

УДК 579.24.852.11+632.937

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ПРИ ХРАНЕНИИ ЖИДКОЙ ПРЕПАРАТИВНОЙ ФОРМЫ БИОФУНГИЦИДА БАЦИЗУЛИН

З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, О.Н. Ильинская

Аннотация

Показано, что глубинное культивирование *Bacillus* sp. 3 на пшенично-кукурузной среде обеспечивает наибольший выход биомассы культуры и повышенное содержание спор при сохранении высокого уровня антагонистической активности и ростостимулирующего эффекта. Разработана препаративная форма биофунгицида бацизулин на основе штамма *Bacillus* sp. 3, в которую в качестве стабилизатора бактериальной биомассы, пленкообразователя, прилипателя и красителя введены гуминовые соединения, обеспечивающие стабильность свойств препарата в процессе хранения.

Ключевые слова: антагонистическая активность, препаративная форма, биофунгицид бацизулин, фитотоксичность, соли гуминовых кислот.

Введение

В настоящее время наметилась тенденция замены биофунгицидов, используемых для протравливания семян в виде смачивающихся порошков, на препараты в жидкой форме. Последние лишены целого ряда эксплуатационных недостатков [1] и содержат дополнительные специальные компоненты (прилипатели, пленкообразователи и т. д.) в растворенном виде. Для успешного производства таких биопрепаратов важна отработанная технология получения, включающая оптимизацию состава питательной среды, температуры культивирования, интенсивность аэрации и т. д.

Существенным недостатком большинства жидких биопрепаратов является ограниченный срок хранения [2]. В связи с этим при разработке препаративной формы, содержащей живую культуру бактерий, крайне важно учитывать возможность длительного хранения препарата при сохранении биологической активности штамма-продуцента.

В Казанском университете выделен штамм *Bacillus* sp. 3, обладающий высокими фунгицидной и ростостимулирующей активностями [3], способностью осуществлять микробиологическую трансформацию органических и неорганических соединений фосфора в доступную для растений форму [4], положительно воздействующий на биологическую активность и плодородие почвы [5]. Эти ценные качества сочетаются с отсутствием токсического действия на теплостойные объекты [6]. В связи с целесообразностью внедрения биофунгицида бацизулин в широкомасштабное сельскохозяйственное производство в качестве протравителя семян [7, 8], целью работы служила оптимизация условий культивирования

Bacillus sp. 3, получение жидкой формы биопрепарата и оценка стабильности свойств препарата в процессе хранения.

1. Постановка задачи

Штамм *Bacillus* sp. 3 хранили в музейной культуре на мясопептонном агаре под слоем вазелинового масла в условиях холодильной камеры. Препарат получали методом глубинного культивирования. В качестве посевного материала использовали суточную культуру с титром не менее $1.0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, который вносили в количестве 5–10% от объема среды, дающем начальную оптическую плотность клеточной суспензии 0.1 ед. ($\lambda = 590$ нм, $l = 10$ мм). Культивирование бактерий проводили в колбах Эрленмейера емкостью 250 мл при соотношении объема среды к объему колбы 1 : 7.5 в условиях аэрации (180 об/мин).

При подборе оптимальной для культивирования бактерий питательной среды в качестве экспериментальных использовали следующие среды: мелассную (состав, г/л: меласса – 10.0; NaNO_3 – 3.0; KH_2PO_4 – 1.0; MgSO_4 – 0.3; мел очищенный – 1.0; pH 7.5 ± 0.1), пшеничную (состав, г/л: отруби пшеничные – 40.0; MgSO_4 – 0.9; KH_2PO_4 – 0.5; мел осажденный – 1.0; pH 7.0 ± 0.1), картофельно-глюкозную [9], мелассно-кукурузную и пшенично-кукурузную с дополнительным внесением в состав исходных сред кукурузного экстракта из расчета 1.0 г/л.

Критериями оптимального состава среды служили количественные показатели накопления сухой биомассы (г/л) и уровень спорообразования (в % от общего количества КОЕ в суспензии). Титр жизнеспособных клеток (N) определяли путем высева предельных разведений клеточной суспензии на МПА с последующим подсчетом КОЕ в 1 мл среды; количество спор – методом высева на МПА предельных разведений суспензии, выдержанной при температуре 90 °С в течение 45 мин, с последующим подсчетом КОЕ в 1 мл [10]. Аминный азот и содержание восстанавливающих сахаров определяли общепринятыми методами [11].

Антагонистическую активность выявляли методом лунок [10] по диаметру стерильных зон в грибном газоне, образующихся вокруг лунок. В качестве тест-объектов использовали изоляты фитопатогенных микромицетов (*Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*), выделенные с семян яровой пшеницы сорта Люба.

Фитотоксическую активность бактериальной культуры и препарата исследовали методом замачивания семян растений (пшеница яровая *Triticum aestivum*, сорт Люба) [10].

В экспериментах по подбору дополнительных компонентов биофунгицида в бактериальную культуру вносили поливиниловый спирт (ПВС) (Sigma, USA), карбоксиметилцеллюлозу (Na-КМЦ) (Sigma, USA) и соли гуминовых кислот (СГК) до конечной концентрации 2.0 и 3.0 об. %. Оценивали титр жизнеспособных клеток и спор, антагонистическую и фитотоксическую активность препаратов через 7 сут после внесения.

Все эксперименты проведены не менее чем в пятикратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили с помощью электронных таблиц Excel и программы Origin 7.0. Достоверность различий между измерениями оценивали с использованием коэффициента Стьюдента ($P < 0.05$).

2. Результаты

2.1. Подбор компонентов питательной среды. Одним из основных критериев рентабельности биопрепаратов на пестицидном рынке является экономически и технологически обоснованный процесс их получения. Согласно данным литературы, глубинное культивирование является приоритетным методом получения биопрепаратов в жидкой форме, что обусловлено технологичностью, экологичностью и экономическими преимуществами процесса в масштабах широкого производства [2, 12]. Предварительно проведенные эксперименты по выбору оптимальной для глубинного культивирования бактерий *Bacillus* sp. 3 среды позволили нам подобрать для получения биофунгицида питательные среды на основе отходов свеклосахарного (мелассная, мелассно-кукурузная), зерноперерабатывающего (пшеничная, пшенично-кукурузная) и кукурузно-крахмального (картофельно-глюкозная) производства.

Полученные данные показали, что при выращивании *Bacillus* sp. 3 в течение 28 ч на картофельно-глюкозной среде уровень накопления биомассы составляет 4.6 ± 0.2 г/л с титром $0.27 \pm 0.05 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл, а содержание спор – 45.3%; на мелассной – 5.0 ± 0.2 г/л, $0.98 \pm 0.04 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл и 52.6% соответственно, на мелассно-кукурузной – 5.1 ± 0.3 г/л, $1.02 \pm 0.06 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл и 57.3% соответственно. Потребление питательных веществ во всех случаях было недостаточно полным и варьировало от 61.4% до 79.7% в зависимости от среды. Уровень спорообразования на средах с высоким содержанием сахаров не превышал 57.3%. По данным литературы, уровень накопления биомассы не всегда коррелирует с показателем спорообразования [13], которое репрессируется, в частности, высоким содержанием сахаров [14].

При культивировании бактерий на пшеничной среде накопление биомассы *Bacillus* sp. 3 достигало максимальных значений к 24-му часу инкубации и составляло 5.3 ± 0.2 при титре $1.04 \pm 0.05 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл с содержанием спор 83.5% на 28-й час.

По технологическим требованиям процесс культивирования микроорганизмов необходимо заканчивать в короткие сроки при содержании в 1 мл культуральной жидкости не менее 10^{10} клеток в вегетативной форме и 30% – в спорной [13]. Наиболее оптимальной по критериям длительности процесса, накопления биомассы и интенсивности спорообразования культуры была пшенично-кукурузная среда. Как видно из рис. 1, выход биомассы на 18–20-й час инкубации составил 5.9 ± 0.3 г/л при титре $1.29 \pm 0.04 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл. Выход спор на 24–26-й час составил 94.6%. При этом содержание остаточного сахара и аминного азота в среде уменьшилось на 86.9% и 98.1% соответственно от исходного уровня, то есть потребление субстрата было достаточно полным.

Кроме того, нами было установлено, что при культивировании бактерий на средах с пшеничными отрубями эффект стимулирования роста и развития растений так же, как и антагонистическая активность культуры, были существенно выше, чем на средах с глюкозой и мелассой. Так, показатель всхожести семян достоверно увеличился на 7.3–11.4%, накопление биомассы наземной и корневой частей растений – на 14.7–20.8% и 18.1–26.5% соответственно в зависимости от состава среды, а диаметр зон ингибирования роста тест-культур – на 20.5–26.1% в зависимости от вида микромицета. Последнее согласуется с данными

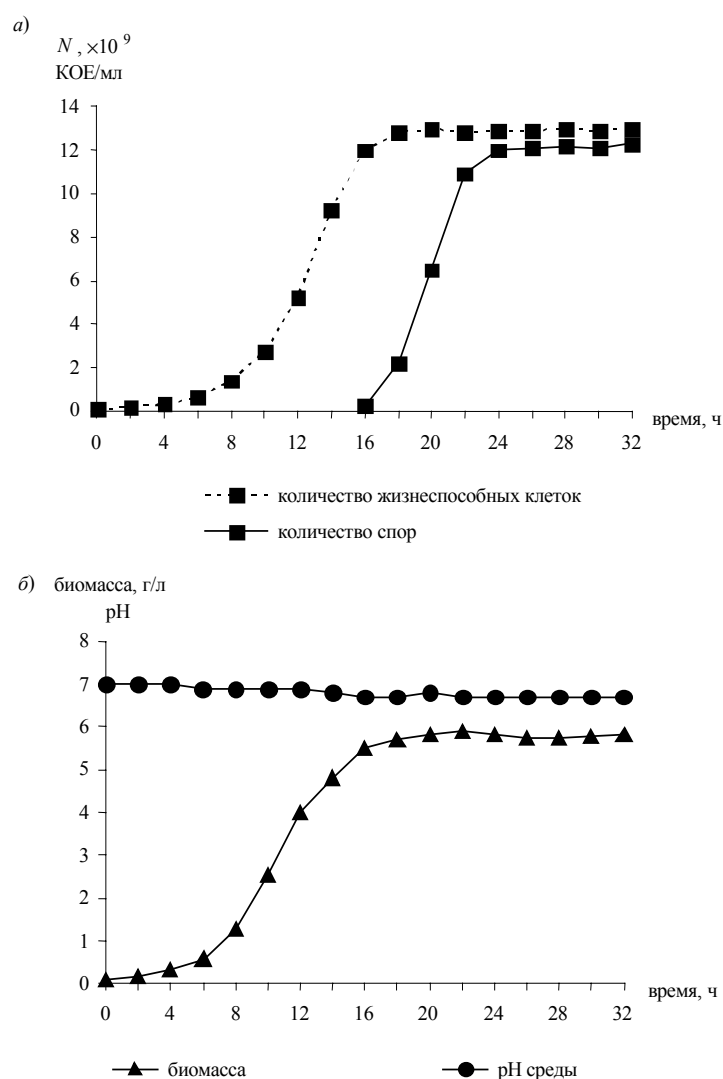


Рис. 1. Динамика роста и интенсивности спорообразования (а), накопления биомассы и изменения pH среды (б) при культивировании *Bacillus* sp. 3 на оптимальной пшенично-кукурузной среде

литературы о влиянии состава среды на уровень антагонистической активности бацилл [15].

2.2. Влияние температуры культивирования и pH питательной среды на антагонистическую активность *Bacillus* sp. 3 при выращивании на пшенично-кукурузной среде. Изучение температурных режимов культивирования *Bacillus* sp. 3 показало, что максимальная антагонистическая активность, соответствующая наибольшему выходу биомассы, достигается при 28 °С (табл. 1). При пониженной (20 °С) и повышенной (37 °С) температурах культивирования накопление культурой антигрибных метаболитов снижается: диаметр зон ингибирования роста тест-культур достоверно уменьшается на 11.1–21.7% в зависимости от вида микромицета.

Табл. 1

Влияние температуры культивирования и pH питательной среды на антагонистическую активность *Bacillus* sp. 3 при выращивании на оптимальной пшенично-кукурузной среде

Параметр культивирования		Время культивирования, ч	Диаметр зон ингибирования роста, мм		
			<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
Температура, °C	20	24	19.4 ± 1.0	26.7 ± 0.8	35.5 ± 0.8
		48	22.7 ± 0.9	32.4 ± 1.2	40.5 ± 1.3
	28	24	24.0 ± 0.8	33.1 ± 0.7	40.2 ± 0.9
		48	26.9 ± 1.1	37.4 ± 1.0	44.7 ± 1.2
	37	24	18.8 ± 0.6	28.5 ± 1.1	36.0 ± 0.8
		48	21.5 ± 0.7	33.2 ± 0.8	41.7 ± 0.9
pH	5.0	48	20.7 ± 0.9	30.2 ± 0.8	35.4 ± 0.7
	6.0	48	25.9 ± 0.8	36.2 ± 1.1	43.8 ± 1.1
	7.0	48	26.5 ± 1.1	37.0 ± 1.0	44.1 ± 1.2
	8.0	48	24.6 ± 1.0	35.9 ± 0.7	42.9 ± 0.8
	9.0	48	21.5 ± 0.9	32.0 ± 0.6	36.0 ± 0.7

Особенность штамма *Bacillus* sp. 3 – способность к росту в широком диапазоне pH (от 5.0 до 9.0) с максимумом фунгистатической активности при активной кислотности среды в интервале 6.0–8.0 (табл. 1). Это является неоспоримым преимуществом в условиях совместного использования фунгицидов, гербицидов, инсектицидов и других средств химизации, при смешивании которых в составе баковых смесей возможно резкое снижение кислотности [16].

Таким образом, глубинное культивирование *Bacillus* sp. 3 на пшенично-кукурузной среде при температуре 28–30 °C, активной кислотности питательной среды 7.0 ± 0.1 , скорости вращения качалки 180 об/мин и продолжительности процесса 26–28 ч обеспечивает наиболее высокий выход биомассы культуры – 5.8 ± 0.3 г/л ($1.29 \pm 0.04 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл) и содержание спор (94.6%) при сохранении высокого уровня антагонистической активности и ростостимулирующего эффекта. Рентабельность данного процесса обеспечивается сравнительно невысокой продолжительностью и низкой стоимостью исходного сырья.

2.3. Выбор специальных компонентов препарата. С целью сохранения жизнеспособности и стабилизации микробной биомассы, а также увеличения адсорбционной способности клеток и спор при протравливании нами проведена сравнительная оценка влияния внесения в состав бактериальной суспензии ПВС, Na-КМЦ и СГК, взятых в концентрациях 2 и 3 об. %.

Из данных табл. 2 видно, что ПВС независимо от концентрации снижает показатель жизнеспособности и антагонистическую активность культуры *Bacillus* sp. 3. Более того, добавление к культуре *Bacillus* sp. 3 ПВС оказывает выраженное фитотоксическое действие, которое проявляется в снижении накопления биомассы наземной и корневой частей проростков на 17.5–36.2% в зависимости от концентрации ПВС в составе препарата.

Внесение Na-КМЦ независимо от концентрации не оказывало влияния как на исходный уровень антагонистической активности и жизнеспособность бактериальной культуры (табл. 2), так и на интенсивность роста растений.

Табл. 2

Влияние ПВС, Na-КМЦ и СГК на жизнеспособность и антагонистическую активность *B. subtilis* 3 (7 сут)

Вариант	Титр препарата, $\times 10^{10}$ КОЕ/мл	Диаметр зон ингибирования роста тест-культур, мм		
		<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
<i>Bacillus</i> sp. 3 (контроль)	1.29 ± 0.04	26.5 ± 1.4	37.0 ± 1.2	44.1 ± 1.0
<i>Bacillus</i> sp. 3 + ПВС, 2.0%	$0.42 \pm 0.01^*$	$18.6 \pm 0.7^*$	$28.1 \pm 0.9^*$	$32.6 \pm 0.8^*$
<i>Bacillus</i> sp. 3 + ПВС, 3.0%	$0.19 \pm 0.01^*$	$13.4 \pm 0.9^*$	$19.1 \pm 0.7^*$	$22.3 \pm 0.7^*$
<i>Bacillus</i> sp. 3 + Na-КМЦ, 2.0%	1.24 ± 0.02	26.1 ± 0.7	37.9 ± 0.9	44.7 ± 1.2
<i>Bacillus</i> sp. 3 + Na-КМЦ, 3.0%	1.25 ± 0.01	27.2 ± 1.0	36.8 ± 1.4	45.0 ± 1.6
<i>Bacillus</i> sp. 3 + СГК, 2.0%	1.28 ± 0.02	27.1 ± 1.3	37.4 ± 1.0	44.3 ± 0.9
<i>Bacillus</i> sp. 3 + СГК, 3.0%	1.28 ± 0.01	27.3 ± 1.0	38.8 ± 0.7	45.2 ± 0.9

* Различия между опытными и контрольными вариантами достоверны при $P \geq 0.95$.

В свою очередь, обработка семян пшеницы бактериальной культурой, в состав которой введены гуминовые соединения, приводила к активации ростовых процессов растений. В данном случае всхожесть семян достоверно увеличилась по сравнению с контролем на 6.1–8.4%, накопление биомассы наземной и корневой частей растений – на 11.2–13.5% и 12.4–17.6% соответственно в зависимости от концентрации гуминовых соединений. Титр и антагонистическая активность препарата при введении СГК не изменялись ни в одном из вариантов (табл. 2).

Следует отметить, что препаративные формы, в составе которых в качестве пленкообразователей были введены Na-КМЦ или ПВС, весьма сложны в приготовлении, так как для их быстрого и полного растворения необходима высокая температура воды (30–35 °C) и рабочей суспензии (20–25 °C). При несоблюдении температурных условий происходит неравномерное покрытие семян пленкой, в связи с чем снижается полнота протравливания [17]. Таким образом, для получения бацизулина использование Na-КМЦ и ПВС в качестве дополнительных компонентов специального назначения нецелесообразно.

Известно, что гуминовые соединения входят в разряд экологически безопасных агрохимикатов нового поколения [18]. Дополнительным их преимуществом является наличие темно-бурого окрашивания, позволяющего контролировать полноту протравливания. По совокупности свойств, позволяющих значительно снизить себестоимость готовой препаративной формы бацизулина, СГК с конечной концентрацией 2.0 об. % были выбраны нами в качестве стабилизаторов бактериальной биомассы, пленкообразователей, прилипателей и красителя.

2.4. Оценка антигрибной и фитотоксической активности препарата при хранении в различных температурных режимах. Процесс протравливания носит сезонный характер с максимумом потребности в биопрепаратах в посевной период (апрель – май). Существенным недостатком большинства жидких

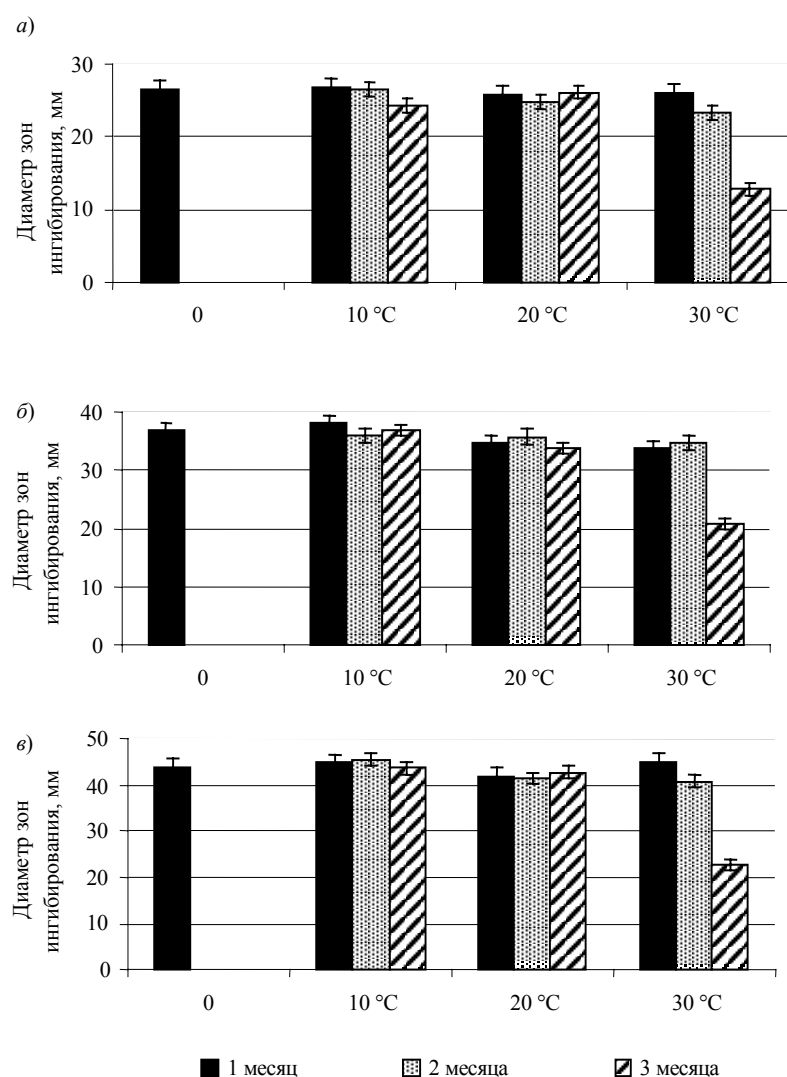


Рис. 2. Влияние температуры и сроков хранения на антагонистическую активность препарата против *Bipolaris sorokiniana* (а), *Alternaria alternata* (б) и *Fusarium graminearum* (в). Обозначения: 0 – исходная активность препарата непосредственно после приготовления

биопрепаратов (бактофосфин, азотовит и др.) является ограниченный срок хранения, обычно не превышающий 10–15 сут [2]. В то же время снижение температуры хранения до оптимального для биофунгицидов значения (4–6 °C) позволяет несколько увеличить срок годности препаратов, но приводит к дополнительным экономическим затратам, что, как правило, неприемлемо для сельхозтоваропроизводителей. В связи с этим при разработке препаративной формы, содержащей живую культуру продуцента, крайне важно учитывать возможность длительного хранения при сохранении жизнеспособности клеток микроорганизма и его биологической активности на фоне активизации ростовых процессов растений.

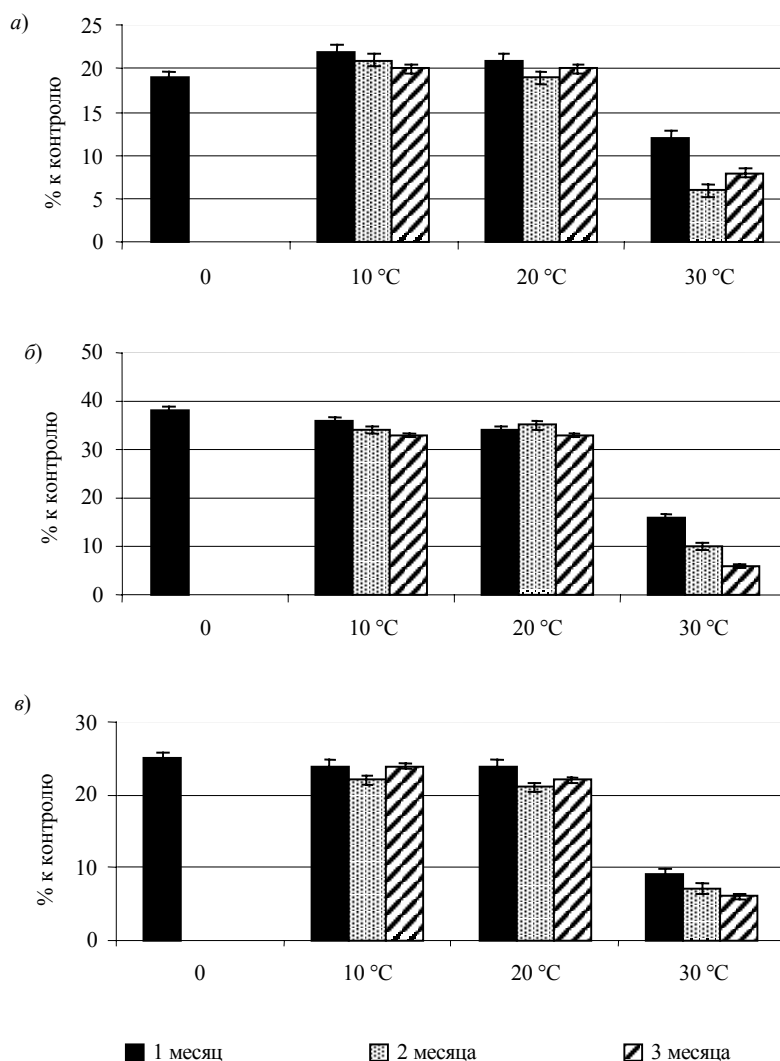


Рис. 3. Влияние обработки семян яровой пшеницы на показатель всхожести зерен (а), накопление биомассы корневой (б) и наземной (в) частей растений при хранении препарата в различных температурных режимах. Обозначения: 0 – исходная активность препарата непосредственно после приготовления

Согласно полученным результатам, хранение биопрепарата при 10 °C и 20 °C не приводило к достоверному снижению его антагонистической активности против тест-культур фитопатогенных микромицетов (рис. 2) и стимулирующего действия на всхожесть семян, а также на накопление биомассы проростков (рис. 3). Важно отметить сохранение большего эффекта стимулирования развития корневой системы растений, чем наземной части, выявленного нами в проведенных ранее экспериментах с использованием чистой культуры штамма-продуцента [3].

Хранение биопрепарата при 30 °C привело к достоверному снижению диаметра зон ингибирования *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata* и *Fusarium graminearum* лишь по истечении 3 месяцев (на 51.7, 43.8, 48.3% соответственно).

Фитотоксический эффект препарата после выдерживания в условиях высоко-температурного режима хранения отсутствовал, позитивное влияние на рост и развитие растений было незначительным.

Исследование стабильности свойств биопрепарата в процессе его хранения при температуре до 20 °С показало отсутствие достоверно значимого снижения титра жизнеспособных клеток и количества спор. Жизнеспособность штамма *Bacillus* sp. 3 при 30 °С несколько снизилась к 4-му месяцу наблюдения и составила 87% от исходного титра препарата.

Summary

Z.Yu. Siraeva, N.G. Zakharova, O.N. Ilinskaya. Technology of Production and Storage Stability Evaluation of the Liquid Formulation of Biofungicide Bacizulin.

It is shown that submerged cultivation of *Bacillus* sp. 3 in a nutritive medium with wheat bran provides the highest biomass yield of the culture and a high concentration of spores while maintaining a good level of antagonistic activity and growth-stimulating effect. A formulation of biofungicide Bacizulin was developed on the basis of *Bacillus* sp. 3, with humic compounds playing the role of a stabilizer of bacterial biomass, a filming agent, an adhesive and a dye to ensure the preparation's stability during storage.

Key words: antagonistic activity, formulation, biofungicide Bacizulin, phytotoxicity, humates.

Литература

1. Елинеевская Л.С. Современные препаративные формы пестицидов // Защита и карантин растений. – 2005. – № 9. – С. 34–38.
2. Габдуллин В.Р. Нарастиваем объемы производства // Защита и карантин растений. – 2003. – № 6. – С. 19–20.
3. Сираева З.Ю., Захарова Н.Г., Егоров С.Ю. Использование бактерий из рода *Bacillus* // Вестн. РАСХН. – 2004. – № 5. – С. 71–75.
4. Ильинская О.Н., Захарова Н.Г., Сираева З.Ю., Демидова И.П. Дефосфорилирующая активность *Bacillus* sp. // Матер. Междунар. науч. конф. «Проблемы устойчивого функционирования водных и наземных экосистем», Ростов н/Д, 9–12 окт., 2006 г. – Ростов н/Д: Ростиздат, 2006. – С. 153–154.
5. Сираева З.Ю., Захарова Н.Г., Егоров С.Ю. Влияние биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* на биологическую активность почвы // Тр. Междунар. биотехнол. центра МГУ: II Междунар. науч. конф. «Биотехнология – охране окружающей среды», Москва, 25–27 мая, 2004 г. – М.: Спорт и культура, 2004. – Ч. II. – С. 174–177.
6. Сираева З.Ю., Захарова Н.Г., Ильинская О.Н., Гарусов А.В. Токсикологическая оценка нового протравителя семян зерновых культур биофунгицида бацизулин // Токсикол. вестн. – 2006. – № 1. – С. 30–35.
7. Сираева З.Ю., Захарова Н.Г., Егоров С.Ю. Использование бацизулина в качестве протравителя семян зерновых культур // Вестн. РАСХН. – 2005. – № 5. – С. 55–57.
8. Захарова Н.Г., Сираева З.Ю., Демидова И.П., Гарусов А.В., Егоров С.Ю., Ильинская О.Н. Эффективность биопрепарата бацизулин в защите яровой пшеницы от болезней // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2006. – Т. 148, кн. 3. – С. 89–98.

9. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. – М.: Агропромиздат, 1990. – 240 с.
10. Методы почвенной биохимии и микробиологии / Под ред. Д.Г. Звягинцев. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. – 304 с.
11. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. – М.: Химия. 1975. – 360 с.
12. Warrior P., Konduru K., Vasudev P. Formulation of biological control agents for pest and disease management // Biological control of crop diseases / Ed. by S.S. Gnanamanickam. – N. Y.: Marcel Dekker, 2002. – P. 421–442.
13. Хилько Т.В. Оптимизация питательных сред для роста и спорообразования бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* // Микробиол. журн. – 2004. – Т. 66, № 1. – С. 36–41.
14. Мулюкин А.Л., Луста К.А., Грязнова М.Н., Козлова А.Н., Дужа М.В., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Образование покоящихся форм *Bacillus cereus* и *Micrococcus luteus* // Микробиол. – 1996. – № 6. – С. 782–789.
15. Смирнова И.Э. Целлюлолитические бактерии в защите сельскохозяйственных растений от фитопатогенных грибов // Микол. и фитопатол.. – 2004. – Т. 38, Вып. 2. – С. 89–93.
16. Хайбуллин А.И. Физико-химическая совместимость агрохимикатов в баковых смесях // Агрохимия. – 2000. – № 1. – С. 86–91.
17. Абеленцев В.И. Правильно выбирайте протравитель // Защита растений. – 1997. – № 7. – С. 20–21.
18. Гребеничиков В.Ю. Гуминовые препараты при выращивании ячменя // Агро XXI. – 2002. – № 5. – С. 19.

Поступила в редакцию
05.04.10

Сираева Зульфира Юнысовна – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: zsiraeva@yandex.ru

Захарова Наталия Георгиевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Ильинская Ольга Николаевна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Olga.Ilinskaya@ksu.ru