necrosis and reduce the disease progress level by 50 % at the average for cabbage, cucumbers and tomatoes. Gulliver is capable of photostimulating activity and allows to increase dry biomass of agricultural plants.

Современное интенсивное растениеводство невозможно представить без применения средств защиты растений: адаптогенов, фунгицидов, гербицидов, инсектицидов и других биологически активных препаратов. В настоящее время наибольший интерес вызывают разработки систем интегрированной биологической защиты и стимуляции роста растений, не нарушающие экологического равновесия в почве и не загрязняющие окружающую среду.

Существенным недостатком биопрепаратов, активно используемых в современном сельскохозяйственном производстве, является малый срок их хранения, что ограничивает объем производства и сроки реализации продукции, созданной на основе живых клеток бактерий. По предварительным результатам добавление в биопрепараты продуктов переработки торфа позволяет повысить срок их хранения. Кроме того, продукты гидролиза торфа являются эффективными биорегуляторами и способны на ранних стадиях онтогенеза стимулировать рост и развитие растений [1]. Следует отметить, что важное значение имеет процентное содержание гуминовых веществ в составе препарата, так как в высоких концентрациях продукты переработки торфа вызывают гибель бактериальных клеток [2].

Целью настоящего исследования стала разработка нового многофункционального биопрепарата Гулливер, представляющего собой комплекс биофитопестицид-гидрогумат торфа, а также оценка его фитозащитной и фитостимулирующей активности.

Объекты и методы исследований

Штамм *P. aureofaciens* А 8-6 выделен в НИЛ молекулярной генетики бактерий биологического факультета БГУ из природных источников.

Препарат торфа (регулятор роста растений Гидрогумат, ТУ РБ 03535026.282-97) для эксперимента предоставлен Институтом природопользования НАН Беларуси.

Антагонистическая активность клеток штамма *P. aureofaciens* А 8-6 изучалась методом «отсроченного» антагонизма [3].

При подборе соотношения компонентов комплекса биофитопестицид-Гидрогумат культуру *P. aureofaciens* А 8-6 выращивали в течение 48 ч на круговом термостатируемом шейкере при 150 об/мин в среде М9 следующего состава (г/л): 24 – Na_2HPO_4 ; 12 – KH_2PO_4 ; 2 – NaCl и 4 – NH_4Cl ; 0,26 – $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,01 – CaCl_2 , 5 – кукурузная меласса. Полученную бактериальную суспензию смешивали с препаратом Гидрогумат и хранили в холодильнике (10 ± 2 °С) и при комнатной температуре (20 ± 2 °С). Учет результатов проводили на 14-е и 30-е сут хранения комплекса.

Биологическую эффективность препарата изучали в лабораторных условиях – в светотеплице при температуре $21 \div 22$ °С и 10-часовом фотопериоде.

Семена овощных культур – капусты белокочанной сортов Июньская и Белорусская 85, огурцов сортов Парижский корншон и Коралл, а также томатов сортов Ляна и Превосходный 176 – обрабатывали в течение 1 ч в рабочем растворе препарата (разведение 1:100 водой), а затем 48 ч выдерживали при 21 °С для прорастания. Для оценки фитозащитного действия препарата проросшие семена высаживали в инфицированную фитопатогенами почву, для оценки фитостимулирующего действия препарата – в стерильную почву.

Обработку опытных растений проводили по следующей схеме:

- семена замачивали на 24 ч в 1 % рабочем растворе препарата;
- рассаду поливали под корень 1 % рабочим раствором при пикировке;
- растения двукратно опрыскивали 1 % рабочим раствором препарата с интервалом в две недели.

В контрольных вариантах аналогичная обработка проводилась водой.

Способность препарата сдерживать развитие заболеваний и защищать растения от поражения фитопатогенами оценивали на растениях капусты белокочанной (патоген – *Botrytis cinerea*), огурца (па-

* Авторы статьи – сотрудники кафедры генетики.

тоген – *Botrytis cinerea*) и томатов (патоген – *Pseudomonas corrugata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*). Инфекционный фон создавали искусственно путем внесения в почвогрунт суспензии фитопатогена (10 % от объема почвы). Для приготовления суспензии фитопатогенные грибы культивировали при 21 °С с аэрацией в жидкой картофельной среде в течение 10 сут, а для получения культуры фитопатогенных бактерий (*P. corrugata*) клетки выращивали в течение 48 ч при 21 °С с аэрацией.

Оценку фитозащитного действия комплексного биопрепарата определяли по снижению количества пораженных заболеванием опытных растений в сравнении с контролем. Для полной характеристики болезней применяли два показателя – распространенность и развитие. Развитие болезни фиксировали визуально по общему состоянию растений, доле пораженной поверхности органов растений и другим признакам и оценивали в зависимости от культуры по 5–6-балльной шкале [4].

Распространенность болезни P (%) определяли по формуле

$$P = \frac{n \cdot 100}{N},$$

где N – общее число обследованных растений в пробе, n – число больных растений в пробах.

Степень развития заболевания M (%) рассчитывали по формуле

$$M = \frac{\sum(a \cdot b) \cdot 100}{N \cdot k},$$

где a – число растений, b – соответствующий балл поражения, k – высший балл шкалы учета, N – общее количество учтенных растений.

Биологическую эффективность БЭ (%) препарата рассчитывали по формуле:

$$БЭ = \frac{Пк - По}{Пк} \cdot 100,$$

где $Пк$ – процент распространения заболевания в контроле, $По$ – процент распространения заболевания у обработанных растений.

Оценку фитостимулирующей активности биопрепарата Гулливер проводили на 10-е и 30-е сут выращивания растений. Ростостимулирующую активность комплексного препарата Гулливер оценивали по удельной биомассе, за которую принимали отношение сухой биомассы опытных растений к сухой биомассе контрольных, выраженное в процентах.

Результаты и их обсуждение

В качестве основы для создания нового комплексного биопрепарата Гулливер, предназначенного для стимуляции роста растений и защиты их от болезней, использован штамм *P. aureofaciens* А 8-6, обладающий высокой антибактериальной и антифунгальной активностью. В серии лабораторных экспериментов была изучена антагонистическая активность данного штамма. Было установлено, что клетки штамма *P. aureofaciens* А 8-6 проявляют антагонистическую активность в отношении ряда фитопатогенных бактерий (*E. aroideae* – 2 штамма, *E. carotovora* – 7, *E. herbicola* – 1, *P. atrofaciens* – 1, *P. glycinia* – 1, *P. lachrimans* – 2, *P. lupine* – 1, *P. pisi* – 1, *P. syringae* – 2, *P. vignae* – 1, *P. xanthochlora* – 1, *P. corrugata* – 1, *X. campestris* – 4 штамма) и фитопатогенных грибов (*A. alternata* – 1, *Ascochyta sp.* – 1, *Botrytis sp.* – 1, *B. cinerea* – 1, *Fusarium sp.* – 1, *F. avenaceum* – 2, *F. culmorum* – 3, *F. oxysporum* – 2, *F. sambucinum* – 1, *F. semitectum* – 1, *P. infestans* – 3, *S. sclerotiorum* – 1 штамм).

Новый биопрепарат Гулливер представляет собой комплекс биопестицида (жидкая культура штамма-антагониста *P. aureofaciens* А 8-6, титр не менее 10^9 кл./мл) и гуминовых кислот (регулятор роста растений Гидрогумат).

Как известно, гидролизат торфа в концентрации 0,0÷0,001 % (в пересчете на содержание органического вещества) проявляет биологическую активность, аналогичную действию фитогормонов – ауксинов, цитокининов и гиббереллинов, в связи с чем обладает высокими ростостимулирующими свойствами. Подобное действие проявлялось в интенсификации прорастания семян и ускорении деления клеток [5]. Ростостимулирующий эффект гидролизата торфа был подтвержден в экспериментах по изучению влияния гидролизата торфа на всхожесть и энергию прорастания семян ячменя и кукурузы [6].

При создании комплекса биопестицид-Гидрогумат необходимо было подобрать композиционный состав, который позволяет не только обеспечить фитостимулирующие свойства препарата, но и жизнеспособность клеток штамма-антагониста, входящего в его состав.

С целью подбора оптимального состава препарата Гулливер бактериальную суспензию, смешанную с препаратом Гидрогумат в различных соотношениях, хранили в холодильнике (10 ± 2 °С) и при

комнатной температуре (20 ± 2 °C). Учет результатов проводили на 14-е и 30-е сут хранения комплекса биопестицид-Гидрогумат. Полученные данные представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние концентрации гидрогумата торфа (9 %) на жизнеспособность клеток *P. aureofaciens* А 8-6

Соотношение биопестицид: Гидрогумат	Условия хранения, °C	Концентрация <i>P. aureofaciens</i> А 8-6, кл./мл		
		исходная	через 14 сут	через 30 сут
70:30	10±2	$2,7 \cdot 10^{10}$	$8,1 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$
	20±2	$2,7 \cdot 10^{10}$	$3,6 \cdot 10^5$	$7,9 \cdot 10^4$
90:10	10±2	$3,8 \cdot 10^{10}$	$7,2 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^9$
	20±2	$3,8 \cdot 10^{10}$	$2,9 \cdot 10^8$	$9,8 \cdot 10^7$
95:5	10±2	$2,2 \cdot 10^{10}$	$5,3 \cdot 10^9$	$4,0 \cdot 10^9$
	20±2	$2,2 \cdot 10^{10}$	$1,0 \cdot 10^9$	$3,1 \cdot 10^8$
99:1	10±2	$4,0 \cdot 10^{10}$	$6,8 \cdot 10^9$	$4,5 \cdot 10^9$
	20±2	$4,0 \cdot 10^{10}$	$5,0 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$

В ходе проведенных экспериментов установлено, что при температуре 10 ± 2 °C (хранение в холодильнике) количество жизнеспособных клеток в проверяемых образцах на 1–2 порядка выше, чем при комнатной температуре. Опираясь на полученные данные, можно сделать вывод о том, что при указанной температуре содержание в разрабатываемом комплексе препарата Гидрогумат на уровне $1 \div 10$ % от конечного объема является оптимальным для поддержания жизнеспособности клеток *P. aureofaciens* А 8-6. В данных вариантах концентрация клеток штамма-антагониста в комплексе не опускалась ниже уровня 10^9 кл./мл, что необходимо для обеспечения фитозащитной активности препарата. При создании нового комплексного биопрепарата Гулливер оптимальным является содержание в нем 95 % жидкой культуры *P. aureofaciens* А 8-6 и 5 % препарата Гидрогумат, что, с одной стороны, не вызывает гибели культуры штамма-антагониста, а с другой – достаточно для обеспечения фитостимулирующих свойств разрабатываемого препарата.

Поскольку препарат Гулливер в первую очередь предназначен для защиты растений от заболеваний бактериальной и грибной этиологии, в лабораторных условиях в системе *in planta* были проведены исследования способности разрабатываемого препарата подавлять развитие таких распространенных заболеваний сельскохозяйственных культур, как серая гниль, сосудистый бактериоз и фузариозное увядание.

В ходе изучения способности биопрепарата сдерживать развитие заболеваний овощных культур была продемонстрирована его высокая биологическая эффективность ($68 \div 89$ %) (табл. 2). Применение препарата Гулливер позволило не только снизить распространенность заболевания (на $60 \div 80$ %), но и уменьшить степень развития болезни в среднем на 50 %.

Таблица 2

Фитозащитная активность препарата Гулливер

Культура	Патоген	Распространенность заболевания, %		Степень развития болезни, %		Биологическая эффективность, %
		Гулливер	Контроль	Гулливер	Контроль	
Капуста Июньская	<i>B. cinerea</i>	25	100	8	58	75
Огурец Парижский корнишон	<i>B. cinerea</i>	10	90	4	55	89
Томат Ляна	<i>B. cinerea</i>	25	85	11	53	71
	<i>F. oxysporum</i>	30	95	14	54	68
	<i>P. corrugata</i>	20	100	5	69	80

Максимальная биологическая эффективность препарата (89 %) была отмечена в случае поражения огурцов серой гнилью. При обработке растений томатов, инфицированных *P. corrugata*, биологическая эффективность препарата составила 80 %, а степень развития заболевания снизилась с 69 до 5 %, т. е. на 64 %. Применение нового комплексного биопестицида позволило не только уменьшить проявления поражения растений фитопатогенами (увядание, хлоротичность, поражение листьев и стебля), но и предотвратить их гибель.

На заключительном этапе работы произведена оценка способности комплексного биопрепарата Гулливер стимулировать рост растений овощных культур. Результаты экспериментов, проведенных *in planta*, представлены на рис. 1 и в табл. 3. Был установлен стимулирующий эффект разрабатываемого препарата в отношении растений овощных культур. Первые признаки фитостимулирующего действия были зафиксированы у растений на стадии проростков (см. рис. 1). Подобный эффект характерен

для препаратов на основе продуктов переработки торфа [6] и подтверждает необходимость обработки семян по схеме применения биопрепарата Гулливер.

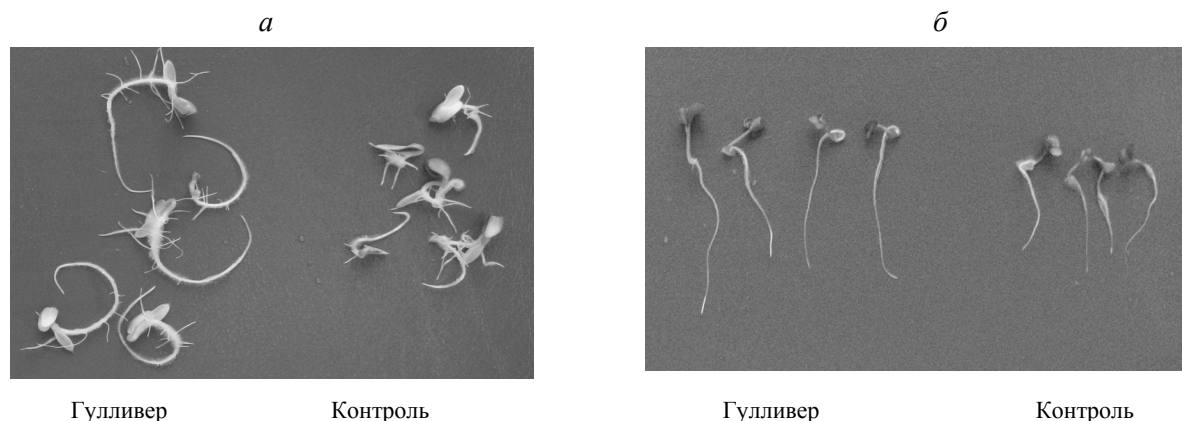


Рис. 1. Фитостимулирующая активность препарата Гулливер на проростках:
 а – огурца сорта Коралл, б – томата сорта Превосходный 176

Таблица 3

Фитостимулирующая активность препарата Гулливер

Культура	Стадия развития, сут	Удельная биомасса растений, %	
		надземная часть	корневая система
Капуста Белорусская 85	10	151	153
	30	155	160
	60	133	200
Томат Превосходный 176	10	147	151
	30	110	150
	60	142	185
Огурец Коралл	10	144	161
	30	159	145
	60	130	137

Фитостимулирующая активность препарата проявлялась как в отношении корней (отмечено повышение сухой биомассы по сравнению с контролем на 43÷60 %), так и в отношении надземной части растений (прирост сухой биомассы по отношению к контролю составил 10÷59 %). Наибольший биологический эффект препарата отмечали при обработке растений капусты. В этом случае сухая биомасса корневой системы растений возрастала в 1,6, а стебля – в 1,55 раза по сравнению с контролем.

Необходимо отметить также способность разрабатываемого препарата проявлять биологический эффект на ранних этапах развития растений. Сухая биомасса корневой системы 10-суточных растений возрастала в среднем в 1,5 раза, а побегов – в 1,44 раза, что существенно повышало качество рассады.

Таким образом, применение комплексного биопрепарата Гулливер в лабораторных условиях позволяет увеличить сухую биомассу опытных растений по сравнению с контролем в 1,1÷1,59 раза для надземной и в 1,43÷1,61 раза для корневой части растения, что подтверждает фитостимулирующий эффект разрабатываемого препарата.

На основе жидкой культуры природного штамма-антагониста *P. aureofaciens* А 8–6 (титр не менее 10⁹ кл./мл) и регулятора роста растений Гидрогумат создан препарат Гулливер.

Комплексный биопрепарат Гулливер обладает фитостимулирующей активностью и позволяет увеличить сухую биомассу растений сельскохозяйственных культур.

Биологическая эффективность комплексного биопрепарата Гулливер в отношении возбудителей заболеваний сельскохозяйственных культур составляет 68÷89 %. Максимальная эффективность отмечена в случае поражения огурцов серой гнилью. Применение препарата Гулливер не только позволяет снизить распространенность заболевания, но и уменьшает степень развития болезни в среднем на 50 %.

Полученные результаты позволяют оценить новый препарат как перспективный для борьбы с заболеваниями сельскохозяйственных культур.

1. Христева Л.А., Реутов В.А. Гуминовые удобрения: Теория и практика их применения: в 4 ч. Днепропетровск, 1973. Ч. 4. С. 308.
2. Feklistova I.N., Maslak D.V., Maksimova N.P. // World of lignohumate. 2009. May – June. P. 7.
3. Феклистова И.Н., Максимова Н.П. // Земляробства і ахова раслін. 2006. № 2. С. 42.
4. Хохряков М.К., Потлайчук В.И., Семенов А.Я., Элбакян М.А. Определитель болезней сельскохозяйственных культур. Л., 1984. С. 304.
5. Чайка М.Т., Наумова Г.В., Кабашникова Л.Ф., Шанбалович Г.Н. // Весці АНБ. Сер. біял. навук. 1993. № 4. С. 15.
6. Томсон А.Э., Наумова Г.В. Торф и продукты его переработки. Мн., 2009. С. 328.

Поступила в редакцию 19.10.10.

Диана Викторовна Маслак – научный сотрудник.

Инна Витальевна Можарова – научный сотрудник.

Вероника Александровна Смирнова – научный сотрудник.

Наталья Павловна Максимова – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой.