

Ю.А. Саламатова¹, О.М. Минаева¹, Е.Е. Акимова^{1,2}

¹Биологический институт Томского государственного университета (г. Томск)

²Научно-исследовательский институт биологии и биофизики

Томского государственного университета (г. Томск)

E-mail: biotech@sibmail.com

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХРАНЕНИЯ РЯДА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЖИДКОЙ ФОРМЕ

Аннотация. Рассмотрены динамика численности агентов и биологическая эффективность ряда биологических препаратов на основе псевдомонад в суспензионной форме при хранении в условиях низких положительных температур (+2...4°C) в течение шести месяцев. Установлено, что на протяжении периода хранения титр бактерий в препарате значительно снижается, в то время как биологическая активность остается на достаточно высоком уровне, а в ряде вариантов возрастает; в формировании биологической эффективности наибольшая роль принадлежит вторичным метаболитам клеток, накапливаемым в суспензионной культуре.

Ключевые слова: агробиотехнология; биологическая активность биопрепаратов; биофунгицид; *Pseudomonas*; хранение биопрепаратов.

В сложившихся условиях современного аграрного производства для получения биологически полноценной продукции растениеводства и сохранения плодородия почв необходимо экологически целесообразное хозяйствование. Крупные химические концерны по производству пестицидов во всем мире уже меняют стратегию деятельности. Располагая значительными ресурсами и научным потенциалом, они ориентируются на освоение новых, перспективных направлений, прежде всего в области биотехнологии и геномной инженерии [1]. Одним из наиболее динамично развивающихся направлений агробиотехнологии является создание и применение биопрепаратов комплексного действия на основе микроорганизмов, улучшающих корневое питание растений, стимулирующих их рост, защищающих от болезней и вредителей [2–7]. Особое внимание уделяется изучению микробиологических процессов, протекающих в почве, в ризосфере растений, и использованию ризосферных бактерий в качестве агентов контроля различных заболеваний сельскохозяйственных культур. Таким образом, пестицидный рынок РФ уже имеет целый перечень биопрепаратов и постоянно расширяется.

Известно, что наиболее распространенной группой микроорганизмов, являющихся агентами биопрепаратов, направленных на контроль фитопатогенов, являются бактерии рода *Pseudomonas*. Данная группа микроорганизмов обладает набором свойств, способствующих ускорению роста растений, увеличивающих урожайность сельскохозяйственных культур и защите растений от

ряда грибных заболеваний посредством производства антифунгальных метаболитов или путем формирования у растений системной резистентности [8–11].

Кроме оценки биологической активности, при создании биопрепаратов большое значение имеют технологичность штамма-агента биопрепарата, товарная форма, срок хранения, сохранность биологической активности и чистоты культуры на протяжении длительного периода времени.

На современном рынке представлен ряд препаративных форм: сухая (в основном для препаратов на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus*), паста или сгущенная биомасса клеток, гели и др. [12–13]. Однако наибольшее распространение получила жидкая форма препаратов, представляющая собой культуральную жидкость с клетками агента установленного титра, без стабилизаторов и консервантов. Такая форма, несмотря на ряд недостатков, заключающихся, прежде всего, в небольшом сроке хранения, неудобстве транспортировки, нестабильности свойств и т.д. [14], наименее трудо- и энергозатратна, не требует дополнительного оборудования и денежных вложений.

Таким образом, целью данной работы являлось изучение динамики биологической активности жидких биопрепаратов на основе ризосферных псевдомонад при их длительном хранении.

Объекты и методы исследования

В экспериментах использовались бактериальные культуры *Pseudomonas* sp. B-6798, *Ps. fluorescens* AP-33, *Ps. aureofaciens* BS 1393.

Бактерии *Ps. aureofaciens* BS 1393 являются агентами биопрепарата «Псевдобактерин-2», получены из музея культур Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН; бактерии *Ps. fluorescens* AP-33 – агенты биопрепарата «Планриз», разработанного НИИ генетики и цитологии АН Белоруссии; бактерии *Pseudomonas* sp. ВКПМ штамм B-6798 получены из музея лаборатории биокинетики и биотехнологии НИИ биологии и биофизики Томского государственного университета. Данный штамм непатогенных факультативных метилотрофных псевдомонад способен использовать формальдегид в составе минеральных сред в качестве единственного источника углерода и энергии в концентрации до 267 М (8 г/л) и обладает высокой биологической активностью по отношению к фитопатогенным грибам [15, 16].

Для выращивания агентов биопрепаратов использовалась питательная среда и технология, указанная в соответствующем ТУ [17]. Для культивирования формальдегидрезистентных псевдомонад использована минимальная минеральная среда М9 с формальдегидом (фдг) (2 г/л) или глюкозой (гл) (2 г/л) в качестве единственного источника энергетического субстрата, а также среда Кинга В [18–19]. Культивирование осуществлялось в колбах на 250 мл с 50 мл питательной среды на мешалках при температуре 25–27°C. После достижения фазы замедления роста бактериальная культура разливалась в стерильные флаконы на 30 мл из темного стекла. Объем культуры во флаконе составлял $\frac{3}{4}$ части объема сосуда. Эксперимент был заложен в пяти вариантах. На каждый вариант приходилось по шесть повторностей. Изуче-

ние динамики численности и биологической эффективности биопрепаратов проводилось каждые 15 сут на протяжении первых 2 мес. хранения и далее каждые 30 дней в течение 4 мес. в 3 повторностях на каждый вариант в одних и тех же флаконах. По истечении 6 мес. хранения исследовались как флаконы, в которых изучалась динамика на протяжении всего эксперимента, так и флаконы, которые хранились закрытыми в течение всего периода времени. Таким образом, невскрытые флаконы служили эталоном, т.к. при их хранении не было опасности заноса контаминантов при заборе проб.

В качестве тест-объектов использованы семена пшеницы сорта Новосибирская-15, суперэлита, средняя масса семени 0,04 г, общая всхожесть 90–94%.

Учет численности биологических агентов и наличия контаминантов осуществлялся методом разведения и посева на плотные питательные среды каждые 15 сут на протяжении первых 2 мес. хранения и далее каждые 30 дней в течение 4 мес. Наличие морфологически отличимых колоний свидетельствовало о присутствии в биопреparate посторонней микрофлоры или диссоциации бактерий активного штамма. Оценка ростостимулирующей и фунгистатической активности биопрепаратов проводилась одновременно с учетом бактериальной численности по результатам стандартной фитопатологической экспертизы семян в рулонах фильтровальной бумаги [20]. О наличии биологической активности биопрепаратов заключали по достижению значимости различий с контрольными вариантами, в которых семена обрабатывались водой, и опытными, в которых семена замачивались в рабочих растворах биопрепаратов (1:1000). Для выявления влияния вторичных бактериальных метаболитов на биологическую активность биопрепаратов проводилось осаждение клеток центрифугированием с дальнейшим отмывом от остатка питательной среды в физиологическом растворе (0,85%-ный раствор хлорида натрия) с повторным осаждением.

Данные, полученные в ходе экспериментов, обрабатывались с помощью пакета STATISTICA, версия 6.0. Оценка достоверности полученных результатов фитоанализа семян проводилась сравнением выборочных долей с учетом критерия Стьюдента для вероятностей 25–75% включительно, с учетом критерия Фишера для других значений вероятностей [21].

Результаты и их обсуждение

Одними из основных показателей качества биопрепаратов являются биологическая эффективность, которая для биофунгицидов оценивается по снижению скорости роста фитопатогенов, способность агентов стимулировать рост и развитие сельскохозяйственных культур, титр активного начала, а также сохранность полезных качеств препарата при его длительном хранении. В ТУ биопрепаратов установлен срок годности в форме суспензионных бактериальных культур на протяжении не более месяца со дня изготовления (Планриз) [17].

В лабораторных экспериментах проведена оценка динамики численности агентов ряда биологических препаратов на основе псевдомонад на протяжении 6 мес.

На рис. 1 на примере бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798, выращенных на среде Кинга В, представлена динамика численности агентов биопрепарата при его хранении в условиях низких положительных температур (+2...4°C).

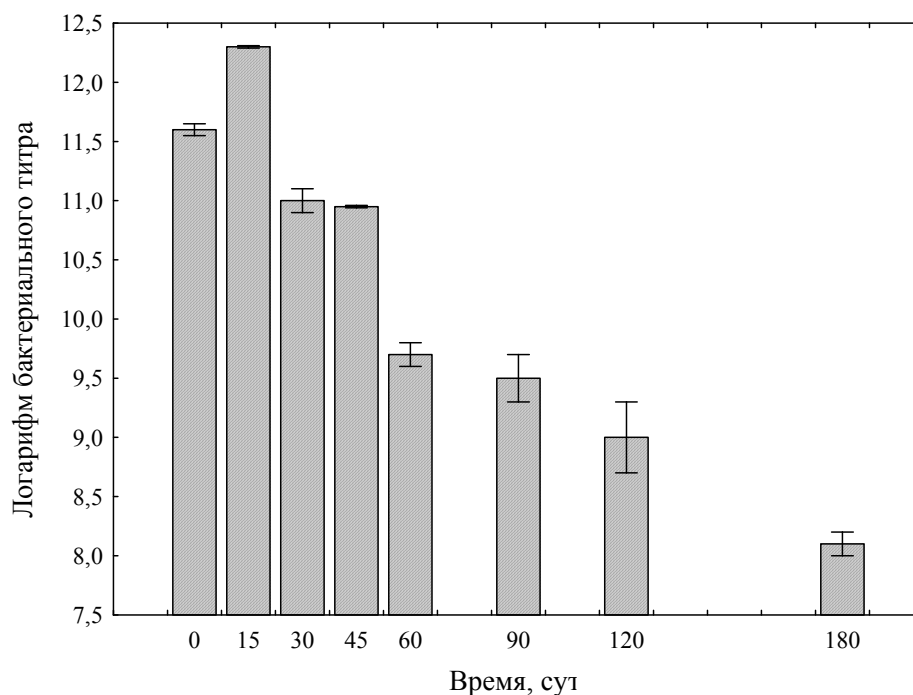


Рис. 1. Динамика численности бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798, выращенных на среде Кинга В, при хранении в суспензионной культуре

Известно, что для бактерий рода *Pseudomonas* увеличение бактериального титра может происходить даже при низких положительных температурах, которые были использованы при хранении жидкой суспензии биопрепарата, при наличии энергетического субстрата в культуральной жидкости. Несмотря на то что на хранение были заложены биопрепараты, в которых культивирование было остановлено на фазе замедления роста агента, полученные нами данные о динамике численности бактерий на протяжении первых 15 сут хранения показали, что для бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 во всех рассмотренных нами вариантах наблюдается остаточный рост бактериальной культуры и титр агента на протяжении данного периода значительно увеличился (рис. 1). Подобная закономерность при этом для бактерий *Ps. aureofaciens* BS 1393 и *Ps. fluorescens* AP-33 отмечена не была.

Далее на протяжении 6 мес. хранения наблюдается снижение бактериального титра агентов биопрепаратов, однако полной гибели бактерий не происходит. Так, для представленного на рис. 1 варианта эксперимента даже по истечении 6 мес. титр жизнеспособных бактерий оставался на значительно высоком уровне – порядка 10^7 КОЕ/мл.

Снижение бактериального титра связано не столько с истощением в среде энергетического субстрата и накоплением продуктов обмена клеток, сколько с ограниченностью запасов кислорода в упаковке биопрепарата. Особенно губительным этот факт оказался для культур, полученных при выращивании на токсичных средах, где кислород выступает основным лимитирующим субстратом для нейтрализации этих веществ путем включения в метаболический путь клеток. Так, для бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 на среде М9 с формальдегидом в качестве энергетического субстрата отмечена практически полная гибель клеток после второго месяца хранения.

На протяжении экспериментов суспензионные культуры большинства биопрепаратов оставались свободными от конгломерантов, посторонняя микрофлора была лишь в незначительном количестве отмечена в варианте с биопрепаратом «Псевдобактерин-2», при этом ее численность оставалась незначительной и не превышала 1% от общего бактериального титра, что вполне допустимо по ТУ. Для формальдегидутилизующих псевдомонад на среде Кинга В на протяжении учетов было отмечено возникновение «нестандартного» вида колоний: они отличались более крупными размерами с шероховатой поверхностью и неровным краем, в то время как для данного штамма характерны колонии с гладкой блестящей поверхностью и ровным краем. При проведении теста с бромтимоловым синим и формальдегидом для диссоциантов отмечено изменение цвета индикатора, указывающего на закисление среды, характерное для метаболизма бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 при утилизации данного токсичного соединения, и установлено, что данные бактерии не утратили способность к окислению формальдегида до муравьиной кислоты, что подтверждает их штаммовую принадлежность, а не наличие заражения культуры посторонней микрофлорой. Количество данных диссоциантов после трехмесячного хранения было равным численности основной формы агента.

Одновременно с учетом численности бактериальных агентов проводилось определение биологической активности биопрепаратов (определение фунгистатических и ростстимулирующих свойств). Для этого независимо от титра бактериальной суспензии использовалось разведение, рекомендованное для применения биопрепаратов (1:1000).

На основании полученных результатов определялась корреляция между параметрами биологической активности биофунгицидов, сроком хранения и численностью агентов препарата в суспензии (табл. 1).

Несмотря на значительное падение бактериального титра, биологическая эффективность большинства биопрепаратов, в частности фунгистатическая, не только осталась на высоком уровне, но и продолжала расти на протяжении практически всего срока хранения, о чем свидетельствуют высокие положительные статистически значимые коэффициенты корреляции. Для ряда вариантов эксперимента, при оценке ростстимулирующей активности бактерий, сохранилась аналогичная тенденция. В то время как ростстимулирующая активность биопрепарата на основе бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798, выращенного на среде Кинга В, на протяжении всего срока хранения не изменилась. Кроме того, применение биопрепарата «Планриз» положительно сказа-

лось на увеличении длины проростка, но увеличилось и ингибирование всхожести семян, о чём свидетельствует отрицательный коэффициент корреляции.

Т а б л и ц а 1

Коэффициенты корреляции между параметрами биологической активности биопрепаратов, численностью агентов и сроком хранения

Вариант биопрепарата	Срок хранения				Численность агентов биопрепарата		
	Численность	Фунгистатическая эффективность	Всхожесть	Длина проростков	Фунгистатическая эффективность	Всхожесть	Длина проростков
Псевдобактерин-2	-0,58*	0,89*	0,55*	0,47*	-0,36	0,03	-0,89*
Планриз	-0,24	0,70*	-0,34	0,49*	-0,28	0,53*	-0,45*
<i>Pseudomonas</i> sp. В-6798 на среде М9 с фдг	-0,41*	0,85*	0,44*	0,51*	-0,28	0,12	-0,60*
<i>Pseudomonas</i> sp. В-6798 на среде М9 с гл	-0,29	0,78*	0,77*	0,50*	-0,44*	-0,41*	-0,45*
<i>Pseudomonas</i> sp. В-6798 на среде Кинга В	-0,74*	0,83*	0,14	0,04	-0,53*	0,14	-0,10

* $p < 0,05$.

Коэффициенты корреляции между показателями биологической активности препаратов и титром биологических агентов или отрицательные (это означает, что с уменьшением бактериального титра и фунгистатическая, и ростстимулирующая эффективность биопрепаратов значимо увеличилась), или статистически не значимые (свидетельствует об отсутствии зависимости между показателями). На основании этого можно заключить, что в динамике биологической эффективности препаратов значительная роль, по всей видимости, отведена вторичным метаболитам бактерий, концентрация которых, как известно, максимальна в стационарную фазу развития культуры, а также может возрастать в фазу деструкции, если эти метаболиты не служат субстратами для самих микробов. Следует учесть, что суспензионные культуры хранились при низких положительных температурах, которые значительно снижали метаболизм агентов, а соответственно увеличивали сохранность метаболитов.

Исключение наблюдалось при анализе зависимости всхожести семян при обработке биопрепаратом «Планриз» от численности агентов, где наблюдается значимый положительный коэффициент, а значит основная статистически

значимая роль в стимуляции всхожести, по всей видимости, отведена непосредственно бактериальным клеткам.

Для выявления роли вторичных метаболитов в биологической эффективности препаратов была проведена серия экспериментов, в которой жидкие суспензионные культуры до и после хранения центрифугировались, а надосадочная жидкость и осадок клеток, доведенный до прежнего объема физиологическим раствором, анализировались на наличие или отсутствие полезных свойств (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Ростостимулирующая и фунгистатическая активности супернатанта и осадка бактериальных клеток ряда биопрепаратов, %

Биопрепарат	Вариант	Ростостимулирующая активность		Фунгистатическая активность	
		Свежая культура	Культура после хранения	Свежая культура	Культура после хранения
<i>Pseudomonas</i> sp. В-6798 на среде М9 с фдг	Супернатант	51,0±3,2	33,0±4,0	89,0±7,2	100,0±2,0
	Осадок	12,5±1,2	2,0±0,3	78,0±6,0	30,8±2,9
<i>Pseudomonas</i> sp. В-6798 на среде с гл	Супернатант	71,7±5,0	17,8±2,0	38,9±2,2	61,5±3,4
	Осадок	9,2±1,3	-4,5±1,5	66,7±4,2	23,0±2,8
<i>Pseudomonas</i> sp. В-6798 на среде Кинга В	Супернатант	38,3±2,9	85,2±6,8	66,7±6,2	69,0±5,5
	Осадок	28,3±2,0	43,7±4,0	78,0±7,6	53,8±5,8
Планриз	Супернатант	54,2±4,1	11,0±2,3	83,0±6,2	61,5±4,9
	Осадок	23,0±3,0	5,9±1,0	67,0±6,5	92,0±5,0

Обнаружено, что в ростостимулирующей активности, как в свежих препаратах, так и после их длительного хранения, наибольшая роль принадлежит метаболитам бактериальных клеток, т.к. эффективность от применения супернатанта почти во всех рассмотренных вариантах достоверно превышает эффективность применения самих клеток, отмытых от остатка культуральной жидкости. Причем данный факт на ранних сроках хранения более характерен для микробных культур, полученных на бедных минеральных средах, тогда как для культур, полученных на богатой питательной среде, роль метаболитов становится более отчетливой после периода хранения. Интересно, что на фоне общего падения ростостимулирующей эффективности бактериальных препаратов после хранения у биопрепарата на основе бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798, выращенных на среде Кинга В, наблюдается значительное увеличение способности стимулировать рост растений как для самих клеток (в 1,6 раза), так и для супернатанта (в 2,2 раза).

При анализе фунгистатической активности препаратов на ранних сроках хранения четкой роли метаболитов отмечено не было, а для ряда препаратов (*Pseudomonas* sp. В-6798 на среде Кинга В и минеральной среде с глюкозой в качестве энергетического субстрата) антифунгальная активность самих клеток значительно превышает эффективность супернатанта. После хранения препаратов в формирование фунгистатической эффективности, как правило, наибольшая роль отведена культуральной жидкости с метаболитами клеток, тогда как эффективность от применения самих клеток снижается. Исключение из рассмотренных вариантов составляет биопрепарат «Планриз», где после хранения фунгистатическая активность клеток возросла, а эффективность от применения супернатанта заметно снизилась.

Таким образом, несмотря на общепринятый срок хранения биопрепаратов жидкой формы на основе ризосферных псевдомонад, не превышающий месяца, рассмотренные биофунгициды можно с успехом применять даже после полугодового хранения в условиях низких положительных температур (+2...4°C) для стимуляции прорастания семян и защиты от семенных инфекций, т.к., несмотря на значительное падение численности агентов препаратов, биологическая эффективность сохраняется, а нередко и возрастает за счет метаболитов бактериальных клеток, накапливаемых в культуральной жидкости. Однако эффект от применения длительно хранящихся препаратов, вероятно, будет значительно ниже, чем при применении препаратов с небольшим сроком хранения, т.к. численность агентов в них недостаточна для успешного закрепления и конкуренции агентов биоконтроля в ризосфере сельскохозяйственных культур.

Литература

1. Захаренко В.А. Биотехнология и генная инженерия в защите растений // Защита и карантин растений. 1998. № 5. С. 15–18.
2. Надыкта В.Д. Перспективы биологической защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов // Защита и карантин растений. 2004. № 6. С. 26–28.
3. Сидоренко О.Д. Действие ризосферных псевдомонад на урожайность сельскохозяйственных культур // Агрохимия. 2001. № 8. С. 56–62.
4. Alstrom S. Characteristics of bacteria from oilseed rape in relation to their biocontrol activity against *Verticillium dahlia* // J. Phytopathology. 2001. № 149. P. 57–64.
5. Benizri E., Baudon E., Guckert A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria // Biocontrol science and technology. 2001. № 11. P. 557–574.
6. Berg G., Fritze A., Roskot N., Smalla K. Evaluation of potential Biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb // Journal of applied microbiology. 2001. № 91. P. 963–971.
7. Минаева О.М., Акимова Е.Е., Евдокимов Е.В. Кинетические аспекты ингибирования роста фитопатогенных грибов ризосферными бактериями // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44, № 5. С. 565–570.
8. Klopfer J.W. Review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR. 6-th International PGPR Workshop. 5–10 October 2003. Calcut. India. P. 81–92.
9. Zehnder G.W., Murphy J.F., Sikora E.J., Klopfer J.W. Application of Rhizobacteria for induced resistance. European journal of plant pathology. 107. 2001. P. 39–50.
10. Persello-Cartieaux F. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. Vol. 26. P. 189–196.

11. Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соросовский журнал. 1998. № 10. С. 25–31.
12. Штерниис М.В., Джалилов Ф.С., Андреева И.В., Томилова О.Г. Биопрепараты в защите растений. Новосибирск: НГАУ, 2000. 128 с.
13. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Издание официальное. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. 2009. 420 с.
14. Терещенко Н.Н. Проблемы и перспективы применения бактериальных препаратов в сельскохозяйственной практике // Томский агровестник. 2004. № 2. С. 39–46.
15. Штамм бактерий *Pseudomonas* sp., используемый для утилизации формальдегида и способный при этом потреблять формальдегид в качестве единственного источника углерода и энергии в бедной минеральной среде. Пат. 2102474 Рос. Федерация / Е.В. Евдокимов, М.В. Миронов, А.В. Евдокимов, Е.В. Корниевская. Приоритет 09.11.1995. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений 20 января 1998 г. 8 с.
16. Минаева О.М., Акимова Е.Е., Семенов С.Ю. Антагонистическое действие на фитопатогенные грибы и стимулирующее влияние на рост и развитие растений формальдегидутилизующих бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 // Вестник ТГУ. Биология. 2008. № 2 (3). С. 28–42.
17. Технический регламент по производству биопрепарата «Планриз» / В.Г. Сычёв. 1998. 36 с.
18. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Под ред. С.И. Алиханяна. М.: Мир, 1976. 436 с.
19. Stolp H., Gadkari P. Nonpathogenic Members of the Genus *Pseudomonas* // The Prokaryotes. 1981. Vol. 1. P. 719–741.
20. Чулкина В.А., Коняева Н.М., Кузнецова Т.Т. Борьба с болезнями сельскохозяйственных культур Сибири. М.: Россельхозиздат, 1987. 252 с.
21. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.

Поступила в редакцию 17.11.2009 г.

Julia A. Salamatova¹, Oksana M. Minaeva¹, Elena E. Akimova^{1,2}

¹Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia

²Research Institute of Biology and Biophysics of Tomsk State University, Tomsk, Russia
E-mail: biotech@sibmail.com

EFFECTIVENESS OF STORING SOME BACTERIAL PREPARATIONS IN LIQUID FORM

Summary. The dynamics of a number of agents and biological effectiveness of some biological preparations on the basis of pseudomonades in suspension form was studied while being stored at low positive temperatures (+2...4°C) for a period of six months. It was found out that bacterial titer in the preparation decreases significantly during the studied period of storing whereas the biological activity of the preparation maintains at a rather high level and increases in a number of variants. The obtained experimental data showed that secondary cell metabolite accumulated in suspension culture plays the greatest role in forming biological effectiveness while storing preparations.

Key words: agrobiotechnology; biological activity of biopreparations; biofungicide; *Pseudomonas*; biopreparation storage.

Received November 17, 2009