Защита растений и иммунология

УДК 633.854.78:632.444.2:632.953.1

DOI 10.25230/2412–608X–2018–4–176–156–161

Элементы технологии применения микробиопрепаратов в препаративной форме «смачивающийся порошок» на основе штаммов-продуцентов из родов *Penicillium* и *Bacillus*, а также смесового препарата на фоне искусственного заражения подсолнечника возбудителями болезней

Л.В. Маслиенко,

доктор биологических наук

А.Х. Воронкова,

младший научный сотрудник

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17

Тел.: (861) 275-85-19

E-mail: biometod@yandex.ru

Для цитирования: Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х. Элементы технологии применения микробиопрепаратов в препаративной форме «смачивающийся порошок» на основе штаммов-продуцентов из родов *Penicillium* и *Bacillus*, а также смесового препарата на фоне искусственного заражения подсолнечника возбудителями болезней // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2018. – Вып. 4 (176). – С. 156–161.

Ключевые слова: микробиопрепараты, поверхностное культивирование, смачивающийся порошок, штаммы-продуценты, ВИЗР-24 *Penicillium vermiculatum*, Б-12 *Bacillus licheniformis*, подсолнечник.

Определены оптимальные нормы применения лабораторных образцов микробиопрепаратов в препаративной форме «смачивающийся порошок» (СП), полученных при поверхностном культивировании на жидких питательных средах перспективных грибного (ВИЗР-24 *Penicillium vermiculatum* Dang.) и бактериального (Б-12 *Bacillus li-*

cheniformis) штаммов-продуцентов, а также смесового препарата на их основе, в зависимости от фона искусственного заражения подсолнечника возбудителями белой гнили и фузариоза. Для СП микробиопрепарата на основе грибного штамма-продуцента ВИЗР-24 *P. vermiculatum* на разных фонах искусственного заражения возбудителем белой гнили (78,0; 62,0; 44,0 %) и среднем – фузариоза (62,0 %) оптимальная норма расхода составила 0,1–0,2 кг/т при эффективности 79,5–90,9 %. Для СП микробиопрепарата на основе бактериального штамма Б-12 *B. licheniformis* на высоком (78,0 %) и среднем (62,0 %) фонах заражения возбудителем белой гнили испытанные нормы расхода малоэффективны (5,1–19,4 %), тогда как на низком фоне (44,0 %) эффективность составила 63,6–86,4 %. На среднем фоне заражения фузариозом (62,0 %) оптимальная норма расхода Б-12, СП составила 0,05 кг/т при эффективности 77,4 %. Для СП микробиопрепарата на основе смеси штаммов-продуцентов (ВИЗР-24 + Б-12, СП) оптимальная норма расхода, не зависимо от фона искусственного заражения возбудителем белой гнили, составила 0,1 кг/т при эффективности 82,1–96,8 %, а на фоне среднего заражения возбудителем фузариоза – 0,05 кг/т при эффективности 80,6 %. Биологическая эффективность СП смесового препарата на основе смеси штаммов-продуцентов на разных фонах искусственного заражения подсолнечника возбудителями белой гнили и фузариоза превышала эффективность препаратов на основе отдельных грибного и бактериального штаммов, что даёт возможность расширения спектра действия смесовых препаратов.

UDC 633.854.78:632.444.2:632.953.1

The elements of application technology for microbiopreparations in a preparation form ‘wettable powder’ based on the strains-producers from a genus *Penicillium* and *Bacillus*, and a mixture preparation in conditions of artificial sunflower inoculation with diseases.

L.V. Maslienko, doctor of biology

A.Kh. Voronkova, junior researcher

All-Russian Research Institute of Oil Crops by V.S. Pustovoi (VNIIMK)

17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia

Tel.: (861) 275-85-19

E-mail: biometod@yandex.ru

Key words: microbiopreparations, surface cultivation, wettable powder, strains-producers, VIZR-24 *Penicillium vermiculatum*, B-12 *Bacillus licheniformis*, sunflower.

We determined the optimal application rates for laboratory samples of microbio-preparations in a preparative form 'wetable powder' (WP) developed at the surface cultivation of promising fungus (VIZR-24 *Penicillium vermiculatum* Dang.) and bacterium (B-12 *Bacillus licheniformis*) strains-producers on liquid nutrient mediums, and their mixture preparation depending on the conditions of artificial inoculation with white rot and fusariose. The optimal application rate for WP developed from the fungus strain-producer VIZR-24 *P. vermiculatum* on the plots with different degree of artificial white rot infection (78.0; 62.0; 44.0%) and average – by fusariose (62.0%) was equal 0.1–0.2 kg per ton, efficiency was 79.5–90.9%. But the studied application rates for WP microbio-preparation based on the bacterium strain B-12 *B. licheniformis* on high (78.0%) and average (62.0%) infection by white rot pathogen had low efficiency (5.1–19.4%), while at low infection (44.0%) the efficiency was 63.6–86.4%. At average fusariose infection (62.0%) the optimal application rate for B-12, WP was 0.05 kg per ton at efficiency 77.4%. For mixture preparation of the strains-producers (VIZR-24 + B-12, WP), the optimal application rate did not depend on the artificial infection degree with a white rot pathogen and was 0.1 kg per ton at efficiency 82.1–96.8%, and at average infection with a fusariose pathogen it was – 0.05 kg per ton at efficiency 80.6%. Biological efficiency of the mixture preparation WP at the different infection degree of sunflower with white rot and fusariose exceeded the efficiency of preparations based on singular fungus and bacterium strains. This allows expanding of action area for mixture preparation.

Введение. Замещение дорогостоящих, опасных химических пестицидов экологически безопасными микробиопрепаратами, которые зачастую не уступают, а даже превосходят их по эффективности, будет способствовать улучшению экологической ситуации. Это особенно актуально в условиях становления органического земледелия в России, повышенного интереса к получению экологически безопасного продовольствия, сохранению здоровья людей, снижению загрязнения среды, а также сельскохозяйственной продукции пестицидами.

В настоящий момент многие производители микробиопрепаратов имеют линейку основных препаративных форм: «жидкая культура», «суспензионный концентрат», «порошок» и «смачивающийся порошок». В последние годы отмечена тенденция увеличения производства микробиопрепаратов в

препаративной форме «смачивающийся порошок» (СП) в связи с пролонгированным сроком хранения и образованием в воде однородной суспензии. Однако производимые на сегодняшний день смачивающиеся порошки микробиопрепаратов, главным образом на основе бактериальных штаммов-продуцентов, полученные при высушивании их на распылительной или лиофильной сушилке, имеют высокую норму расхода и, соответственно, высокую стоимость.

В лаборатории биометода ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК многие годы ведутся исследования по разработке микробиологических средств защиты масличных и других сельскохозяйственных культур от болезней. Разрабатываются технологии производства и применения разных препаративных форм микробиопрепаратов [1–4].

В данной работе приведены результаты исследований по разработке элементов технологии применения лабораторных образцов микробиопрепаратов в препаративной форме «смачивающийся порошок», полученных при поверхностном культивировании на жидких питательных средах перспективных грибоного (ВИЗР-24 *Penicillium vermiculatum* Dang.) (ВИЗР-24, СП) и бактериального (Б-12 *Bacillus licheniformis*) (Б-12, СП) штаммов-продуцентов, а также смесового препарата, полученного смешиванием СП на основе отдельных штаммов (ВИЗР-24 + Б-12, СП), для защиты подсолнечника от возбудителей болезней.

Материалы и методы. Штаммы-продуценты ВИЗР-24 *P. vermiculatum* и Б-12 *B. licheniformis* выращивали поверхностным способом на жидких питательных средах (Рудакова [5] и Тайлона-3 [6] соответственно), при оптимальных температурах (27 и 30 °C соответственно), в 3-литровых стеклянных баллонах, с объёмом питательной среды 500 мл. Выросшую биомассу отделяли сливом культуральной жидкости. Затем к биомассе добавляли прилипатель, растекатель и наполнитель. Всё перемешивали, распределяли тонким слоем на гладкой поверхности, высушивали под вытяжкой при температуре 25–28 °C до влажности 6–7 % и размалывали на мельнице с охлаждением. Влажность лабораторных образцов микробиопрепаратов определяли стандартным методом высушивания до постоянной массы (ГОСТ 5180-2015) [7]. Смесовой препарат получали, смешивая

СП, полученные из отдельно выращенных штаммов-продуцентов, в соотношении 1 : 1. Титр СП определяли методом разведения [8] по формуле:

$$T = \frac{a \times 10^n}{V},$$

где Т – количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1,0 г;

а – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения;

V – объем суспензии, взятый для посева;

10ⁿ – коэффициент разведения.

Защитный эффект лабораторных образцов микробиопрепаратов в препаративной форме СП и подбор оптимальных норм применения определяли на фоне искусственного заражения семян подсолнечника сорта Р-453 возбудителями белой гнили (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary) и фузариоза (*Fusarium sporotrichiella* var. *poae* (Pk.) Wr. emend Bilai) в лабораторных условиях во влажной камере [9]. Семена обрабатывали вручную, в круглодонных колбах, затем их раскладывали в растильни на влажную, проложенную ватой фильтровальную бумагу по 25 штук в 3-кратной повторности. На семена раскладывали блоки с мицелием белой гнили, вырезанные сверлом, размером 3 × 3 мм. В связи с тем, что фон с возбудителем фузариоза на агаровых блоках получался слабым, заражение проводили инокуляцией, выращенным на простерилизованных семянках подсолнечника. Растильни закрывали плёнкой и поддерживали влажную камеру при температуре 22–25 °С. Контроль – чистые необработанные семена с заражением патогеном. Испытывали нормы расходов лабораторных образцов микробиопрепаратов: 0,05; 0,10; 0,20 и 0,30 кг/т. Учёт проводили через пять суток. Биологическую эффективность лабораторных образцов микробиопрепаратов определяли по формуле [10]:

$$C = 100 (a - b) / a,$$

где С – биологическая эффективность, %;

а – количество больных растений в контроле шт.;

б – количество больных растений в варианте, шт.

Результаты и обсуждение. Лабораторные образцы микробиопрепаратов в препаратив-

ной форме СП, полученные при поверхностном культивировании каждого штамма на жидкой питательной среде, образовывали в воде стойкую суспензию. Исходный титр препаратов на основе гриба составил 10¹⁰ КОЕ/г, на основе бактерии – 10¹² КОЕ/г. Влажность лабораторных образцов СП микробиопрепаратов составляла 6,0–7,1 %. Определена биологическая эффективность обработки семян лабораторными образцами микробиопрепаратов на основе отдельных штаммов-продуцентов ВИЗР-24 *P. vermiculatum* и Б-12 *B. licheniformis* и их смеси в препаративной форме СП в зависимости от фона искусственного заражения возбудителем белой гнили и от нормы применения препаратов (табл. 1).

Таблица 1

Биологическая эффективность обработки семян подсолнечника лабораторными образцами СП микробиопрепаратов на основе отдельных штаммов-продуцентов ВИЗР-24 *Penicillium vermiculatum* и Б-12 *Bacillus licheniformis* и смесевых препаратов на фоне искусственного заражения возбудителем белой гнили в лабораторных условиях

г. Краснодар, ВНИИМК, 2018 г.

Вариант	Титр, КОЕ/г	Норма расхода кг/т	Биологическая эффективность, %		
Контроль без обработки, с внесением инфекции	-	-	78,0*	62,0*	44,0*
ВИЗР-24, СП	2,8–3,5 × 10 ¹⁰	0,05	-	80,3	72,7
		0,10	87,2	87,1	90,9
		0,20	79,5	90,3	85,5
Б-12, СП	3,7–7,1 × 10 ¹²	0,05	-	38,7	86,4
		0,10	5,1	6,5	81,8
		0,20	15,4	19,4	72,7
		0,30	-	35,5	63,6
Смесь СП, (ВИЗР-24 + Б-12)	1,1–1,5 × 10 ¹⁰ +	0,05	-	67,7	95,5
	4,3–6,5 × 10 ¹² -	0,10	82,1	96,8	95,5

*Поражение возбудителем белой гнили в контроле, %

На высоком фоне заражения возбудителем белой гнили (78,0 %) из испытанных норм расхода ВИЗР-24, СП максимальная биологическая эффективность (87,2 %) получена с нормой 0,1 кг/т (рис. 1). С увеличением нормы расхода препарата эффективность несколько снизилась, но оставалась высокой (79,5 %).

а б
Рисунок 1 – Эффективность обработки семян подсолнечника лабораторным образцом СП микробиопрепарата на основе штамма ВИЗР-24 *Penicillium vermiculatum* на фоне искусственного заражения возбудителем белой гнили:
а – контроль без обработки;
б – ВИЗР-24, СП с нормой расхода 0,1 кг/т (ориг.)

В варианте Б-12, СП отмечена невысокая эффективность при испытанных нормах расхода против возбудителя белой гнили – 5,1–15,4 %. Эффективность смесового препарата ВИЗР-24 + Б-12, СП с нормой расхода 0,1 кг/т составила 82,1 %, что оказалось несколько ниже таковой препарата на основе отдельного грибного штамма-продуцента (87,2 %), но гораздо выше, чем у отдельного бактериального штамма (5,1 %).

В дальнейшем в схему опыта добавили варианты с меньшей и большей нормой расхода препаратов (0,05 и 0,3 кг/т). На среднем фоне искусственного заражения возбудителем белой гнили (62,0 %) биологическая эффективность лабораторного образца ВИЗР-24, СП была высокой при всех нормах расхода, но максимальная (87,1 и 90,3 %) – при нормах 0,1 и 0,2 кг/т. Для лабораторного образца Б-12, СП максимальная эффективность отмечена с нормами расхода 0,05 кг/т (38,7 %) и 0,3 кг/т (35,5 %). Биологическая эффективность смесового лабораторного образца ВИЗР-24 + Б-12, СП на среднем фоне поражения патогеном (62,0 %) была выше при норме расхода 0,1 кг/т (96,8 %) и превышала эффективность в этой норме ВИЗР-24, СП (87,1 %) и, тем более, Б-12, СП (6,5 %) (рис. 2).

На невысоком фоне искусственного заражения возбудителем белой гнили (44,0 %) максимальная эффективность лабораторных образцов микробиопрепаратов на основе грибного штамма-продуцента установлена с

нормой расхода 0,1 кг/т (90,9 %), а на основе бактериального – с минимальной нормой 0,05 кг/т (86,4 %). Эффективность лабораторного образца смесового препарата с обеими нормами расхода (0,05 и 0,1 кг/т) составила 95,5 % и также превышала эффективность в этих нормах ВИЗР-24, СП (72,7–90,9 %) и Б-12, СП (86,4–81,8 %) соответственно.

а б
Рисунок 2 – Эффективность обработки семян подсолнечника лабораторным образцом СП смесового микробиопрепарата на основе штаммов ВИЗР-24 *Penicillium vermiculatum* и Б-12 *Bacillus licheniformis* на фоне искусственного заражения возбудителем белой гнили:
а – контроль без обработки;
б – ВИЗР-24 + Б-12, СП с нормой расхода 0,1 кг/т (ориг.)

Таким образом, установлено, что оптимальная норма расхода лабораторных образцов СП микробиопрепаратов на основе грибного штамма-продуцента ВИЗР-24 *P. vermiculatum* и смесового препарата, не зависимо от фона искусственного заражения возбудителем белой гнили, составила 0,1 кг/т. Для лабораторных образцов на основе бактериального штамма Б-12 *B. licheniformis* на высоком и среднем фонах заражения возбудителем белой гнили испытанные нормы расхода малоэффективны, тогда как на низком фоне оптимальная норма – 0,05 кг/т.

Кроме того, определены оптимальные нормы расхода лабораторных образцов СП микробиопрепаратов на основе испытанных штаммов-продуцентов на фоне искусственного заражения возбудителем фузариоза (табл. 2).

На среднем фоне заражения возбудителем фузариоза в контроле (62,0 %) высокая биологическая эффективность лабораторного образца ВИЗР-24, СП установлена при нормах расхода 0,1–0,2 кг/т – 74,2–93,5 % соответственно (рис. 3).

Таблица 2

Биологическая эффективность обработки семян подсолнечника лабораторными образцами СП микробиопрепаратов на основе штаммов ВИЗР-24 *Penicillium vermiculatum* и Б-12 *Bacillus licheniformis* и смесового препарата на фоне искусственного заражения возбудителем фузариоза в лабораторных условиях

г. Краснодар, ВНИИМК, 2018 г.

Вариант	Титр, КОЕ/г	Норма расхода, кг/т	Биологическая эффективность, %
Контроль без обработки, с внесением инфекции	-	-	62,0*
ВИЗР-24, СП	$6,8 \times 10^9$	0,05	35,5
		0,10	74,2
		0,20	93,5
Б-12, СП	$2,8 \times 10^{12}$	0,05	77,4
		0,10	64,5
		0,20	67,7
		0,30	58,1
Смесь СП, (ВИЗР-24+Б-12)	$1,5 \times 10^{10}$	0,05	80,6
	$6,5 \times 10^{12}$	0,10	71,0

*Поражение возбудителем фузариоза в контроле, %

Рисунок 3 – Эффективность обработки семян подсолнечника лабораторным образцом СП микробиопрепарата на основе штамма ВИЗР-24 *Penicillium vermiculatum* на фоне искусственного заражения возбудителем фузариоза:
а – ВИЗР-24, СП с нормой расхода 0,2 кг/т;
б – контроль без обработки (ориг.)

Для лабораторного образца Б-12, СП максимальная эффективность отмечена с нормой 160

расхода 0,05 кг/т – 77,4 %. Биологическая эффективность лабораторного образца смесового препарата на среднем фоне поражения патогеном была выше при норме расхода 0,05 кг/т (80,6 %) и превышала эффективность в этой же норме препаратов ВИЗР-24, СП (35,5 %) и Б-12, СП (77,4 %).

Выводы. 1. Для лабораторного образца СП микробиопрепарата на основе грибного штамма ВИЗР-24 *Penicillium vermiculatum* не зависимо от фона искусственного заражения возбудителями белой гнили (78,0; 62,0; 44,0 %) и фузариоза (62,0 %) оптимальная норма расхода составила 0,1–0,2 кг/т при эффективности 79,5–90,9 %.

2. Для лабораторного образца СП микробиопрепарата на основе бактериального штамма Б-12 *Bacillus licheniformis* на высоком (78,0 %) и среднем (62,0 %) фонах заражения возбудителем белой гнили испытанные нормы расхода малоэффективны (5,1–19,4 %), а на низком фоне склеротиниоза (44,0 %) и среднем – фузариоза (62,0 %), оптимальная норма – 0,05 кг/т при эффективности 86,4–77,4 % соответственно.

3. Для лабораторного образца СП смесового микробиопрепарата на основе смеси штаммов-продуцентов оптимальная норма расхода, не зависимо от фона искусственного заражения возбудителем белой гнили (78,0–44,0 %), составила 0,1 кг/т при эффективности 82,1–96,8 %, а на фоне среднего заражения возбудителем фузариоза (62,0 %) была выше при норме расхода 0,05 кг/т (80,6 %).

4. Биологическая эффективность лабораторного образца СП смесового микробиопрепарата на основе смеси штаммов-продуцентов на разных фонах искусственного заражения возбудителями белой гнили и фузариоза превышала эффективность препаратов на основе отдельных грибного и бактериального штаммов-продуцентов, что даёт возможность расширения спектра действия смесовых препаратов.

Список литературы

1. Маслиенко Л.В. Обоснование и разработка микробиологического метода борьбы с болезнями подсолнечника: дис. ... д-ра. биол. наук: защищена 03.06.05; утв. 07.10.05. – Краснодар, 2005. – 377 с.

2. Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х. Элементы лабораторного регламента производства микробиопрепаратов на основе грибных штаммов-продуцентов в препаративной форме «смачивающийся порошок» // Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2016. – Вып. 4 (168). – С. 100–107.

3. Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х. Элементы лабораторного регламента производства микробиопрепарата в препаративной форме «смачивающийся порошок» на основе бактерий-антагонистов из рода *Bacillus* // Масличные культуры: Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2017. – Вып. 3 (171). – С. 93–96.

4. Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х. Элементы лабораторного регламента производства микробиопрепарата в препаративной форме «смачивающийся порошок» на основе перспективного бактериального штамма-продуцента Sgrc-1 *Pseudomonas fluorescens* при поверхностном культивировании на жидкой питательной среде // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2018. – Вып. 1 (173). – С. 87–93.

5. Рудаков О.Л. Микофильные грибы, их биология и практическое значение. – М.: Наука, 1981. – 160 с.

6. Егоров Н.С. Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1957. – 78 с.

7. ГОСТ 5180-2015 Грунты. Методы лабораторного определения физических характеристик. – М.: Изд-во: ФГУП «Стандарт-информ», 2016. – 23 с.

8. Нетрусов Ф.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

9. Зайчук В.Ф. Об устойчивости подсолнечника к гнилям // Масличные культуры. – 1983. – № 1. – С. 16–17.

10. Груздев Г. С. Практикум по химической защите. – М.: Колос, 1983. – 230 с.

2. Masliyenko L.V., Voronkova A.KH. Elementy laboratornogo reglamenta proizvodstva mikrobiopreparatov na osnove gribnykh shtam-mov-produtsentov v preparativnoy forme «smachivayushchiysya poroshok» // Maslichnyye kul'tury: Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2016. – Vyp. 4 (168). – S. 100–107.

3. Masliyenko L.V., Voronkova A.KH. Elementy laboratornogo reglamenta proizvodstva mikrobiopreparata v preparativnoy forme «smachivayushchiysya poroshok» na osnove bakteriy-antagonistov iz roda *Bacillus* // Maslichnyye kul'tury: Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2017. – Vyp. 3 (171). – S. 93–96.

4. Masliyenko L.V., Voronkova A.KH. Elementy laboratornogo reglamenta proizvodstva mikrobiopreparata v preparativnoy forme «smachivayushchiysya poroshok» na osnove perspektivnogo bakterial'nogo shtamma-produtsenta Sgrc-1 *Pseudomonas fluorescens* pri poverkhnostnom kul'tivirovaniy na zhidkoy pitatel'noy srede // Maslichnyye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2018. – Vyp. 1 (173). – S. 87–93.

5. Rudakov O.L. Mikofil'nyye griby, ikh biologiya i prakticheskoye znachenie. – M.: Nauka, 1981. – 160 s.

6. Egorov N.S. Vydeleniye mikrobov-antagonistov i biologicheskiye metody ucheta ikh antibioticheskoy aktivnosti. – M.: Izd-vo Mosk. un-ta, 1957. – 78 s.

7. GOST 5180-2015 Grunty. Metody laboratornogo opredeleniya fizicheskikh kharakteristik. – M.: Izd-vo: FGUP «Standart-inform», 2016. – 23 s.

8. Netrusov F.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. Praktikum po mikrobiologii. – M.: Izdatel'skiy tsentr «Akademiya», 2005. – 608 s.

9. Zaychuk V.F. Ob ustoychivosti podsolnechnika k gnilyam // Maslichnyye kul'tury. – 1983. – № 1. – S. 16–17.

10. Gruzdev G. S. Praktikum po khimicheskoy zashchite. – M.: Kolos, 1983. – 230 s.

References

1. Masliyenko L.V. Obosnovaniye i razrabotka mikrobiologicheskogo metoda bor'by s boleznyami podsolnechnika: dis. ... d-ra. biol. nauk: zashchishchena 03.06.05; utv. 07.10.05. – Krasnodar, 2005. – 377 s.

Получено: 18.10.2018 Принято: 06.11.2018
Received: 18.10.2018 Accepted: 06.11.2018