НОВАЯ ФОРМА БИОПРЕПАРАТОВ – МИКРОКОНТЕЙНЕРЫ ИЗ ПОЛИМЕРНОГО БИОРАЗЛАГАЕМОГО МАТЕРИАЛА

УДК 632.9
ВАК 06.01.07

Жемчужина Н.С., к.б.н., Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов
ФГБНУ ВНИИ фитопатологии, zhemch@mail.ru

Фокин А.О., ООО "Фунгипак"

Елизарова С.А., Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов ФГБНУ
ВНИИ фитопатологии

Горелов П.В., к.б.н., Группа Компаний AWTech, gpv@awt.ru

Описаны результаты исследования защитных свойств микроконтейнеров из полимерного биоразлагаемого материала от воздействия УФ-излучения. Было показано, что использование предлагаемых микроконтейнеров может предотвратить гибель заключенных в них микроорганизмов от губительного воздействия УФ-излучения при инсоляции.

Реализация потенциальной продуктивности генотипа сельскохозяйственных культур и получение высоких урожаев невозможны без применения средств защиты растений и использования удобрений.

За время развития растениеводства человечество выработало различные приемы борьбы с вредными организмами, наносящими урон урожаю полевых культур. Основным способом защиты сельскохозяйственных растений в настоящее время остается химический метод. Несмотря на высокую эффективность, этот метод имеет ряд существенных недостатков, таких как отрицательное воздействие на окружающую среду, содержание в продукции остаточных количеств пестицидов, возникновение резистентных популяций вредителей. Наряду с этим, начиная с середины XX в., учеными ведутся разработки микробиологических средств, и в настоящее время продемонстрировано, что против ряда вредных объектов химические средства защиты могут быть заменены биологическими. Главным компонентом биологических препаратов являются бактерии и грибы – антагонисты патогенной микрофлоры, а также продукты их жизнедеятельности. Микробиологические пестициды безопасны для окружающей среды, их действие отличается высокой избирательностью и отсутствием резистентности, обработку ими можно осуществлять в любую фазу вегетации [1–4]. Применение биопестицидов постоянно растет, и в России уже применяются более 30 подобных препаратов.

Например, грибы рода *Beauveria* являются паразитами для широкого круга насекомых. Различные штаммы этих грибов используются в сельском хозяйстве для биологической защиты растений от насекомых-вредителей

в качестве альтернативы химическим пестицидам [5]. В последнее время усилилось внимание к энтомопатогенным и энтомотоксичным актиномицетам, особенно относящимся к роду *Streptomyces*. На их основе был создан ряд биопрепаратов с инсектоакарицидной активностью для защиты от тлей, оранжерейной белокрылки, трипсов, клещей и т.д. [6, 7]. Биологический фунгицидный препарат на основе грибов рода *Trichoderma* используется для борьбы с грибными фитопатогенами у овощных и зерновых культур [8], его действие основывается на разрушении мицелием гриба ферментов клеточной стенки мицелия грибов-патогенов. Почвенный гриб *Gliocladium catenulatum* входит в состав биофунгицидов Престоп, Глиоген и др., применение которых защищает растения от ряда распространенных патогенов – возбудителей корневых гнилей и сосудистых заболеваний (*Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Botrytis* spp.) [9, 10].

Другой класс микробиологических препаратов, применяемых в сельском хозяйстве, составляют биопрепараты на основе высокоэффективных штаммов клубеньковых бактерий (ризобий), которые вступают в симбиоз с растением и обеспечивают его биологическим азотом [11, 12]. В частности, биопрепараты (Ризобиофит, Азофикс, Ризогумин и др.), применяемые в современных технологиях выращивания сои, содержат клубеньковые бактерии *Bradyrhizobium japonicum* – сапрофитный азотфиксирующий симбионт сои (*Glycine max*).

Однако использование микроорганизмов в сельском хозяйстве сопряжено с рядом трудностей: микроорганизмы чрезвычайно чувствительны к погодным условиям и быстро теряют свою эффективность при высоких

уровнях солнечной инсоляции и температуры, а также низкой влажности воздуха. Так, известно, что под действием прямого солнечного света конидии грибов теряют жизнеспособность в течение нескольких часов, что приводит к значительному снижению эффективности микоинсектицидных биопрепаратов [13, 14]. Поэтому поиск протекторов микроорганизмов является актуальной задачей.

В нашей работе мы оценивали эффективность микроконтейнеров из полимерного материала [15] для защиты от УФ-излучения микроорганизмов, используемых для производства биопрепаратов. Микроконтейнеры (МКК) представляют собой пустотелые микрокапсулы из полимерного материала (полимочевины) с отверстиями для введения микроорганизмов (рис.1). В зависимости от способа получения размеры МКК и диаметр отверстий могут быть разными, что позволяет использовать их для разных типов микробных клеток. Полимер оболочки инертен по отношению к спорам и бактериям, экологически безопасен (разлагается микроорганизмами до диоксида углерода и воды) и термостабилен (не меняет своих свойств при температуре от -50 до $+150^{\circ}\text{C}$).

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определить эффективность МКК для защиты целевых микроорганизмов, используемых для производства биопрепаратов, от неблагоприятных факторов окружающей среды, в частности, от инсоляции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты проводили в Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов ФГБНУ ВНИИ фитопатологии.

В качестве тест-объектов использовали микроорганизмы – агенты биологического контроля:

- *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.;
- *Streptomyces* sp. (Waksman and Henrici);
- *Trichoderma viride* (Pers., 1794);
- *Gliocladium catenulatum* (Gilman et Abbott, 1927);
- *Bradyrhizobium japonicum* (Kircher 1896, Jordan 1982).

Получение препаратов с МКК. Проавтоклавированные при 0,5 атм в течение 40 мин МКК в асептических условиях смешивали с жидкими культурами микроорганизмов из расчета 300 г МКК на 1 л культуры и инкубировали на ротационной качалке при 200 об/мин в течение 120 мин при комнатной температуре. Поскольку МКК полые внутри, изменением объема пренебрегали. В качестве контрольных образцов использовали культуру, в которую не добавляли МКК. Для проведения экспериментов использовали полученные суспензии целиком.

Рис.1. Микрофотография микроконтейнеров (объектив $\times 40$)

Облучение УФ-лучами. Суспензии культур микроорганизмов и препаратов предварительно разводили в 10 раз. По 7 мл разведенных суспензий жидких культур и препаратов с МКК помещали в стерильные стеклянные чашки Петри диаметром 5 см. Облучение проводили в открытых чашках Петри с периодическим перемешиванием, мощность источника излучения 30 Вт, длина волны 254 нм, расстояние от источника до объекта 50 см, время облучения 5–120 мин. В качестве контроля использовали необлученные суспензии. Контрольные и опытные варианты высевали на агаризованную питательную среду двумя способами: 1) по 100 мкл контрольных и опытных вариантов высевали в виде капель на агаризованную среду; 2) готовили серийные разведения в стерильной водопроводной воде и по 100 мкл из каждого разведения при помощи шпателя Дригальского распределяли по поверхности агаризованной питательной среды в чашках Петри. Чашки инкубировали в термостате при 28°C до появления колоний, после чего отмечали наличие роста и подсчитывали колонии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты посева на питательную среду облученных и необлученных суспензий микроорганизмов и препаратов приведены в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что облучение суспензий грибных спор и бактериальных клеток в течение 5 мин приводило к замедлению (*Trichoderma viride*, *Beauveria bassiana*) или полному подавлению (*Streptomyces* sp.) роста, а увеличение экспозиции до 90 и 120 мин полностью убивало живые клетки всех исследованных микроорганизмов. В то же время облучение препаратов с МКК для всех объектов исследования визуально

Таблица 1. Рост на агаризованной питательной среде облученных и необлученных суспензий микроорганизмов и препаратов, аликвоты по 100 мкл

Вариант	Время облучения, мин							
	0	5	10	20	30	60	90	120
<i>Beauveria bassiana</i>	+++	+	-	-	-	-	-	-
<i>Beauveria bassiana</i> + МКК	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Trichoderma viride</i>	+++	++	++	+	+	+	-	-
<i>Trichoderma viride</i> + МКК	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Gliocladium catenulatum</i>	+++	+++	++	++	+	-	-	-
<i>Gliocladium catenulatum</i> + МКК	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Streptomyces</i> sp.	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. + МКК	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	+++	+++	++	+	+	+	-	-
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> + МКК	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Обозначения: "+++" – интенсивный рост, "++" – замедленный рост, "+" – незначительный рост, "-" – отсутствие роста

Таблица 2. Результаты УФ-облучения споровых суспензий *Beauveria bassiana* и препаратов с МКК (КОЕ/мл)

№ опыта	Споровая суспензия		Споры + МКК	
	без облучения	УФ	без облучения	УФ
1	$8,8 \times 10^7$	0	$7,2 \times 10^7$	$0,6 \times 10^7$
2	$1,3 \times 10^8$	0	$1,1 \times 10^8$	$2,8 \times 10^7$
3	$6,6 \times 10^8$	$6,0 \times 10^2$	$3,6 \times 10^8$	$7,8 \times 10^7$
4	$4,1 \times 10^8$	0	$1,7 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
5	$6,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
6	$4,0 \times 10^8$	0	$2,0 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$

Таблица 3. Результаты УФ-облучения клеточных суспензий *Bradyrhizobium japonicum* и препаратов с МКК (КОЕ/мл)

№ опыта	Клеточная суспензия		Клеточная суспензия + МКК	
	без облучения	УФ	без облучения	УФ
1	$1,9 \times 10^8$	0	$2,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
2	$1,4 \times 10^8$	0	$2,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$

не влияло на их жизнеспособность. Полученные данные свидетельствуют о том, что МКК надежно защищают микроорганизмы от УФ-излучения.

Для гриба *Beauveria bassiana* и бактерии *Bradyrhizobium japonicum* методом посева серийных разведений опре-

деляли количество колониеобразующих единиц в 1 мл суспензии спор и клеток (КОЕ/мл), а также препаратов с МКК без облучения и после УФ-облучения (таблицы 2, 3). Центром колониеобразования в случае исследования препарата с МКК является единичный

МКК, количество микроорганизмов в котором может варьировать от 0 до нескольких десятков в зависимости от диаметра МКК, размера микроорганизма, параметров смешивания и т.д.

При высеве серийных разведений суспензий спор, клеток и препаратов с МКК было обнаружено, что при получении препаратов с МКК КОЕ/мл уменьшается для гриба *Beauveria bassiana* в 1,2–2,4 раза, а для бактерии *Bradyrhizobium japonicum* – примерно в 7 раз. Это может быть следствием неравномерности распределения, вследствие чего в один МКК попадают больше чем одна грибная спора или бактериальная клетка. Разницу в уменьшении показателя КОЕ/мл между *Beauveria bassiana* и *Bradyrhizobium japonicum* при получении препаратов с МКК можно объяснить тем, что бактериальные клетки гораздо меньше грибных спор, поэтому большее их количество может попасть в один контейнер.

После УФ-облучения показатель КОЕ/мл для суспензий спор и бактерий в большинстве экспериментов уменьшался практически до нуля, в то же время уменьшение этого показателя для препаратов с МКК было незначительным. Это говорит о том, что основная часть клеток попадает в МКК, а наблюдаемое уменьшение КОЕ/мл связано с гибелью свободных клеток.

Таким образом, результаты наших экспериментов показали, что использование предлагаемых МКК при производстве биопрепаратов может предотвратить гибель заключенных в них микроорганизмов от губительного воздействия УФ-излучения, неизбежно происходящего при инсоляции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тихонович И.А., Кожемяков А.П., Чеботарь В.К., Круглов Ю.В., Кандыбин Н.В., Лаптев Г.Ю. Биопрепараты в сельском хозяйстве. Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве. М.: ВНИИСХМ, 2005. 154 с.
2. Завалин А.А. Биопрепараты, удобрения и урожай. М.: ВНИИА, 2005. 302 с.
3. Кожемяков А.П., Лактионов Ю.В., Попова Т.А., Орлова А.Г., Кокорина А.Л., Вайшла О.Б., Агафонов Е.В., Гужвин С.А., Чураков А.А., Яковлева М.Т. Агротехнологические основы создания усовершенствованных форм микробных биопрепаратов для земледелия // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50, № 3. С. 369–376.
4. Монастырский О.А. Нужны ли биопрепараты и биологическая защита растений сельскому хозяйству? // <https://www.agroxxi.ru/journal/20060406/20060406007.pdf>
5. Огарков Б.Н., Огаркова Г.Р. Энтомопатогенные грибы Восточной Сибири. Иркутск: Издательство Иркутского университета, 2000. 134 с.
6. Анисимова О.С. Биологическое обоснование использования вторичных метаболитов *Streptomyces loidensis* и *Streptomyces herbaricolor* для создания новых инсектоакарицидных биопрепаратов. Дисс. канд. ... биол. наук. СПб., 2008. <http://www.dissercat.com/content/biologicheskoe-obosnovanie-ispolzovaniya-vtorichnykh-metabolitov-streptomyces-loidensis-i-st#ixzz5luit6OVX>
7. Бойкова И.В. Актиномицеты – основа новых биопрепаратов для защиты растений от вредных членистоногих. Информ. бюл. ВПРС МОББ. СПб., 2002. С. 102–113.
8. Алимова Ф.К. Некоторые вопросы применения препаратов на основе грибов рода *Trichoderma* в сельском хозяйстве. <http://www.centrbio.com/news/1.pdf>
9. Huang H.C. *Gliocladium catenulatum*: hyperparasite of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium* sp. // Canadian journal of botany. 1978. Vol. 56. P. 2243–2246.
10. Глобус Г.А., Морозов В.М., Гадаборшев Р.Н., Бровцев М.А. Штамм гриба *Gliocladium catenulatum* Gilmann et Abbott для получения биопрепарата против грибных возбудителей сосудистых болезней и корневых гнилей растений. Патент №2307156 <http://allpatents.ru/get?number=2307156>
11. Щегольков А.В., Махонин В.Л. Оценка инокулянтов при возделывании сои в рисовых севооборотах Краснодарского края. VI международная конференция молодых ученых и специалистов. ВНИИМК, 2011. С. 370–373.
12. Крутило Д.В. Эффективность штаммов *Bradyrhizobium japonicum* на фоне местных популяций ризобий сои // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2014. Т. 114, № 4. С. 42–47.
13. Braga G.U.L., Flint S.D., Messias C.L., Anderson A.J., Roberts D.W. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae* // Mycol. Res. 2001. V. 105, № 7. P. 874–882.
14. Wraight S.P., Inglis G.D., Goettel M.S. Fungi. Field manual of techniques in invertebrate pathology. Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Springer, 2007. P. 223–248.
15. Фокин О.В., Серегин В.В. Биологически активный препарат для защиты растений от вредителей, способ его получения, микроконтейнер для названного препарата, способ его изготовления и способ защиты растений от вредителей. Патент (19) RU (11) 2 581 929(13) С2.