

УДК 579.852.1+631.573

Э. И. КОЛОМИЕЦ

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by

Селектированы антибиотикоустойчивые штаммы бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas* с повышенной антагонистической активностью. Установлена их высокая адаптационная способность в микробоценозах почв и филлоплане растений, устойчивость к химическим пестицидам, что в совокупности с выраженной антагонистической активностью обеспечивает перспективность использования исследуемых культур в качестве потенциальных интродуцентов для контроля возбудителей болезней растений. Предложены способы повышения антагонистической активности полученных штаммов, основанные на кратковременном воздействии на бактериальные клетки стресс-факторов – температурного или осмотического шока. Показано, что перспективы создания высокотехнологичных товарных форм биопрепаратов связаны с иммобилизацией исследуемых бактериальных культур на твердом носителе (трепеле) или в гелях.

Ключевые слова: бактерии-антагонисты, антимикробная активность, стресс-факторы, биопрепараты, препаративные формы.

E. I. KOLOMIETS

NEW APPROACHES TO ESTABLISHMENT OF PLANT BIOLOGICAL CONTROL AGENTS

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, e-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by

Drug-resistant variants of bacteria representing genera *Bacillus* and *Pseudomonas* showing enhanced antagonistic activity were selected. High adaptation capacity of sporulating bacteria and resistance to chemical pesticides coupled to significant antagonistic activity was revealed in soil microbial cenoses and plant phyloplane to ensure their potential introduction in comprehensive systems of plant protection. The methods to increase antagonistic activity of the selected strains by short-term exposure of bacterial cultures to stress factors – temperature or osmotic shock were proposed. The prospects of generating high-tech commodity forms of biopreparations are directly related to microbial cell immobilization on solid support (trepel) or in gels.

Keywords: bacteria-antagonists, antimicrobial activity, stress factors, biopreparations, preparative (preparation) forms.

Введение. Необходимость производства и широкого применения биологических средств защиты растений в качестве альтернативы пестицидам при переходе к экологическому сельскому хозяйству обусловлена имеющимися проблемами резистентности патогенных микроорганизмов и негативными последствиями применения агрохимикатов.

По данным ФАО–ВОЗ, из 28 наиболее широко распространенных химических пестицидов 23 обладают канцерогенными свойствами, оказывая отрицательное воздействие на природные экобиосистемы и агроценозы. В этой связи в странах с высокой пестицидной нагрузкой разработаны государственные программы, предусматривающие снижение уровня применения химических пестицидов в 2 раза за счет внедрения биопрепаратов. И хотя доля биопестицидов на мировом рынке пестицидов в настоящее время составляет чуть больше 2 %, их применение с каждым годом увеличивается. Так, в 2012 г. объемы продаж биопестицидов компаниями BASF, Bayer CorpScience, Singenta составили 2 млрд долл. США, к 2016 г. специалисты прогнозируют их рост до 3 млрд долл., к 2020 г. – до 6,2 млрд долл. Приведенные данные свидетельствуют о благоприятных перспективах

развития мирового рынка биологических средств защиты растений, что связано в первую очередь с ростом спроса на экологически чистую продукцию [1–3].

Признанными лидерами по применению биологических методов защиты растений выступают Бельгия, Нидерланды, Люксембург, США, активно внедряющие и пропагандирующие органическое земледелие для получения высококачественной сельскохозяйственной продукции.

Таким образом, в связи с общемировой тенденцией к экологизации сельского хозяйства и все более широким употреблением продуктов органического земледелия роль биопестицидов с каждым годом увеличивается. Остается значимым и включение биопрепаратов в интегрированную защиту растений, что позволяет минимизировать использование химических пестицидов.

В Институте микробиологии НАН Беларуси в ходе реализации межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии», ГНТП «Промышленные биотехнологии» разработаны и внедрены в производство технологии получения и применения ряда отечественных биологических средств защиты растений – биофунгицидов Бетапротектин, Фрутин, Фитопротектин, Экогрин, Бактосол, биоинсектицида Бацитурин, препаратов комплексного действия Ксантрел (с инсектицидной и антимикробной активностью) и Полибакт (с целлюлолитической, антимикробной, фосфатмобилизующей и азотфиксирующей активностью) [4, 5].

На настоящем этапе остро встают задачи повышения конкурентоспособности биопрепаратов и обеспечения рынка новыми ресурсосберегающими технологиями. Весьма актуальными являются исследования, направленные на получение высокоактивных штаммов микроорганизмов – антагонистов и энтомопатогенов, совершенствование методов культивирования потенциальных интродуцентов, разработку и создание новых товарных форм биопрепаратов пролонгированного действия, что и явилось целью настоящей работы.

Материалы и методы исследования. В работе использованы выделенные и отселектированные нами штаммы бактерий-антагонистов: *Bacillus subtilis* БИМ В-439 – основа биопестицида Бетапротектин, предназначенного для защиты сахарной свеклы от кагатной гнили, и *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 – основа биопестицида Экогрин для защиты огурца и зеленных культур в условиях малообъемной гидропоники. Штаммы характеризуются высокой антимикробной активностью в отношении широкого спектра возбудителей болезней сахарной свеклы и огурца.

В качестве тест-объектов использованы штаммы фитопатогенных грибов родов *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Monilia*, *Sphaeropsis* и фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* специализированной коллекции фитопатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси.

Глубинное культивирование бактерий-антагонистов осуществляли в колбах Эрленмейера на качалке (200 об/мин, при температуре 28–30 °С) в течение 24 ч (для получения клеточной культуры) либо 72 ч (для получения споровой культуры *Bacillus subtilis* БИМ В-439) на модифицированной питательной среде Мейнелла: меласса – 30,0; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 7,0; KH_2PO_4 – 3,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,5; Na-цитрат – 0,5; вода дистиллированная – до 1 л.

Культуры фитопатогенных тест-объектов выращивали в колбах Эрленмейера на питательной среде (бульон Хоттингера – 50,0; глюкоза – 10,0; пептон – 5,0; NaCl – 5,0; агар-агар – 12,0–20,0; вода водопроводная – до 1 л), на качалке (200 об/мин, при температуре 28–30 °С) в течение 24 ч (бактерии), 72 ч (грибы).

Для стимулирования физиологической активности потенциальных интродуцентов на бактериальные клетки воздействовали различными стресс-факторами, в частности такими, как тепловое воздействие (50, 65, 80 °С) и осмотический шок (обработка клеток хлоридом натрия в концентрации 5 %).

При изучении влияния теплового шока колбы с 50 мл клеточной и споровой бактериальной культурой помещали на терморегулируемую качалку, выдерживали в течение 30 мин при температурах 50, 65, 80 °С и затем определяли титры клеточной культуры и спор методом предельных разведений. В качестве контроля использовали бактериальную культуру, выдержанную 30 мин на качалке при 30 °С. Прогретую при различных температурных режимах жидкую культуру бактерий использовали для инокуляции свежей питательной среды.

Для исследования влияния осмотического шока 50 мл клеточной или споровой бактериальной культуры помещали в колбы Эрленмейера, содержащие стерильный хлорид натрия в количестве, соответствующем конечной концентрации в растворе 0,9; 5; 7 и 10 %, и выдерживали на качалке (200 об/мин, при температуре 28–30 °С) в течение 2 ч. Затем определяли титр культуры и спор методом предельных разведений. Подвергнутая осмотическому шоку культура использовалась в качестве инокулюма для засева свежей питательной среды.

Антагонистическую активность бактериальной культуры оценивали методом лунок [6]. Результаты учитывали после 18–24 ч инкубации при температуре 28–30 °С по диаметру зон задержки роста тест-культур.

Ферментативную активность бактерий (хитиназную, протеазную) определяли в бесклеточной культуральной жидкости (КЖ) [7, 8].

Влияние КЖ бактерий на прорастание спор и развитие мицелия фитопатогенных грибов изучали методом агаровой пластинки [9]. Пластинки из картофельно-глюкозного агара наносили на предметные стекла, инокулировали споровой суспензией фитопатогенного гриба и КЖ антагониста, помещали во влажные камеры в чашки Петри и инкубировали при 24 °С. Морфологические изменения фитопатогенных грибов под действием бактерий-антагонистов изучали под световым микроскопом Kozo Optics XJS 500 при 160-кратном увеличении с помощью цифровой камеры Microscope Digital Camera MDC 560.

Антибиотикорезистентные формы штаммов бактерий-антагонистов с целью генетического маркирования получали по методу Миллера [10]. Отбор спонтанных мутантов, обладающих резистентностью к стрептомицину и рифампицину, осуществляли путем последовательных пересевов бактерий на мясо-пептонный агар с постепенно возрастающими концентрациями антибиотиков.

Для получения высокотехнологичной товарной формы биопрепаратов использовали иммобилизацию клеток бактерий-антагонистов в альгинате натрия [11] и на твердом носителе – природном тонкодисперсном сорбенте трепеле.

Фитозащитное действие препарата Бетапротектин оценивали в микровегетационных экспериментах с использованием семян узколистного люпина (сорт Вясковы), инфицированных фитопатогенным грибом *C. Cladosporioides*, методом, основанным на сравнительном изучении всхожести семян и степени развития проростков сельскохозяйственных культур [12]. Экспериментальный образец биопрепарата Бетапротектин в иммобилизованной форме вносили из расчета 1 г/100 г почвы. В качестве контроля использовали дистиллированную воду, а также жидкий препарат Бетапротектин.

При статистической обработке результатов экспериментов определяли средние арифметические и их доверительные интервалы для уровня вероятности 95 % [13].

Результаты и их обсуждение. Ключевым этапом создания биологических средств защиты от патогенов и вредителей является получение штаммов микроорганизмов с высокой антагонистической и/или энтомоцидной активностью. Существующие ограничения на использование в открытых системах рекомбинантных штаммов определяют важность селекционных работ по получению интродуцентов с заданными свойствами, способных в условиях агробиоценозов эффективно контролировать развитие патогенных видов. Поставленные задачи решаются с помощью разнообразных методов выделения и отбора потенциальных агентов биологического контроля патогенов и вредителей. В частности, тепловая обработка образцов обеспечивает преимущественное выделение термоустойчивых спорообразующих бактерий рода *Bacillus*, тогда как применение селективных питательных сред позволяет, например, выделить изоляты с выраженной хитиназной активностью для контроля фитопатогенных грибов.

Использование указанных подходов позволило нам создать коллекцию штаммов микроорганизмов-антагонистов и энтомопатогенов, перспективных для разработки новых биопрепаратов. На основе наиболее активных культур селектированы антибиотикоустойчивые варианты, обладающие более высокой, чем у исходных штаммов, антагонистической активностью. На примере полученных генетически маркированных мутантных штаммов бактерий-антагонистов установлена высокая адаптационная способность спорообразующих бактерий в микробиоценозах почв

и филлоплане растений, а также устойчивость к химическим пестицидам, что в совокупности с выраженной антагонистической активностью обеспечивает эффективность и стабильность их фитозащитного действия в интегрированных системах защиты растений.

Многолетние исследования по изучению влияния различных факторов окружающей среды на клетки микроорганизмов свидетельствуют, что для направленной регуляции метаболизма и стимулирования физиологической активности последних целесообразно использовать ряд природных, достаточно «мягких» стресс-факторов, которые позволяют «подтолкнуть» клетки к активации необходимых процессов и реакций без непосредственного вмешательства в геном. Согласно современным представлениям, стрессогенными факторами считают экстремальные значения pH и температуры, высокие концентрации солей, ультрафиолетовое и радиоволновое излучение, магнитный вакуум, электрический ток [14].

Нами установлено (рис. 1), что использование в производстве биофунгицида Бетапротектин посевного материала, предварительно подвергнутого тепловому воздействию (65 °С, 30 мин) или осмотическому шоку (обработка клеток хлоридом натрия в концентрации 5 %), обеспечивает повышение антагонистической активности биопрепарата в отношении фитопатогенных грибов *Botrytis cinerea* и *Fusarium redolens* (возбудителей кагатной гнили сахарной свеклы) на 15 и 30 % соответственно, причем максимум активности достигается на 12–24 ч быстрее, чем в контроле с необработанным инокулятом.

Разработанные способы физиологической активации бактерий-антагонистов *Bacillus subtilis* БИМ В-436 апробированы в промышленных испытаниях биопрепарата Бетапротектин на сахарной свекле против кагатной гнили. Прогрев биопрепарата непосредственно перед обработкой корнеплодов обеспечил увеличение его биологической эффективности до 69,7 %, что на 26,7 % выше, чем в контроле (без прогрева). Таким образом, проведенные исследования позволили усовершенствовать технологию производства и повысить конкурентоспособность биопестицида Бетапротектин.

В целях выяснения характера взаимоотношений исследуемых микроорганизмов-антагонистов с фитопатогенами оценена протеолитическая и хитинолитическая активность бактерий *B. subtilis* БИМ В-439 и показана роль гидролитических ферментов в фитозащитном действии культуры. Установлено также, что способность штамма *B. subtilis* БИМ В-439 контролировать развитие фитопатогенного гриба *F. oxysporum* связана с продукцией антифунгального антибиотика полипептидной природы, тогда как антагонистическое действие бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 обусловлено метаболитом, относящимся к группе флороглюциновых антибиотиков. Экспериментально подтверждено, что антифунгальное действие исследованных бактерий-антагонистов *B. subtilis* и *P. brassicacearum* проявляется в наибольшей степени на стадиях

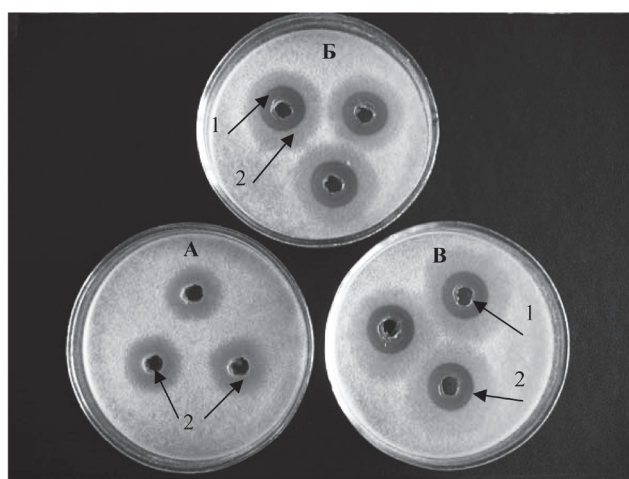


Рис. 1. Антагонистическая активность жидкой культуры *Bacillus subtilis* БИМ В-436, полученной при использовании необработанного (А), подвергнутого тепловому (Б) и осмотическому (В) воздействию посевного материала:

1 – зона полного подавления роста гриба, 2 – зона задержки роста воздушного мицелия

прорастания спор и формирования ростовых трубок фитопатогенных грибов и приводит к морфологическим изменениям гиф (вакуолизации, образованию опухолообразных структур) и ослаблению роста мицелия.

На примере бактерий *P. brassicacearum* БИМ Б-446 показано ингибирующее действие бактерий-антагонистов на развитие мицелия фитопатогенных грибов (рис. 2).

Так, ингибирование гриба *C. cladosporioides* БИМ F-593 выражалось в основном в образовании большого количества добавочных гиф, не способных развиваться в полноценный мицелий. Воздействие антагониста на гриб *M. fructigena* F-560 проявлялось в повышенной пролиферации и округлении концевых гиф мицелия, а на гриб *S. sapina* F-557 – в изменении мицелия с образованием крупных шарообразных вздутий темного цвета.

В настоящее время большинство отечественных биопестицидов представляют собой культуральную жидкость микроорганизмов-антагонистов с концентрацией спор и вегетативных клеток на уровне 1–4 млрд. Жидким препаративным формам свойственны такие недостатки, как непродолжительный срок хранения (около 3 мес.), неустойчивость к физико-химическим воздействиям, низкая приживаемость интродуцентов в реальных экосистемах, что ведет к снижению их биологической эффективности.

Для обеспечения конкурентоспособности средств биологического контроля патогенов весьма актуальными являются исследования, направленные на совершенствование товарных форм биопрепаратов с целью повышения приживаемости интродуцентов в биоценозах, устойчивости их к физико-химическим воздействиям окружающей среды, стабильности конечного продукта.

С этой целью обычно применяют различные методы иммобилизации микроорганизмов-антагонистов, основанные на мембранных технологиях или предусматривающие адсорбцию клеток на твердых носителях, включение их в пространственную структуру гелей.

Для иммобилизации бактерий-антагонистов нами использован коллоидный раствор альгината натрия в концентрации 1–4 %. Смесь альгината натрия и жидкой культуры бактерий в соотношении 1:1 по каплям добавляли в 0,2 М раствор хлорида кальция, в результате чего были получены гранулы с включенными в них бактериальными клетками. Установлено (см. таблицу), что

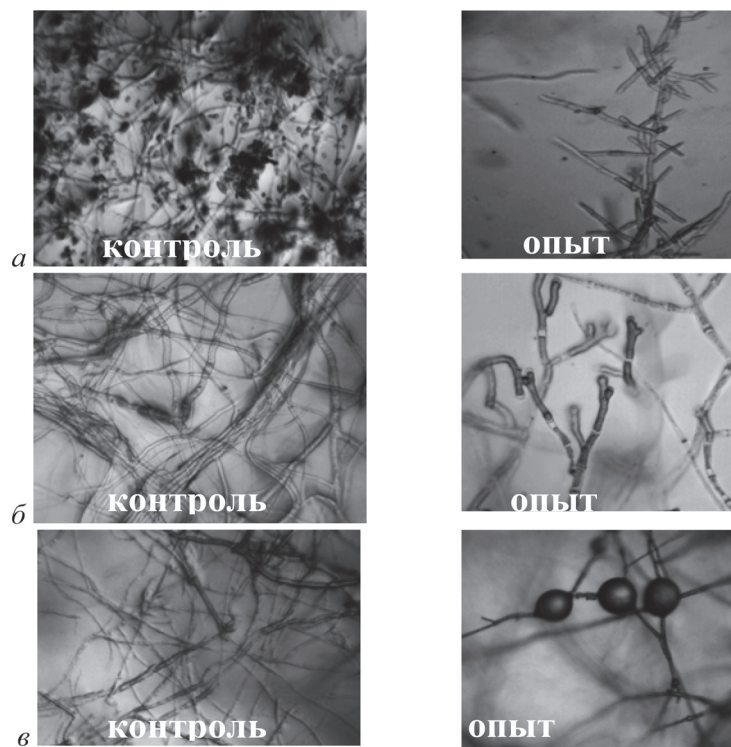


Рис. 2. Действие бактерий *P. brassicacearum* БИМ Б-446 на мицелий фитопатогенных грибов *C. cladosporioides* БИМ F-593 (а), *M. fructigena* БИМ F-560 (б), *S. sapina* БИМ F-557 (в)

бактерии-антагонисты, иммобилизованные в альгинатных гранулах, при интродукции в почву не только хорошо сохраняют жизнеспособность, но и обеспечивают длительный фитозащитный эффект.

Сохранность бактерий-антагонистов в жидкой и иммобилизованной формах биопрепаратов

Форма препарата	Исходный титр бактерий	1-й месяц хранения	2-й месяц хранения	3-й месяц хранения
Сохранность культуры в препарате при 7 °С, КОЕ/мл				
Бетапротектин жидкий	$2,0 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^9$
Бетапротектин иммобилизованный	$1,8 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^9$	$1,7 \cdot 10^9$	$1,7 \cdot 10^9$
Экогрин жидкий	$1,0 \cdot 10^{10}$	$9,0 \cdot 10^9$	$6,0 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^9$
Экогрин иммобилизованный	$8,0 \cdot 10^9$	$8,0 \cdot 10^9$	$7,0 \cdot 10^9$	$6,0 \cdot 10^9$
Сохранность культуры в почве, КОЕ/г				
Бетапротектин жидкий	$2,0 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^7$	$9,0 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$
Бетапротектин иммобилизованный	$1,2 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$7,9 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$
Экогрин жидкий	$1,0 \cdot 10^9$	$4,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$
Экогрин иммобилизованный	$8,0 \cdot 10^8$	$7,3 \cdot 10^8$	$6,7 \cdot 10^8$	$6,0 \cdot 10^8$

Диаметр зон ингибирования роста фитопатогенных грибов антагонистами зависел от таких важнейших факторов, влияющих на поступление кислорода к иммобилизованным клеткам, как размер альгинатных гранул и содержание в них альгината. Средний диаметр гранул в различных сериях образцов составлял 0,5–0,6; 1,0–1,5 и 2,0–3,0 мм. Степень подавления патогена *F. oxysporum* коррелировала с диаметром гранул и возрастала по мере его увеличения от 3 до 7 мм (рис. 3).

Использование гранул с повышенной концентрацией альгината натрия, наоборот, приводило к снижению антифунгальной активности вследствие замедления диффузионных процессов.

Наряду с альгинатным гелем в качестве твердого носителя для иммобилизации клеток нами рекомендовано применение трепела – рыхлой, тонкопористой опаловой осадочной породы, состоящей из мелких сферических глобул размером 0,01–0,001 мм с примесью глинистых минералов, глауконита, кварца, полевых шпатов. Препарат Бетапротектин, полученный путем иммобилизации бактерий-антагонистов на трепеле, представляет собой комплекс, состоящий из жидкой культуры штамма-антагониста (30 % от веса носителя), непосредственно самого носителя и 0,5 % гуматов, введение которых в состав препарата существенно улучшает выживаемость бактерий и увеличивает титр КОЕ в 2 раза. Такое сочетание компонентов позволяет сохранить в течение

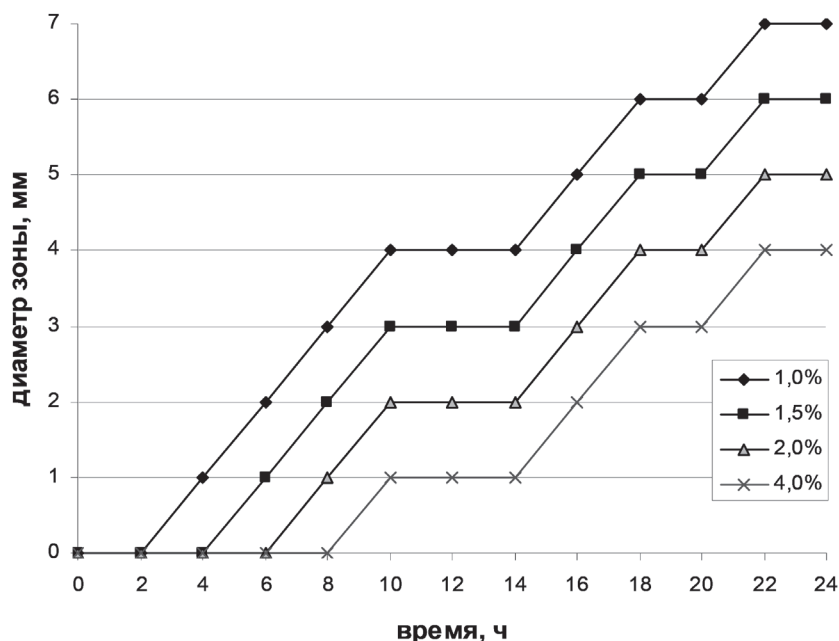


Рис. 3. Динамика изменения диаметра бактериального газона *B. subtilis* БИМ В-439 вокруг гранул с различным содержанием альгината



Рис. 4. Фитозащитное действие биоpestицида Бетапротектин в жидкой и иммобилизованной формах в отношении антракноза узколистного люпина (сорт Вясковы)

6 мес. жизнеспособность бактерий (титр не менее 10^8 КОЕ/мл), высокую антимикробную активность в отношении фитопатогенной микрофлоры и ростстимулирующее действие на растения (рис. 4).

Заключение. Таким образом, для повышения конкурентоспособности отечественных биоpestицидов рекомендуется:

использование в качестве их основы высокоактивных штаммов микроорганизмов-антагонистов с высокой адаптационной способностью;

регулирование активности потенциальных интродуцентов путем воздействия различными стресс-факторами (температура, осмотический шок);

создание высокотехнологичных товарных форм биопрепаратов путем иммобилизации бактериальных клеток в альгинатном геле или на твердом носителе – природном мелкодисперсном сорбенте трепеле.

Список использованной литературы

1. Latest round of M&A booms biopesticide industry [Electronic resource] // Stanley Alliance Info-tech Limited. – Agropages. – Mode of access: <http://news.agropages.com/News/NewsDetail>. – Date of access: 06.12.2012.
2. Organic pesticides – a key component of organic farming [Electronic resource] // Stanley Alliance Info-tech Limited. – Agropages. – Mode of access: <http://www.agropages.com/magazine/detail-8-29>. – Date of access: 31.01.2013.
3. The Growing Importance of Biopesticides in Europe [Electronic resource] // Stanley Alliance Info-tech Limited. – Agropages. – Mode of access: <http://news.agropages.com/News/NewsDetail-13357.htm>. – Date of access: 05.11.2014.
4. Современные технологии создания биологических средств защиты растений / Э. И. Коломиец [и др.] // Наука и инновации. – 2012. – № 8. – С. 24–26.
5. Коломиец, Э. И. Высокоэффективные экологически чистые биопрепараты для сельского хозяйства / Э. И. Коломиец // Белорус. сельск. хоз-во. – 2015. – № 5 (157). – С. 29–30.
6. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. – М.: Колос, 1983. – 253 с.
7. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности: ГОСТ 20264.2-74. – Введ. 29.10.74. – М.: Изд-во стандартов, 1974. – 31 с.
8. Рухляева, А. П. Методы определения активности гидролитических ферментов / А. П. Рухляева, Г. В. Полягина. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 288 с.
9. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхарда. – М.: Мир, 1984. – Т. 3. – 264 с.
10. Миллер, Д. Эксперименты в молекулярной генетике / Д. Миллер. – М.: Мир, 1976. – 436 с.
11. Иммобилизованные клетки и ферменты / под ред. Дж. Вудворда. – М.: Мир, 1988. – 216 с.
12. Волкова, И. Н. Экологическое почвоведение: лабораторные занятия для студентов-экологов (бакалавров): метод. указания / сост. И. Н. Волкова, Г. В. Кондакова. – Ярославль: Ярослав. гос. ун-т, 2002. – 35 с.
13. Тюрин, Ю. Н. Статистический анализ данных на компьютере / Ю. Н. Тюрин, А. А. Макаров. – М.: ИНФА-М, 1998. – 544 с.
14. Влияние физических стресс-факторов на физиолого-биохимические свойства бактерий *Bacillus subtilis* БИМ В-439 / Э. И. Коломиец [и др.] // Микробные биотехнологии: фундамент. и прикл. аспекты: сб. науч. тр. / Ин-т микробиол. НАН Беларуси; под ред. Э. И. Коломиец, А. Г. Лобанка. – Минск: Беларус. навука, 2009. – Т. 2. – С. 243–252.

Поступила в редакцию 25.01.2016