

Экологически безопасные методы в интегрированной защите и сохранении растительной продукции.

Е.И.Кипрушкина, В.С. Колодязная, В.К.Чеботарь

Ключевые слова: антагонистические бактерии, бациллы, микробиологические препараты, фитопатогены, овощи, длительное холодильное хранение.

В условиях современной экономики внедрение инновационных биотехнологий помогает быстро реагировать на вызовы рынка, одним из рациональных направлений по развитию устойчивых систем в агропромышленном секторе экономики многих стран оказалось внедрение в практику землепользования биотехнологий, замены химических пестицидов и агрохимикатов биологическими препаратами.

Биопрепараты становятся обязательным элементом интенсивных технологий современного конкурентоспособного экологически безопасного земледелия.

В заметной степени это может быть достигнуто в результате внедрения в растениеводство высокоэффективных микробиологических препаратов (МБП, в тексте также используются синонимы МБП — «микробные препараты», «биопрепараты»), изготовленных на основе активных штаммов микроорганизмов, в том числе полезных эндофитных и ризобактерий (ПЭРБ) [1, 2, 3, 4, 5].

Проблемы хранения растительной продукции стоят также остро, поскольку потери урожая от болезней в осенне-зимний период могут быть значительно выше, чем во время вегетации [6, 7]. Плоды и овощи нуждаются в безопасных и эффективных средствах их защиты в процессе длительного холодильного хранения.

При подборе биоагентов для разработки микробных препаратов наиболее часто используются представители ризосферных микроорганизмов родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Achromobacter*, способных продуцировать широкий спектр вторичных метаболитов и хорошо приспосабливаться к условиям ризосферы. Особенный интерес для разработки комплексных МБП по сумме полезных свойств представляют бациллы, которые занимают, в зависимости от группы природных и хозяйственных факторов, до 36% всей микробной популяции [3, 4, 8]. Исследование механизмов взаимодействия ПЭРБ с растениями является базой для создания МБП как компонента систем устойчивого земледелия будущего.

При создании биопрепаратов учитываются следующие основные группы хозяйственно-значимых свойств ПЭРБ.

Биологическая ассоциативная азотфиксация, вносящая заметный вклад в азотное питание растений. Осуществляется гетеротрофными бактериями на поверхности и в тканях высшего растения, без образования морфологически выраженной структуры. В число активных диазотрофов входят бактерии *Bacillus ssp.*, причем некоторые бациллы, в частности *B. polymyxa*, могут интенсивно фиксировать азот также и в анаэробных условиях [2, 9].

Биосинтез литических ферментов антипатогенного действия. Бактерии продуцируют и выделяют во внешнюю среду функционально различающиеся группы ферментов, лизирующих стенки фитопатогенных грибов: протеазы, манназы, целлюлазы и гемицеллюлазы, глюканазы, хитиназы. Первый микроорганизм, у которого обнаружена способность лизировать не только собственные клетки, но и клетки других бактерий и грибов — *B. subtilis*. Литические ферменты бацилл обладают различной субстратной специфичностью. Некоторые, в частности, лизируя клеточные стенки фитопатогенных грибов, приводят к высвобождению содержимого гиф, которое служит дополнительным источником питания и энергии для бацилл.

Продуцирование антибиотиков и фитотоксинов. Бактерии являются продуцентами широкого спектра антибиотиков, угнетающих жизнедеятельность разнообразия фитопатогенных грибов и бактерий агроценоза [10]. Штаммы *B. subtilis* продуцируют антибактериальные и антифунгальные вещества как рибосомальной (субтилин, субтилозин, и субланцин), так не рибосомальной природы (хлоротетраин, микобациклин, ризатацин, бациллан, диффицидин, липопротеиды сурфактин, итурин, фенгицин). Наиболее активно синтез пептидных антибиотиков протекает в начале стационарной стадии роста, что облегчает интерпретацию данных лабораторной диагностики антифунгальной эффективности штаммов-продуцентов.

Продуцирование фитогормонов и витаминов. Многие ПЭРБ, в том числе и бациллы, способны синтезировать фитогормоны — ауксины (индолил-3-уксусная кислота ИУК), гибберелины, цитокинины, этилен и др., а также жизненно необходимые для развития растений витамины, такие как фолиевая кислота, фенилаланин, биотин, тиамин, никотиновая кислота, В₆, В₁₂.

Индукцированный иммунитет. Способность микроорганизмов индуцировать устойчивость растений к болезням и вредителям, названная индуцированным иммунитетом, выделяется в самостоятельное перспективное направление использования ПЭРБ в растениеводстве. Выраженность данного эффекта в значительной степени варьирует в зависимости от бактериального штамма и вида растения, определяется продуцированием антибиотиков, конкуренцией за ионы железа, инфекционные сайты, активацией самозащиты растений [5].

Цель работы - изучить диагностическую значимость методов лабораторного исследования ПЭРБ на наличие хозяйственно-ценных свойств на примере бациллярного препарата комплексного действия экстрасол, апробирование его применения на этапах производства и длительного холодильного хранения сельскохозяйственной продукции.

Объектом микробиологического исследования явился продуцент биопрепарата комплексного действия экстрасол — штамм *Bacillus subtilis* Ч-13, изолированный из черноземной почвы Республики Молдова. Биопрепарат Экстрасол зарегистрирован в установленном порядке (№ гос. рег. 0680-07-208-216-0-0-0-1).

Для определения антифунгальной и фитостимулирующей активности бактерии выращивали стационарно при 28°C в течение 4 сут. на картофельной среде, для анализа продуцирования штаммом фитогормонов — на минимальной минеральной среде.

Анализ антифунгальной активности бактериальной суспензии проводился методом колодцев. Споры гриба *Fusarium graminearum* (*F. graminearum*) вносились в агаризованную среду PDA в количестве 10⁶ спор/мл, а суспензия бактерий, в количестве 100 мкл, в колодцы диаметром 8 мм. Антифунгальная активность после инкубации в течение 2–4 сут. определялась по диаметрам зон ингибирования гриба, образующихся вокруг колодцев.

Получение фракции антифунгальных метаболитов. После выращивания бактериальные клетки отделяли центрифугированием и проводили экстракцию культуральной жидкости (КЖ) эквивалентным объемом этилацетата. Экстракт выпаривали под вакуумом. Полученный сухой остаток растворяли в 350 мкл метанола с последующей фильтрацией через нейлоновый мембранный фильтр. Антифунгальная активность суммарной фракции метаболитов определяли аналогично тестированию активности бактериальной суспензии.

Анализ антифунгальной активности *Bacillus subtilis* Ч-13 показал, что максимальная ингибирующая активность по отношению к фитопатогенному грибу *Fusarium graminearum* отмечается у живой бактериальной культуры (табл. 1).

Таблица 1. Антифунгальная активность штамма *Bacillus subtilis* Ч-13 против гриба *F. Graminearum*

Вариант	Разведение	Диаметр зоны ингибирования, мм	Примечание
живая культура	нет	31,0	-
КЖ	нет	12,5	зона слабая
экстракт -1	1:10	14,0	зоны более активные, чем варианте с КЖ
экстракт -2	1:100	15,0	
экстракт -3	1:1000	15,0	

Антифунгальная активность КЖ после отделения бактериальных клеток и суммарной фракции экстрагированных метаболитов была, соответственно, в 2 и 2.5 раза ниже, чем у живой культуры. Вероятно, в антагонистическую активность заметный вклад вносят экзоферменты, продуцируемые именно живой культурой штамма Ч-13.

Антифунгальная активность, определяемая содержащимися в культуральной жидкости водорастворимыми метаболитами, составляет примерно 50% от суммарной активности живой культуры в тестах на чашках Петри, а концентрированный этилацетатный экстракт активен даже при разведении в 1000 раз.

В табл. 2 приведены результаты изучения антагонистической активности *B. subtilis* Ч-13 на тест-культурах по отношению к фитопатогенным бактериям и грибам, показывающие, что штамм обладает широким спектром действия против различных возбудителей болезней растений

Таблица 2. Антагонистическая активность *Bacillus subtilis* Ч-13 по отношению к фитопатогенным бактериям и грибам.

Диаметр зоны ингибирования, мм				
бактерии				
<i>Erwinia carotovora</i> A-1	<i>Pseudomonas syringiae</i> 8300	<i>Pseudomonas syringiae</i> 2314	<i>Erwinia carotovora</i> 3391	<i>Clavibacter Michiganense</i> 17-1
28.4±2.0	32.0±2.6	48.0±3.3	49.5±4.1	36.0±2.7
грибы				
<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Pythium spp.</i>
48.1±3.2	29.6±1.9	33.0±2.4	23.8±1.9	38.1±2.9

Далее была проведена закладка полевых опытов по изучению эффективности биопрепарата на разных этапах технологической цепи производства и хранения картофеля, в частности, при обработке клубней перед посадкой и дополнительной обработке ботвы в период вегетации.

Хозяйственно-ботанические сорта картофеля Невский, Луговской, Сантэ, Пушкинец, Елизавета и Детскосельский опрыскивали жидкой формой препарата: - посадочный материал (1-% раствор Экстрасола с концентрацией 10^9 кл/мл, доза - 1 л/т); - вегетационный материал в фазе появления первых листьев и в фазе появления бутонов до цветения (10-% раствор Экстрасола с концентрацией 10^9 кл/мл, доза - 2 л/га). Контролем служили клубни и делянки, обработанные водой в те же периоды времени.

Применение биопрепарата оказало положительное влияние на элементы структуры урожая: все показатели в опытном варианте превосходили таковые в контроле (табл.3).

Таблица 3. Влияние биопрепарата на энергию прорастания и клубнеобразование картофеля (агротон N60 P60 K60).

Сорт	Вариант опыта	Всходы на 21-й день после посадки, %	Количество клубней, шт/раст
Невский	контроль	52	6.6
	опыт	54	8.2
Пушкинец	контроль	68	3.3
	опыт	70	4.3
Сантэ	контроль	62	9.1
	опыт	65	11.0
Елизавета	контроль	46	5.6
	опыт	40	6.4
Луговской	контроль	30	4.6
	опыт	44	6.4
Детскосельский	контроль	56	6.8
	опыт	61	7.5

Количество всходов на 21-й день после высадки на всех обработанных сортах больше, что свидетельствует о повышении энергии прорастания и активном развитии клубней. Применение данного биопрепарата стимулировало прорастание клубней на 2 - 14 дней раньше, сокращало продолжительность межфазных периодов развития картофеля, активизировало рост растений в высоту и стеблеобразование, положительно влияло на фотосинтезирующий аппарат растения, а также

существенно увеличивалась площадь листовой поверхности, масса и количество клубней с одного растения и с единицы площади. Эти факторы в конечном итоге способствовали повышению урожая картофеля суммарно по всем вариантам на 15 – 122 ц/га в зависимости от сорта.

При инокуляции происходит искусственное заселение поверхности клубней полезной микрофлорой, которая при высадке начинает активно размножаться и активно колонизировать ризосферу развивающегося растения. Ризосферные микроорганизмы находятся в сложных и многообразных взаимоотношениях с корневой системой растения, оказывая большое влияние на её поглотительную и синтетическую функции [2, 5, 9].

Испытания препарата показали его высокую биологическую эффективность против ризоктониоза, черной ножки, фитофтороза и ряда других болезней клубнеплодов: 52 – 70 % в зависимости от варианта опыта. Повышенной устойчивостью к указанным фитопатогенам обладал картофель сорта Луговской, особенно к фитофторозу. Биопрепарат оказывал также положительное влияние на потребительские свойства товарного картофеля: клубни были более крупные и выровнены по размерным фракциям, снижалось содержание мелких, нестандартных и уродливых экземпляров.

Оценка устойчивости картофеля к инфекционным заболеваниям после длительного холодильного хранения при температуре $(3\pm 1)^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха 90 ÷ 95% показала, что применение биопрепарата при инокуляции посевного материала и вегетирующих растений позволяет повышать устойчивость клубней к основным фитопатогенам, вызывающим потери картофеля при хранении – *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani*, *Phoma tuberosa*, что положительно сказывается на выходе товарной продукции и на сокращении абсолютного отхода. Так, через 8 мес хранения выход стандартных клубней продовольственного картофеля сорта Детскосельский в опыте снизился на 11.0 % (контроль – на 24.8 %), у продовольственного картофеля сорта Невский – на 8.0 % (контроль – на 15.9 %), у картофеля сорта Невский – 1-я репродукция – на 1.74 % (контроль – на 4.3 %). Наибольшая сохраняемость характерна для картофеля при использовании посадочного материала высоких репродукций.

Таким образом, представленные результаты показывают перспективность применения микробиологических препаратов различного назначения при выращивании сельскохозяйственных культур с целью усиления биологической составляющей агрофитоценозов и получения экологически безопасной, высококачественной и конкурентоспособной продукции с высокими потребительскими свойствами и длительными сроками хранения.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Петров, В.Б. Микробиологические препараты в практическом растениеводстве России: функции, эффективность, перспективы. / В.Б. Петров, В.К. Чеботарь // Рынок АПК. – 2009. – №7. – С. 16-18.
2. Тихонович, И.А. Кооперация растений и микроорганизмов: новые подходы к конструированию экологически устойчивых агросистем. / И.А. Тихонович, Н.А. Проворов // Усп. совр. биол. – 2007 – №4. – С. 339-357.
3. Чеботарь, В.К. Эффективность применения биопрепарата экстрасол / В.К. Чеботарь, А.А. Завалин, Е.И. Кипрушкина. – М.: Издательство ВНИИА, 2007. – 216 с.
4. Compant S. Use of PGPB for biological control of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects. / B. Duffy, J. Nowak et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol.71. – №9. – P. 4951-4959.
5. Kloepper, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. / J.W. Kloepper // In: F.B. Metting, Jr., editor. Soil Microbial Ecology. M Dekker. – N.Y., 1993. – P.255-274.
6. Кипрушкина, Е.И. Защитно-стимулирующие свойства биопрепарата при вегетации и хранении картофеля / Е.И. Кипрушкина, В.Б. Петров, В.К. Чеботарь // Доклады РАСХН. – 2005. – №3. – С. 21 – 24.

7. Кипрушкина, Е.И. Экспериментальное обоснование биотехнологических основ хранения растительного сырья / Е.И. Кипрушкина, В.С. Колодязная, А.В. Хотянович // Доклады РАСХН. – 2003. – №3. – С. 47 – 49.
8. Кирюшин, В.И. Экологизация земледелия и технологическая политика. / В.И. Кирюшин. – М.: Изд-во МСХА, 2000. – 473 с.
9. Роль агглютинирующих белков ризобий и азотфиксирующих бацилл при взаимодействии с растением: сб.ст. / под ред. В.В. Игнатова. – М.: Наука, 2005. – 260 с.
10. Schisler, D.A. The nature and application of biocontrol microbes: *Bacillus* spp. – formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. / D.A Schisler, P.J Slininger, R.W. Behle // *Phytopatol.* – 2004. – Vol.94. – P. 1267-1271.