

*На правах рукописи*

**МАСЛЕННИКОВА СВЕТЛАНА НИКОЛАЕВНА**

**ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММА *PSEUDOMONAS ASPLENII* 11RW  
ДЛЯ СОЗДАНИЯ ФУНГИЦИДНОГО ПРЕПАРАТА ШИРОКОГО СПЕКТРА  
ДЕЙСТВИЯ**

Специальность: 1.5.11 – Микробиология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Щелково – 2022

Работа выполнена в секторе биотехнологии отдела биологических исследований Акционерного общества «Щелково Агрохим», г. Щелково, Московская обл.

**Научный руководитель:**

**Каракотов Салис Добаевич**, академик РАН, доктор химических наук (специальность 2.6.10 «Технология органических веществ»), генеральный директор Акционерного общества «Щелково Агрохим».

**Официальные оппоненты:**

**Новикова Ирина Игоревна**, доктор биологических наук (специальность 1.5.11 «Микробиология»), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория микробиологической защиты растений, ведущий научный сотрудник, Санкт-Петербург, г. Пушкин;

**Марданова Айслу Миркасымовна**, доктор биологических наук (специальность 1.5.11 «Микробиология»), доцент, Институт фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра микробиологии, профессор кафедры, г. Казань.

**Ведущая организация:**

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Пушкино Московской обл.

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

**Автореферат разослан** «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

**Ученый секретарь**

диссертационного совета 64.1.002.01  
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность и степень разработанности темы исследования.** Современное ведение сельского хозяйства невозможно без применения удобрений и средств защиты растений. Так, широкое использование минеральных удобрений, в первую очередь азотных, позволило за последние 50 лет поднять урожайность основных сельскохозяйственных культур более чем в 5 раз. Однако вместе с этим важно отметить, что производство и применение химических пестицидов и агрохимикатов оказывает существенное негативное влияние на окружающую среду и здоровье человека, снижает биоразнообразие, влияет на выброс парниковых газов, ухудшает плодородие почв (Sutton et al., 2011). Таким образом, существует научно-обоснованная необходимость обеспечения современного земледелия высокоэффективными препаратами, не оказывающими на компоненты агроценоза негативного влияния. Решение обозначенных проблем может быть достигнуто за счет поиска и селекции природных микроорганизмов, безопасных для окружающей среды и человека.

В этой связи, большой научный и практический интерес представляют ризобактерии, способствующие росту растений (от англ. Plant growth promotion rhizobacteria, PGPR). Наибольшую эффективность среди группы PGPR обычно демонстрируют флуоресцентные виды р. *Pseudomonas*, характеризующиеся широким набором полезных для растений свойств. Псевдомонады способны активно колонизировать корни и продуцировать различные биологически активные метаболиты, что обеспечивает достоверное увеличение урожайности (Majeed et al., 2018). Положительное влияние псевдомонад связывают с улучшением азотного (Li et al., 2017) и фосфорного (Qessaoui et al., 2019) питания, выделением гормонов (Ortiz-Castro et al., 2020; Chu et al., 2020), продукцией веществ антибиотической природы (Gross, Loper, 2009; Weller et al., 2007), угнетающих фитопатогенные микроорганизмы, повышением устойчивости растений к абиотическим стрессовым факторам (Ma et al., 2016) и др.

Большое разнообразие полезных свойств псевдомонад определяет огромный исследовательский интерес к данному роду и выявляет их потенциал для промышленного применения. Перспективы практического использования бактерий р. *Pseudomonas* очевидны и подтверждены многочисленными лабораторными и полевыми исследованиями. Благодаря своему многогранному действию на основе отселектированных штаммов псевдомонад (чаще всего видов *P. fluorescens*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*) создаются биопрепараты различного назначения: фосформобилизаторы, фитостимуляторы, фунгициды и др. Однако важно отметить, что далеко не все существующие на рынке биопрепараты на основе полезных псевдомонад отвечают высоким требованиям качества и часто характеризуются быстрой гибелью продуцента, коротким сроком хранения и, соответственно, низкой эффективностью продукта. Одновременно с этим, несмотря на множество проводимых исследований, имеется чрезвычайно мало данных, касающихся исследования вида *P. asplenii* и аспектов его применения в сельском хозяйстве. В связи с этим актуальной и важной задачей является исследование малоизученного вида, а также разработка конкурентоспособного препарата на его основе со стабильной препаративной формой, продолжительным сроком хранения и высокой биологической эффективностью.

**Целью исследования** явился поиск нового штамма-антагониста и обоснование возможности его применения в качестве продуцента для создания фунгицидного биопрепарата с широким спектром действия против фитопатогенов сельскохозяйственных культур.

### **Задачи исследования:**

1. Выделить чистые культуры ризосферных, эндофитных и эпифитных бактерий различных растений и провести скрининг созданной коллекции для отбора наиболее активного антагониста;
2. Изучить культуральные, физиолого-биохимические и хозяйственно-ценные свойства отобранного штамма, оценить его безопасность по отношению к растениям и теплокровным животным;
3. Подобрать состав питательной среды и условия глубинного периодического культивирования отобранного штамма, оценить влияние стабилизирующих добавок на хранение прототипа препарата;
4. Изготовить лабораторные образцы препарата и оценить его эффективность в лабораторных и полевых экспериментах.

**Научная новизна.** Получены новые данные о возможности применения штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW в сельском хозяйстве в качестве защитного и ростстимулирующего агента. Выявлена высокая способность нового штамма к подавлению широкого спектра фитопатогенных грибов за счет хелатирования ионов железа при помощи сидерофоров и продукции антимикробных летучих метаболитов. Выявлено рострегуляторное действие штамма *P. asplenii* 11RW благодаря синтезу фитогормонов типа ауксинов, фосфатмобилизующей активности и продукции аммония. Впервые создан препарат на основе штамма *P. asplenii* 11RW, демонстрирующий высокую эффективность в защите плодовых и зерновых культур в полевых условиях. Научно-практическая новизна разработки подтверждена патентом РФ.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные данные расширяют представление о биоразнообразии микроорганизмов, ассоциированных с растениями, а также раскрывают перспективы их применения в качестве объектов агробιοтехнологии.

Коллекции микроорганизмов пополнены 7 новыми культурами: *Pseudomonas asplenii* 11RW (ВКПМ В-13395), *Bacillus amyloliquefaciens* 2RW-2 (ВКПМ В-13578), *Bacillus aryabhatai* BR4 (ВКПМ В-13579), *Paenibacillus mucilaginosus* 27 (ВКПМ В-13582), *Bacillus mojaviensis* 1RW (ВКПМ В-13580), *Bacillus subtilis* 1ES (RCAM03132), *Bacillus* sp. 4ES (RCAM03134), характеризующиеся наличием важных хозяйственно-ценных свойств и представляющие интерес для исследований, как в фундаментальном, так и прикладном аспектах.

Выявлены механизмы положительного влияния на рост и развитие растений нового штамма *P. asplenii* 11RW. Апробирована технология получения антимикробного препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW, проведены полевые испытания и получены положительные заключения о проведенных опытах. На основе штамма *P. asplenii* 11RW был создан микробиологический фунгицид под торговым названием «Биокомпозит-Про, Ж», прошедший государственную регистрацию, получивший свидетельство о государственной регистрации пестицида №018-02-3837-1 на срок по 24.10.2032 г. и допущенный к обороту на территории Российской Федерации.

**Методология и методы исследования.** Для решения поставленных задач применялась совокупность общенаучных и специальных методов. Среди общенаучных методов были использованы сбор информации и анализ литературных источников, систематизация, обобщение, эксперимент, наблюдение, сравнительный анализ.

Среди специальных методов исследования ключевую роль играли микробиологические методы с использованием чистых культур бактерий для анализа их физиолого-биохимических свойств, микроскопия, метод гнотобиологических систем, вегетационные испытания и методы периодического глубинного культивирования.

Полученные результаты обрабатывали статистическими методами: вычисляли средние значения и ошибки среднего значения по вариантам опытов, достоверность различий средних значений оценивали по критерию Стьюдента.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Новый штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW обладает комплексом полезных свойств, которые могут быть использованы в практических целях.

2. Способность штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW к подавлению фитопатогенов определяется активным синтезом сидерофоров и летучих экзометаболитов.

3. Оптимизированный состав среды, условия культивирования и добавки способствуют стабильному хранению препарата на основе штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW в течение 3 лет без потери хозяйственно-ценных свойств.

4. Разработанный биопрепарат на основе штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW, обладающий широким спектром и высоким уровнем антагонистической активности против фитопатогенных грибов, обеспечивает высокий уровень биологической эффективности в полевых условиях.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Работа выполнена в секторе биотехнологии отдела биологических исследований АО «Щелково Агрхим» в 2018-2022 гг. Достоверность результатов диссертационной работы обеспечена современными методами исследования и достаточным количеством фактического материала.

Основные результаты работы доложены на Международной научной конференции «Современные проблемы медицины и естественных наук» (Йошкар-Ола, 2019 г.); VII и VIII Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Севастополь, 2019-2020 гг.); XI Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2019 г.); 72-й Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2019 г.); IV Всероссийском съезде по защите растений с международным участием «Фитосанитарные технологии в обеспечении независимости и конкурентоспособности АПК России» (Санкт-Петербург, 2019 г.); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы интегрированной защиты плодовых, декоративных и лесных культур» (Ялта, 2020 г.).

**Публикации.** Результаты проведенных исследований опубликованы в 22 научных работах: в 6 статьях в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них 2 публикации в журналах, входящих в международные базы Web of Science и Scopus; 3 патента РФ; 6 статьях в других изданиях, а также 7 публикациях в сборниках научных статей и материалах конференций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературных источников, описания методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, приложения, списка используемой литературы, включающего 301 источник. Диссертация изложена на 149 страницах печатного текста, включает 13 рисунков и 57 таблиц.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Материалом** для выделения бактериальных штаммов служили различные образцы почв сельскохозяйственных угодий; ризосферные почвы, отобранные с корней древесных (ель, сосна, пальма, чай, фундук) и сельскохозяйственных растений (пшеница, горчица); семена (ель, сосна, свёкла) и вегетативные части различных субтропических культур (азимина, чай, персик, мандарин, грейпфрут, фейхоа, киви, фундук, хурма).

**Видовую идентификацию** штамма *P. asplenii* 11RW проводили методом секвенирования переменных участков генов, кодирующих 16S рРНК.

**Патогенность** штамма *P. asplenii* 11RW изучали в соответствии с методическими указаниями Минздрава СССР №4263-87, №2620-82, методическими рекомендациями РГМУ «Критерии оценки патогенных свойств штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологического синтеза» и с учетом рекомендаций ВОЗ (бюлл. ВОЗ №6, 1981).

**Культурально-морфологические свойства** штамма *P. asplenii* 11RW изучали с помощью общепринятых микробиологических методов.

**Способность к синтезу сидерофоров** изучали с использованием CAS-агара, содержащего комплекс  $Fe^{3+}$ , гексадецилтриметиламмоний бромид (HDTMA) и краситель хромазуrol S (CAS-реактив) (Aroga, Verma, 2017). Количественное определение сидерофоров изучали при культивировании штамма в жидкой среде SM с последующим добавлением CAS-реактива и построением калибровочной кривой (Sayyed et al., 2005).

**Фунгицидную и бактерицидную активность** исследуемой культуры *P. asplenii* 11RW проверяли на штаммах фитопатогенных грибов и бактерий различной таксономической принадлежности методом диффузии в инфицированный двухслойный картофельно-сахарозный агар.

**Фунгицидную активность летучих соединений** изучали при культивировании изучаемого штамма *P. asplenii* 11RW и фитопатогенных грибов без непосредственного контакта по методике Гарбева с соавт. (Garbeva, 2014).

**Ростстимулирующую активность летучих соединений** изучали на семенах табака (*Nicotiana tabacum* L.) в двухсекционных чашках Петри при культивировании проростков на среде Мурасиге-Скуга (1/2) и изучаемого штамма *P. asplenii* 11RW на среде R2A без непосредственного контакта, а также в стерильном вермикулите в двойных вегетационных сосудах.

**Синтез ИУК** штаммом *P. asplenii* 11RW изучали при его культивировании на жидкой среде R2A с 500 мг/л L-триптофана с последующим использованием реактива Сальковского (Gordon, 1951). Для количественного определения строили калибровочную кривую со стандартными растворами индолилуксусной кислоты (10, 20, 30, 40, 50 мкг/мл).

**Фосфатмобилизующую активность** оценивали на среде Пиковской, содержащей  $Ca_3(PO_4)_2$  в качестве единственного источника фосфора.

**Ростстимулирующую активность** штамма *P. asplenii* 11RW в условиях *in vitro* изучали в микровегетационных опытах на семенах пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Дарья, ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Таловский, кукурузы (*Zea mays* L.) гибрида Симпатия. Посевы выращивали при температуре 24°C и 16/8-часовом периоде освещения 36-41 суток, в течение которых фиксировали всхожесть, динамику изменения роста растений, а по окончании опыта длину корневой системы, сухую и сырую биомассу.

**Подбор питательной среды** проводили при культивировании в колбах на средах R2A, King's B, ГМФ, минеральной среде с мелассой, минеральной среде с глюкозой в шейкере-инкубаторе при 30°C и 220 об/мин в течение 48 часов, после чего определяли оптическую плотность суспензий и титр жизнеспособных клеток.

**Периодическое глубинное культивирование** штамма *P. asplenii* 11RW проводили с использованием лабораторного ферментера Biostat A (Sartorius Stedim, Германия) с рабочим объёмом 1 л и пилотного ферментера («Эй Пи Биосистемы», Москва) с рабочим объёмом 12 л, оснащенных датчиками температуры, pH, концентрации растворенного кислорода с автоматической регулировкой контролируемых параметров и компьютерным управлением.

**Хранение прототипа препарата.** Для анализа стабилизирующего действия, а также сроков хранения лабораторных образцов препарата использовали различные добавки, которые добавляли к суспензии *P. asplenii* 11RW с исходным титром 10<sup>9</sup> КОЕ/мл. Титр жизнеспособных клеток в различных вариантах смешивания определяли в течение 3-х лет хранения при температуре 4-6°C.

**Испытание опытного образца препарата** в системе защиты яблони от парши, мучнистой росы и монилиальной плодовой гнили и винограда от серой гнили, милдью и оидиума проводили в условиях республики Крым и Краснодарского края согласно методическим указаниям (Доспехов, 1965; Билай, 1973, Методические указания, 1999; Методические указания, 2009 и др.).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Поиск нового штамма-антагониста для создания микробиологического препарата

Из различных объектов в чистые культуры выделили более 350 культивируемых ризосферных, эпифитных и эндофитных бактериальных штаммов, ассоциированных с растениями. По результатам анализа выявили, что 43% от общего количества изолятов относятся к спорообразующим палочкам (*p. Bacillus, Paenibacillus, Brevibacillus*), 57% являются неспорообразующими культурами, представленные различными палочками, кокками и полиморфными видами (*p. Azotobacter, Agrobacterium, Empedobacter, Ensifer, Micrococcus, Pantoea, Phyllobacterium, Pseudomonas* и др.).

Для систематизации изолятов в созданной коллекции и отбора наиболее перспективных микроорганизмов провели анализ антагонистической активности в отношении 3-х штаммов фитопатогенных грибов (*Fusarium graminearum, Fusarium sporotrichiodes* и *Fusarium culmorum*) и 3-х штаммов фитопатогенных бактерий (*Pectobacterium carotovorum, Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* и *Pseudomonas syringae*), а также анализ продукции ауксинподобных веществ.

По результатам проведенной работы отобрали 25 микроорганизмов с наибольшим антимикробным действием, среди которых наиболее активным явился штамм 11RW, способный одновременно продуцировать ИУК и значительно ингибировать рост всех изученных фитопатогенных грибов и бактерий. По результатам анализа сиквенсов переменных участков генов, кодирующих 16S рРНК, а также биохимическим тестам отобранный штамм был отнесён к виду *Pseudomonas asplenii*. Культуру депонировали во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов по процедуре национального патентного депонирования под регистрационным номером В-13395.

Доказали, что в тестах на белых крысах и белых мышах штамм *P. asplenii* 11RW не обладает вирулентностью, диссеминацией, токсичностью и токсигенностью, поэтому является безопасным для дальнейшего применения.

Таким образом, по результатам предварительного испытания выявили высокую перспективность штамма *P. asplenii* 11RW как возможного продуцента для создания микробиологического препарата для сельского хозяйства, который был отобран для дальнейшего исследования. В частности, показаны его высокая фунгицидная активность, способность к продуцированию ИУК и отсутствие патогенности для теплокровных животных.

## **2. Культуральные, физиолого-биохимические и хозяйственно-ценные свойства штамма *P. asplenii* 11RW**

**Культуральные, физиолого-биохимические свойства штамма *P. asplenii* 11RW.** Культура *P. asplenii* 11RW представляет собой короткие одиночные грамтрицательные палочки. Штамм является мезофилом (диапазон температур – 20-37°C, оптимум 30±2°C), предпочитает нейтральные или слабо-щелочные условия (диапазон pH – 5,5-8,0, оптимум – 7,0-7,5), способен расти при 4% NaCl в среде.

При культивировании на агаризованных средах R2A и ГМФ при 30°C через 24 часа образует бежевые колонии диаметром 1 мм. Через 72 часа на указанных средах штамм выделяет водорастворимый флуоресцирующий пигмент.

Штамм обладает выраженной протеолитической активностью (разжижает желатину), синтезирует липазу, оксидаз- и каталазположительный, утилизирует глюкозу, инозит и сорбит, реакция Фогеса-Проскауэра отрицательная, способен продуцировать H<sub>2</sub>S.

**Анализ синтеза сидерофоров.** Первичный скрининг для обнаружения продукции сидерофоров проводили при культивировании штамма *P. asplenii* 11RW на CAS-агаре, рост которого сопровождался изменением цвета индикатора с синего на желтый, что указывало на образование сидерофоров. Для их количественного определения в культуральной жидкости штамм *P. asplenii* 11RW выращивали на жидкой среде SM без источников железа. При смешивании бесклеточной культуральной жидкости с равным объёмом реактива CAS также наблюдалось изменение окраски реактива синего цвета на жёлто-оранжевый, что свидетельствовало о положительной продукции сидерофоров, количество которых составило 92,3% сидерофорных единицы.

**Спектр фунгицидного действия штамма.** Спектр фунгицидного действия исследуемой бактерии проверяли на 108 штаммах фитопатогенных грибов различной таксономической принадлежности (р. *Alternaria*, *Fusarium*, *Cercospora*, *Phytophthora*, *Bipolaris*, *Pyricularia* и др.), являющихся возбудителями заболеваний основных сельскохозяйственных культур, древесных и декоративных растений. Полученные результаты выявили мощное фунгицидное действие штамма *P. asplenii* 11RW: при высокой нагрузке фитопатогенного фона в условиях *in vitro* данная бактерия активно ингибировала рост 106 из 108 проанализированных тест-объектов, исключение составили штаммы *Fusarium solani* и *Fusarium oxysporum* 96801. Средний размер зон ингибирования роста фитопатогенов составил от 15 до 77 мм.



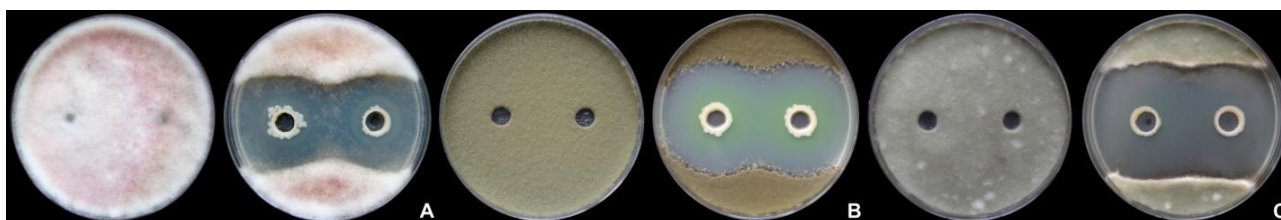


Рисунок 1 – Результаты анализа фунгицидной активности штамма *P. asplenii* 11RW против фитопатогенных грибов *Fusarium culmorum* 63 (А), *Cladosporium herbarum* (В) и *Alternaria alternate* Д6 (С) в сравнении с контролем

**Бактерицидная активность.** Бактерицидную активность проверяли на 11 штаммах фитопатогенных бактерий родов *Pseudomonas*, *Clavibacter*, *Pectobacterium* и *Xanthomonas*. Результаты опыта показывают, что штамм *P. asplenii* 11RW, обладающий высокой фунгицидной активностью, обладает также и бактерицидным действием: так, методом диффузии в двухслойный агар, инфицированный анализируемыми патогенами, обнаружили подавление роста 5 тест-объектов: *P. carotovorum* 480, *P. syringae* БИМ В-280, *X. arboricola* В-614, *X. arboricola* В-628, *X. vasicola* В-618.

**Влияние летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW на рост мицелия фитопатогенных грибов.** Для изучения способности штамма к продукции фунгицидных летучих веществ провели опыт с одновременным культивированием штамма *P. asplenii* 11RW и фитопатогенных грибов без их непосредственного контакта (рис. 2).

Показали, что штамм *P. asplenii* 11RW синтезирует летучие соединения, обладающие фунгицидным действием против фитопатогенных грибов (табл. 1), к примеру, в бесконтактных системах разрастание мицелия грибов *A. tenuis*, *D. avenae*, *R. solani* и *Septoria* sp. под влиянием летучих метаболитов штамма *P. asplenii* 11RW полностью отсутствовало. Рост грибов *F. oxysporum* F-55071 и *F. sporotrichioides* 58871 при воздействии летучих экзометаболитов штамма не блокировался полностью, однако рост мицелия в этих вариантах был сильно редуцирован и ограничен.

Таблица 1 – Результаты анализа действия летучих веществ штамма *P. asplenii* 11RW на рост мицелия фитопатогенов

Вариант	Средний диаметр разрастания мицелия, мм	
	Контроль	Под влиянием летучих веществ <i>P. asplenii</i> 11RW
<i>Alternaria tenuis</i>	79,3±0,4	0
<i>Drechslera avenae</i>	60,0±0,3	0
<i>Rhizoctonia solani</i> 170	84,7±0,4	0
<i>Septoria</i> sp.	53,7±0,3	0
<i>Fusarium oxysporum</i> F-55071	81,3±0,3	26,3±0,3
<i>Fusarium sporotrichioides</i> 58871	84,8±0,4	14,9±0,3
<i>Fusarium ussurianum</i> 29813	74,9±0,3	0

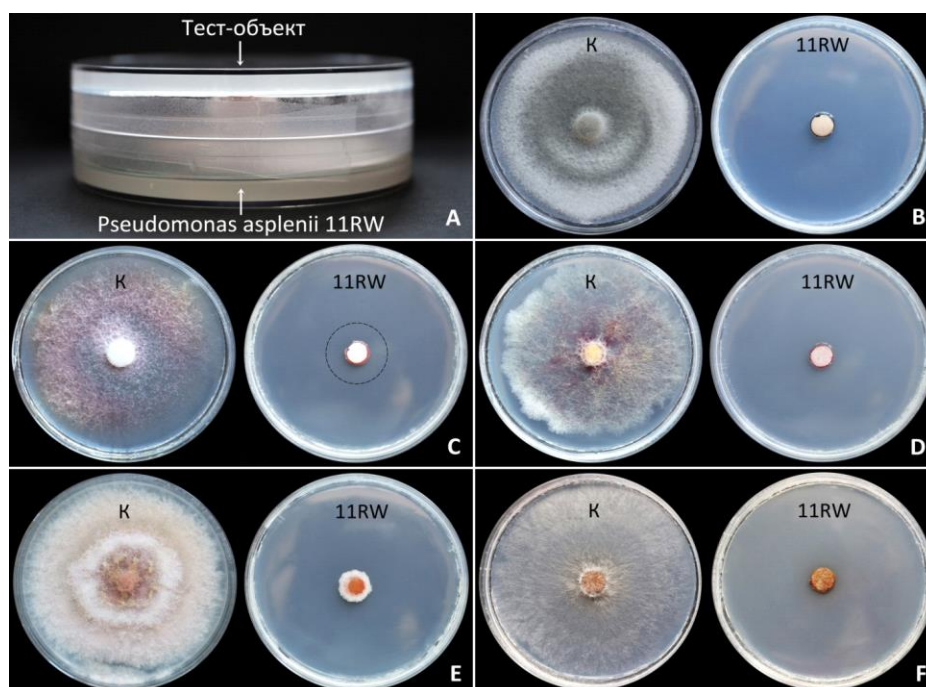


Рисунок 2 – Вид бесконтактной системы (А) и результаты оценки влияния летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW на рост *A. tenuis* (В), *F. oxysporum* F-55071 (С), *F. ussurianum* 29813 (D), *F. sporotrichioides* 58871 (Е) и *R. solani* 170 (F) в сравнении с контролем (К)

**Влияние летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW на прорастание конидий фитопатогенных грибов.** Показали, что штамм *P. asplenii* 11RW не только подавляет развитие мицелия грибов, но и структур бесполого размножения: так, без непосредственного контакта за счет действия летучих соединений наблюдали активное подавление прорастания конидий грибов *Alternaria tenuissima* 481-101 и *Bipolaris sorokiniana*. Данный эффект проявлялся уже через 24 ч и сохранялся к 7-м суткам инкубирования посевов. При этом под действием летучих веществ штамма *P. asplenii* 11RW у *B. sorokiniana* появлялись аномалии прорастающих конидий, выражающиеся в морфологических изменениях ростковых трубок, остановке в росте гиф с их последующим лизисом.

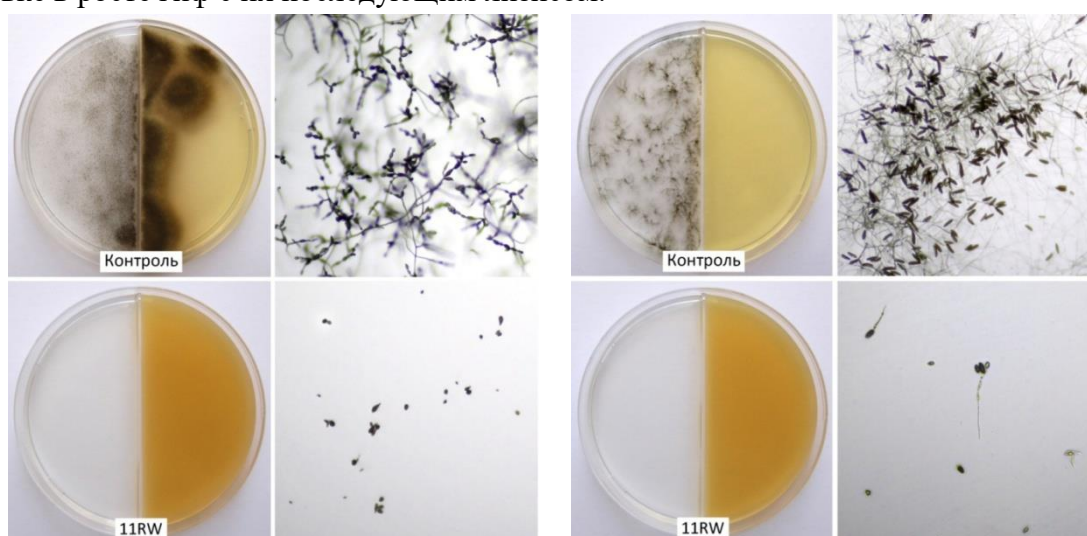


Рисунок 3 – Вид двухсекционных чашек Петри и развитие конидий *A. tenuissima* (слева) и *B. sorokiniana* (справа) в контроле и при воздействии летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW на 7-ые сутки инкубирования

Таблица 2 – Результаты анализа действия летучих веществ штамма *P. asplenii* 11RW на прорастание конидий

Фитопатоген	Вариант	Вид конидий	Количество конидий, %	
			24 ч	7 суток
<i>B. sorokiniana</i>	Контроль	Проросшие	70,1	98,9
		Непроросшие	29,9	1,1
	<i>P. asplenii</i> 11RW	Аномально проросшие	61,7	62,1
		Непроросшие	38,3	37,9
<i>A. tenuissima</i> 481-101	Контроль	Проросшие	77,6	99,0
		Непроросшие	22,4	1,0
	<i>P. asplenii</i> 11RW	Проросшие	16,4	16,4
		Непроросшие	83,6	83,6

**Ростстимулирующее влияние летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW.**

Влияние летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW на рост и развитие растений оценивали в 2-х опытах с проращиванием семян табака без непосредственного контакта с анализируемым бактериальным штаммом. Результаты опытов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты анализа действия летучих веществ штамма *P. asplenii* 11RW на развитие проростков табака

Вариант	Опыт 1 (чашки Петри)				Опыт 2 (вермикулит)	
	Сорт Трапензонд -92		Сорт Вирджиния 202		Сорт Трапензонд -92	
	Средняя сырая биомасса, мг/раст	Средняя сухая биомасса, мг/раст	Средняя сырая биомасса, мг/раст	Средняя сухая биомасса, мг/раст	Средняя сырая биомасса, мг/раст	Средняя сухая биомасса, мг/раст
Контроль	43,0±0,9	3,5±0,08	14,0±0,1	1,1±0,03	116,7±0,7	8,3±0,16
<i>P. asplenii</i> 11RW	159,0±1,4	10,0±0,06	149,6±0,7	10,7±0,05	215,1±0,7	14,2±0,20

В первой части опытов семена табака проращивали при воздействии летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW без непосредственного контакта в двухсекционных чашках Петри на половинной среде Мурасиге-Скуга. Обнаружили, что газообразные метаболиты штамма *P. asplenii* 11RW обладают не только фунгицидным действием, но и способны стимулировать рост растений. Так, выявили, что проростки табака в данном варианте имели значительно более развитую корневую систему и вегетативную массу, а также более яркую пигментацию листьев. При этом развитие проростков в контрольном варианте было значительно редуцировано, и их рост быстро останавливался вследствие недостатка питания из питательной среды, содержащей лишь половину стандартного состава.

Во второй части опытов семена табака проращивали при воздействии летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW в стерильном вермикулите. В данном эксперименте контакт между прорастающими семенами и газообразными соединениями штамма был наиболее опосредованный и имел барьер в виде дна пластикового стаканчика и слоя вермикулита. Однако, в созданных условиях также показали ростстимулирующий эффект летучих метаболитов штамма, что согласуется с результатами первого опыта.

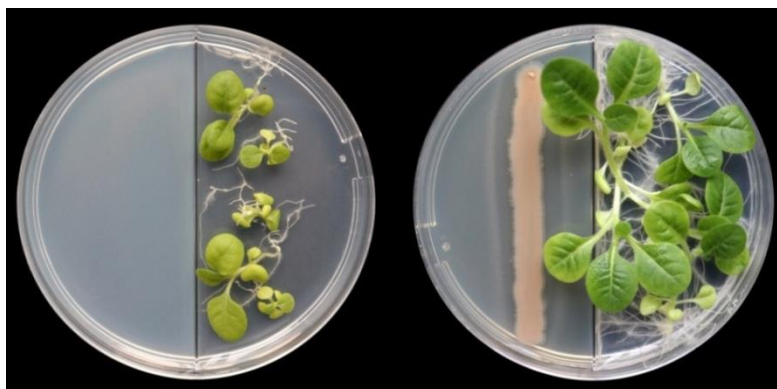


Рисунок 4 – Вид табака сорта Трапезонд-92 в контроле (слева) и при воздействии летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW (справа)

**Синтез ИУК и его производных.** Для выявления способности к синтезу фитогормона типа ауксинов, определяющего фитостимуляцию, использовали реактив Сальковского, дающий характерное розово-красное окрашивание. Культуральная жидкость штамма, выращенная среде R2A с добавлением 500 мг/л L-триптофана, окрашивалась реактивом в розовый цвет, что свидетельствовало о положительной способности штамма синтезировать индольные соединения. Концентрация ИУК при этом составила 31,8 мкг/мл.

**Фосфатмобилизующая активность.** Через 10 суток культивирования штамма *P. asplenii* 11RW на агаризованной среде Пиковской с  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  в качестве единственного источника фосфора обнаруживались зоны просветления, свидетельствующие о способности штамма к растворению трикальцийфосфата, диаметр гало при этом составил 16 мм.

**Ростстимулирующая активность в опытах *in planta*.** Ростстимулирующее действие штамма *P. asplenii* 11RW показали в условиях микровегетационного эксперимента на растениях пшеницы, ячменя и кукурузы. Обработка семян бактериальными суспензиями с титром жизнеспособных клеток  $10^9$  КОЕ/мл, расходом суспензий 1 л/т и рабочего раствора 10 л/т оказала положительное влияние на всхожесть, рост и развитие растений, обеспечив прибавку роста надземной части, так и биомассы растений. Так, в варианте обработки семян ячменя штаммом *P. asplenii* 11RW средняя длина растений и общая сухая биомасса превышала контрольные значения в среднем на 21,2% и 29,4% соответственно, в варианте обработки кукурузы – 11,5% и 50,7% соответственно.

Таблица 4 – Результаты микровегетационных опытов

Вариант	Всхожесть, %	Средняя длина побегов, см	Средняя длина корней, см	Средняя сухая биомасса, г/раст
Пшеница сорта Дарья (36 суток)				
Контроль	93	39,4±1,1	17,2±0,5	0,22±0,03
<i>P. asplenii</i> 11RW	95	41,0±1,5	16,9±0,9	0,24±0,02
Ячмень сорта Таловский (36 суток)				
Контроль	75	31,6±1,3	18,6±0,9	0,17±0,02
<i>P. asplenii</i> 11RW	83	38,3±1,0	18,9±0,8	0,22±0,01
Кукуруза гибрида Симпатия (41 сутки)				
Контроль	60	55,6±4,6	27,3±3,8	0,75±0,04
<i>P. asplenii</i> 11RW	67	62,0±3,1	28,1±2,1	1,13±0,05

### 3. Разработка метода получения микробиологического препарата на основе *P. asplenii* 11RW

**Глубинное культивирование штамма *P. asplenii* 11RW.** Изучили влияние состава некоторых жидких питательных сред, используемых для выращивания штамма

*P. asplenii* 11RW, на содержание жизнеспособных клеток. В таблице 5 представлены данные о содержании жизнеспособных клеток изучаемой культуры при выращивании на различных средах через 24 и 48 ч. Установили, что наиболее оптимальной средой, позволяющей достичь максимально высокий титр клеток, является минеральная среда с мелассой.

Таблица 5 – Влияние состава питательных сред на титр жизнеспособных клеток штамма *P. asplenii* 11RW

Питательная среда	24 ч		48 ч	
	ОП <sub>600</sub>	Средний титр, млрд КОЕ/мл	ОП <sub>600</sub>	Средний титр, млрд КОЕ/мл
R2A	0,093	0,51±0,02	0,138	3,04±0,07
King's B	0,361	2,96±0,14	0,429	5,47±0,16
ГМФ-бульон	0,611	6,18±0,17	0,904	20,60±1,08
Минеральная среда с мелассой	0,625	7,38±0,04	0,919	26,20±1,28
Минеральная среда с глюкозой	0,552	5,92±0,07	0,857	10,60±0,51

Изучение глубинного культивирования штамма проводили на лабораторном ферментере Biostat A с рабочим объёмом 1 л и пилотном ферментере с рабочим объёмом 12 л. Ранее показали, что оптимум температур для культивирования штамма *P. asplenii* 11RW находится в диапазоне 30±2°C, оптимум pH – 7,0-7,5. Используя полученные данные, проводили глубинное культивирование штамма *P. asplenii* 11RW на минеральной среде с мелассой для определения скорости роста культуры в подобранных условиях.

Таблица 6 – Глубинное культивирование штамма *P. asplenii* 11RW в лабораторном ферментере Biostat A

Инокулят	Условия культивирования	Проба	ОП <sub>600</sub>	Средний титр, млрд КОЕ/мл
16-часовая культура, выращенная в колбе; Объём – 10%	<p><i>Начальные параметры:</i>  Температура – 30°C; pH=7,25;  Аэрация: 1 л воздуха/1 л среды/мин;  Перемешивание: 400 об/мин;  Дальнейшее культивирование – с учетом потребности культуры в кислороде (поддержание содержания растворенного кислорода не менее 5-10%); температура и pH – неизменны.  Подтитровка: 10% раствор NaOH и 10% раствор лимонной кислоты;  Пеногашение: Лапрол ПД-1.</p>	0 часов	0,081	0,28±0,01
		1 час	0,164	0,36±0,02
		2 часа	0,209	0,58±0,02
		3 часа	0,281	1,15±0,06
		4 часа	0,314	2,16±0,14
		5 часов	0,353	3,05±0,06
		6 часов	0,397	3,96±0,10
		7 часов	0,429	4,61±0,08
		8 часов	0,667	7,68±0,06
		9 часов	0,843	13,36±0,86
		10 часов	0,917	11,62±0,68
11 часов	0,953	10,87±0,15		

Таблица 7 – Глубинное культивирование штамма *P. asplenii* 11RW в пилотном ферментере

Инокулят	Условия культивирования	Проба	ОП <sub>600</sub>	Средний титр, млрд КОЕ/мл
16-часовая культура, выращенная в колбе; Объём – 8%	<p><i>Начальные параметры:</i>  Температура – 30°C; pH=7,25;  Аэрация: 1 л воздуха/1 л среды/мин;  Перемешивание: 400 об/мин;  Дальнейшее культивирование – с учетом потребности культуры в кислороде</p>	0 часов	0,049	0,25±0,05
		1 час	0,053	0,33±0,01
		2 часа	0,117	0,34±0,01
		3 часа	0,291	0,85±0,11
		4 часа	0,416	3,31±0,12
		5 часов	0,587	4,38±0,31



(поддержание содержания растворенного кислорода не менее 5-10%); температура и рН – неизменны. Подтитровка: 10% раствор NaOH и 10% раствор лимонной кислоты; Пенегашение: Лапрол ПД-1.	6 часов	0,621	7,10±0,56
	7 часов	0,708	7,31±0,47
	8 часов	0,772	8,40±0,87
	9 часов	0,861	14,20±1,10
	10 часов	0,931	12,38±1,46
	11 часов	0,974	10,73±0,28

По результатам проведенных опытов определили оптимальные условия для периодического культивирования штамма *P. asplenii* 11RW. Как и для всех аэробных культур, для активного роста штамм *P. asplenii* 11RW требователен к достаточному содержанию растворенного кислорода. Для лаг-фазы, длящейся в среднем 2-3 часа, оптимален универсальный режим аэрации 1 л воздуха/1 л питательной среды/мин, дальнейшее культивирование ведется по разработанному каскаду с поддержанием концентрации растворенного кислорода не менее 5-10%.

Во время логарифмического роста (3-9 час) штамм *P. asplenii* 11RW активно защелачивает культуральную среду. Оптимальное значение рН среды составил в среднем 7,25±0,2, поддерживаемое на указанном уровне в течение всего периода культивирования. Более кислые значения оказывают на культуру тормозящее развитие действие.

С 6 по 9 час наблюдается максимальная скорость роста микроорганизма, сопровождаемого наибольшим потреблением кислорода и увеличением рН. К 9-му часу культивирования штамм достигает титра  $10^{10}$  КОЕ/мл и выходит на стационарную фазу развития, после 10-го часа наблюдается снижение количества жизнеспособных клеток. Окончание процесса культивирования сопровождалось снижением потребления кислорода и увеличением его концентрации в среде, повышением рН и значительному помутнению культуральной жидкости.

При добавлении в питательную среду пеногасителя Лапрол ПД-1 в количестве 0,1% активного пенообразования во время культивирования не наблюдается и его дополнительного внесения не требуется.

Таким образом, с использованием лабораторного и пилотного ферментера с контролируемыми параметрами культивирования отработали технологические режимы получения культуральной жидкости перспективного штамма-продуцента. В качестве оптимальной среды выбрали среду на основе мелассы, отличающуюся низкой себестоимостью и доступностью компонентов. Средняя продолжительность культивирования штамма до достижения титра жизнеспособных клеток  $10^{10}$  КОЕ/мл составляет 9 ч.

**Создание стабильной композиции микробиологического препарата.** Провели изучение сроков хранения лабораторных образцов препарата, созданных на основе перспективного штамма *P. asplenii* 11RW, и влияния различных стабилизирующих добавок: карбоксиметилцеллюлозы, ксантановой камеди, гуммиарабика (камедь акации), поливинилпирролидона (PVP K-15), полиэтиленгликоля 6000, сахарозы, глюкозы, глицерина. Для создания различных образцов препаратов использовали культуру *P. asplenii* 11RW с титром  $10^9$  КОЕ/мл, к которой добавляли анализируемые стабилизаторы в различных концентрациях. В качестве антиоксидантного агента добавляли аскорбиновую кислоту в конечной концентрации 0,02%. Полученные композиции закладывали на хранение при 4-6°C, после чего фиксировали изменение титра жизнеспособных клеток в динамике в течение 3-х лет.

Анализ изменения титра жизнеспособных клеток в течение 3-годового хранения при пониженных температурах выявил высокие показатели сохранности жидкой культуры *P. asplenii* 11RW даже в отсутствии стабилизаторов и антиоксиданта. Так, в контрольном образце без внесения добавок на конец 3-го года хранения титр жизнеспособных клеток составил в среднем  $1,1 \cdot 10^8$  КОЕ/мл, т.е. изменение титра относительно исходного уровня произошло только на 1 порядок, что считается значительным результатом для препаратов на основе неспорообразующих бактерий. Существенного влияния аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта выявлено не было.

Показано, что включение в состав полисахаридов (ксантановой камеди в концентрациях 0,1%, 0,25%, 0,5% и гуммиарабика в концентрации 2,5 и 5%) не оказывало значительных стабилизирующих свойств. Вместе с этим данные стабилизаторы в высокой концентрации делали конечный продукт более густым и менее удобным в работе.

Также выявлено, что карбоксиметилцеллюлоза (1%, 2%, 2,5%) и поливинилпирролидон (0,5%, 1,5%, 3%), часто используемые в микробиологических формуляциях, не обладали стабилизирующим действием, наоборот, титр клеток штамма *P. asplenii* 11RW в их присутствии снижался быстрее в сравнении с контролем, а значит, что данные добавки обладали токсическим действием на культуру.

Варианты с включением в состав сахарозы (2%) и глицерина (2%) демонстрировали более стабильное хранение в течение первых 6 месяцев, здесь отмечалось сохранение исходного уровня жизнеспособных клеток, тогда как в контроле к этому времени происходило снижение титра на один порядок; к 3-му году хранения показатели сравнивались с контрольными значениями. Следовательно, данные добавки целесообразны для включения в состав только для непродолжительного срока хранения.

**Фунгицидная активность лабораторных образцов препарата после периода хранения.** Важным показателем качества микробиологического продукта является не только сохранность жизнеспособных клеток продуцента, но и его хозяйственно-ценных свойств. Некоторые образцы препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW проверяли на способность реализовывать антагонистические свойства после продолжительного срока хранения в сравнении со свежеизготовленным образцом. Результаты анализа фунгицидной активности представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Фунгицидная активность некоторых композиций препарата после периода хранения

Вариант	Срок хранения	Средний титр, КОЕ/мл	Средний диаметр зоны подавления роста фитопатогена, мм		
			<i>A. solani</i> 473	<i>A. alternata</i> Д6	<i>F. sporotrichioides</i> 58878
<i>P. asplenii</i> 11RW (без добавок)	0 суток	$10^{10}$	56,3±1,7	49,8±0,3	45,3±0,9
<i>P. asplenii</i> 11RW (без добавок)	3 года	$10^8$	61,3±1,7	47,8±0,3	45,8±0,6
<i>P. asplenii</i> 11RW + 2% глицерин	3 года	$10^8$	54,3±1,1	48,0±1,1	44,0±0,4
<i>P. asplenii</i> 11RW + 3% PVP	3 года	$10^7$	56,3±0,9	49,3±0,3	47,0±0,4

Обнаружили, что все анализируемые образцы независимо от срока хранения и титра жизнеспособных клеток обладали высокой фунгицидной активностью, не уступающей результатам анализа свежеизготовленного образца. Стоит отметить важный факт, что степень ингибирования роста фитопатогенов в варианте с титром  $10^{10}$  КОЕ/мл и  $10^7$  КОЕ/мл была эквивалентной, что является хорошим показателем для перспективного использования препарата в качестве фунгицида для применения в сельском хозяйстве.

Таким образом, с учетом полученных данных, демонстрирующих высокое качество хранения культуры *P. asplenii* 11RW с сохранением антагонистических свойств, сформировали прототип препарата, изготавливаемый по разработанной технологии с учетом наиболее оптимальных для роста параметров и не содержащий в своем составе дополнительных стабилизаторов.

#### 4. Изучение биологической эффективности разработанного опытного препарата

Биологическую эффективность разработанного опытного препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW анализировали в полевых экспериментах против наиболее вредоносных заболеваний плодовых сельскохозяйственных культур. В качестве опытных образцов препарата выступала культуральная жидкость изучаемого штамма, выращенного на питательной среде с мелассой, с титром жизнеспособных клеток не менее  $10^9$  КОЕ/мл, не содержащая стабилизирующих добавок.

**Испытание опытного образца препарата в защите яблони.** Разработанный опытный образец препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытывали в системе защиты яблони от парши *Venturia inaequalis*, мучнистой росы *Podospheora leucotricha* и монилиальной плодовой гнили *Monilia fructigena* в условиях Краснодарского края.

В 2018 г испытание опытного образца проводили на яблоне сорта Ренет Симиренко. На опытном участке парша развивалась по типу тардивной эпифитотии. В контрольном варианте на начало испытаний было поражено треть листового аппарата и половина плодов. Учет на 6-е и 10-е сутки после обработки показал, что после применения экспериментального образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW количество пораженных листьев и интенсивность их поражения не изменились, и опытный образец успешно блокировал инфекцию парши на листьях и плодах, тогда как в контроле в этот период зафиксировали нарастание инфекционного фона: количество пораженных листьев увеличилось в 1,3 раза, количество пораженных плодов – в 1,2 раза (табл. 9).

Таблица 9 – Биологическая эффективность опытного образца на основе штамма *P. asplenii* 11RW против парши яблони сорта Ренет Симиренко, 2018 г

Учет	Показатель, %	Листья		Плоды	
		Опытный образец	Контроль	Опытный образец	Контроль
Через 6 суток	P	0,25	40,0	0,20	57,5
	R	0,05	22,0	0,06	27,0
	БЭ	<b>99,8</b>	-	<b>99,8</b>	-
Через 10 суток	P	0,25	52,5	0,20	62,0
	R	0,05	29,5	0,06	38,0
	БЭ	<b>99,8</b>	-	<b>99,8</b>	-
При съёме урожая	P	0,75	77,0	0,50	27,0
	R	0,20	62,8	0,20	16,4
	БЭ	<b>99,7</b>	-	<b>98,8</b>	-

Условные обозначения: P – распространение болезни, R – интенсивность развития болезни, БЭ – биологическая эффективность.

В 2020 г действие опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытывали против парши, монилиальной плодовой гнили и мучнистой росы. Анализировали 3 нормы расхода препарата (1, 2, 3 л/га) при 4-кратной обработке яблони сорта Голден Делишес. В качестве эталона сравнения использовали микробиологический препарат Ризоплан на основе штамма *P. fluorescens* AP-33.



Выявили, что защитное действие испытываемого образца препарата против парши листьев при нормах применения 2 и 3 л/га была выше эффективности эталона, примененного в норме 5 л/га (табл. 10). Аналогичные данные получили и при анализе эффективности опытного препарата против парши на плодах в кроне деревьев, а также плодах съёмного урожая. Аналогичная тенденция прослеживалась и при анализе эффективности опытного образца против мучнистой росы и монилиальной плодовой гнили, где получили высокие результаты по защите яблони против указанных заболеваний, превосходившие показатели эталона сравнения (табл. 11).

Получили существенную прибавку урожайности при применении опытного образца препарата в нормах 2 и 3 л/га, в варианте с нормой применения 1 л/га урожайность существенно не отличалась от контрольных значений.

По выходу товарной продукции, представленной плодами 1-го и 2-го сорта, получили следующие показатели: 70% и 20% (1 л/га), 80% и 10,0% (2 и 3 л/га), 75% и 15% (эталон сравнения), в контроле – 77,6% и 15,2% соответственно.

Таблица 10 – Эффективность опытного образца на основе штамма *P. asplenii* 11RW против парши яблони сорта Голден Делишес, 2020 г

Вариант	Даты обработок: 24.04; 05.05; 14.05; 24.05														
	<i>Venturia inaequalis</i> (парша)														
	Листья кроне дерева						Плоды в кроне дерева						Съёмный урожай		
	21.05.		13.06.		23.06.		21.05.		04.06.		23.06.		22.09.		
	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	
Опытный образец (1 л/га)	2,2	47,6	9,3	46,2	9,0	52,9	4,2	56,3	5,0	67,7	6,3	56,8	6,0	57,7	
Опытный образец (2 л/га)	1,5	64,3	8,1	53,2	8,0	58,1	3,8	60,4	4,0	74,2	5,8	60,3	5,5	61,3	
Опытный образец (3 л/га)	1,1	73,8	7,9	54,3	7,7	59,7	3,5	63,5	3,8	75,5	5,5	62,3	5,3	62,7	
Эталон (5 л/га)	1,6	61,9	8,3	52,0	8,0	58,1	4,0	58,3	4,0	74,2	5,6	61,6	5,6	60,6	
Контроль	4,2	-	17,3	-	19,1	-	9,6	-	15,5	-	14,6	-	14,2	-	

Условные обозначения: Р – развитие, БЭ – биологическая эффективность

Таблица 11 – Эффективность опытного образца на основе штамма *P. asplenii* 11RW против болезней яблони сорта Голден Делишес, 2020 г

Вариант	Даты обработок: 24.04; 05.05; 14.05; 24.05												
	<i>Podosphaera leucotricha</i> (мучнистая роса)						<i>Monilia fructigena</i> (плодовая гниль)						
	Листья в кроне дерева						Плоды в кроне дерева						Съёмный урожай
	21.05.		04.06.		23.06.		09.08.		03.09.		22.09.		
	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	
Опытный образец (1 л/га)	1,2	73,3	1,4	63,2	2,1	64,4	0,5	66,7	0,5	66,7	0,5	68,8	
Опытный образец (2 л/га)	0,7	84,4	1,1	71,1	2,0	66,1	0,4	73,3	0,4	73,3	0,4	75,0	
Опытный образец (3 л/га)	0,7	84,4	1,1	71,1	2,0	66,1	0,3	80,0	0,3	80,0	0,3	81,3	

Эталон (5 л/га)	0,8	82,2	1,2	68,4	2,0	66,1	0,6	60,0	0,6	60,0	0,6	62,5
Контроль	4,5	-	3,8	-	5,9	-	1,5	-	1,5	-	1,6	-

Условные обозначения: Р – развитие, БЭ – биологическая эффективность

Таким образом, доказали, что опытный образец препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW имеет перспективу применения в качестве фунгицида для обработки вегетирующих растений яблони для защиты от парши, мучнистой росы и плодовой гнили. Период защитного действия опытного образца препарата против парши и мучнистой росы составил до 20 дней; против монилиальной плодовой гнили – до 30 дней.

Показали, что применение препарата с нормой расхода 1 л/га целесообразно для применения при низком инфекционном фоне парши, мучнистой росы и монилиоза. При умеренном или сильном развитии этих заболеваний необходимо применение препарата с нормой расхода 2-3 л/га блоком из двух-четырех последовательных обработок.

**Испытание опытного образца препарата в защите винограда.** Опытный образец препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытывали в системе защиты винограда. Для контроля заболеваний использовали четырехкратное применение с нормой расхода 1-3 л/га. В качестве эталона сравнения использовали микробиологический препарат Ризоплан.

В 2020 г анализировали эффективность опытного образца против серой гнили винограда сорта Каберне Совиньон в условиях республики Крым. При первом учете на 14-е сутки после первой обработки получили 100%-ю эффективность во всех вариантах при слабом развитии болезни в контроле (табл. 12). В дальнейшем также получили равнозначную эффективность во всех вариантах при слабом развитии болезни в контроле. Однако стоит отметить, что высокая биологическая эффективность опытного образца на основе штамма *P. asplenii* 11RW против серой гнили достигалась более низкими нормами расхода в сравнении с эталоном, примененным в норме 4 л/га. Период защитного действия опытного образца препарата против серой гнили составил до 14 дней.

Масса одной грозди в вариантах применения опытного образца превышала контрольные показатели (103,8 г) и составила 109,5 г (1 л/га), 108,2 г (2 л/га), 107,9 г (3 л/га). Урожайность, полученная в вариантах с испытываемым опытным препаратом при 3-х нормах применения, существенно не отличалась от урожайности в контроле. По массовой концентрации сахара варианты с 3-мя нормами опытного препарата были близки: 27,1 г/100 м<sup>3</sup> (1 л/га); 26,0 г/100 м<sup>3</sup> (2 л/га); 26,8 г/100 м<sup>3</sup> (3 л/га); в контроле этот показатель составил 25,9 г/100 м<sup>3</sup>.

Таблица 12 – Эффективность опытного образца на основе штамма *P. asplenii* 11RW против серой гнили винограда сорта Каберне Совиньон, 2020 г

Вариант	Даты обработок: 22.07; 29.07; 07.08; 14.08.								Масса 1-й грозди, г	Урожай с 1- го куста		Содер- жание сахара, г/100 см <sup>3</sup>
	<i>Botrytis cinerea</i> (серая гниль)											
	28.08.		11.09.		25.09.		5.10.					
	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %				
Опытный образец (1 л/га)	0,0	100	0,4	69,2	0,5	68,8	0,9	62,5	109,5	4,5	102,3	27,1
Опытный образец (2 л/га)	0,0	100	0,4	69,2	0,5	68,8	0,9	62,5	108,2	4,5	102,3	26,0
Опытный образец (3 л/га)	0,0	100	0,4	69,2	0,5	68,8	0,9	62,5	107,9	4,6	104,5	26,8

Эталон (4 л/га)	0,0	100	0,4	69,2	0,5	68,8	0,9	62,5	105,1	4,5	102,3	27,4
Контроль	0,4	-	1,3	-	1,6	-	2,4	-	103,8	4,4	100	25,9

Условные обозначения: Р – развитие, БЭ – биологическая эффективность  $НСП_{0,5}=0,3$   
кг/куст

В 2020 г анализировали эффективность опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW против милдью винограда сорта Совиньон блан в условиях Краснодарского края. Показали, что испытываемый опытный образец превышал по эффективности эталон сравнения, при этом высокая защита против ложной мучнистой росы достигалась более низкой нормой применения (табл. 13). Период защитного действия опытного препарата против милдью составил до 10 дней.

Масса одной грозди винограда возрастала по мере увеличения нормы применения опытного препарата и составила 128 г (1 л/га); 132 г (2 л/га); 138 г (3 л/га), при этом в эталоне сравнения этот показатель при норме 4 л/га составил 130 г и в контроле – 121 г. Также получили существенную прибавку урожая при применении испытываемого опытного образца при 3-х нормах применения: 16% (1 л/га); 20% (2 л/га) и 24% (3 л/га), что было выше эталонных показателей (12%) при урожайности в контроле 2,5 кг/куст.

Таблица 13 – Эффективность опытного образца на основе штамма *P. asplenii* 11RW против милдью винограда сорта Совиньон блан, 2020 г

Вариант	Даты обработок: 02.07; 10.07; 20.07; 27.07								Масса 1-й грозди, г	Урожай с 1-го куста	
	<i>Plasmopara viticola</i> (милдью)										
	Листья										
	20.07.		27.07.		04.08.		08.08.				
	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %		кг	% к конт- ролю
Опытный образец (1 л/га)	2,7	51,8	3,6	71,7	7,6	57,5	10,2	49,8	128,0	2,9	116,0
Опытный образец (2 л/га)	1,6	71,4	2,6	79,5	6,8	62,0	9,2	54,7	132,0	3,0	120,0
Опытный образец (3 л/га)	0,8	85,7	2,0	84,3	6,5	63,7	8,7	57,1	138,0	3,1	124,0
Эталон (4 л/га)	2,9	48,2	3,2	74,8	7,7	57,0	11,0	45,8	130,0	2,8	112,0
Контроль	5,6	-	12,7	-	17,9	-	20,3	-	121,0	2,5	100

Условные обозначения: Р – развитие, БЭ – биологическая эффективность  $НСП_{0,5}=0,2$   
кг/куст

В 2020 г также анализировали эффективность опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW против оидиума винограда сорта Рислинг рейнский в условиях Краснодарского края. Результаты выявили высокую эффективность опытного образца против мучнистой росы, превышавшую таковую у эталона сравнения, причем высокая активность опытного образца препарата также достигалась значительно меньшей нормой расхода (табл. 14). Период защитного действия опытного образца против оидиума составил до 15 дней.

Масса одной грозди винограда значительно превышала контрольные и эталонные значения и составила при 3-х нормах применения 139 г (1 л/га), 145 г (2 л/га), 137 г (3 л/га), при этом в эталоне масса грозди составила 112 г и в контроле – 110 г. Также получили существенную прибавку урожая при применении испытываемого опытного образца в 3-х

нормах расхода: 30% (1 л/га), 40% (2 л/га) и 25% (3 л/га), что было выше эталонного показателя (20%) при урожайности в контроле 2,0 кг/куст.

Таблица 14 – Эффективность опытного образца на основе штамма *P. asplenii* 11RW против оидиума винограда сорта Рислинг рейнский, 2020 г

Вариант	Даты обработок: 05.06; 15.06; 25.06; 05.07								Масса 1-й грозди, г	Урожай с 1-го куста	
	<i>Uncinula necator</i> (оидиум)										
	Гроздья										
	25.06.		05.07.		15.07.		19.07.				
	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %	Р, %	БЭ, %		кг	% к контролю
Опытный образец (1 л/га)	0,9	78,6	3,1	80,3	15,7	67,9	26,6	54,5	139,0	2,6	130,0
Опытный образец (2 л/га)	0,0	100	2,7	82,8	11,8	75,9	24,3	58,5	145,0	2,8	140,0
Опытный образец (3 л/га)	0,0	100	3,2	79,6	17,9	63,4	28,9	50,6	137,0	2,5	125,0
Эталон (4 л/га)	1,1	73,8	5,5	65,0	22,3	54,4	34,0	41,9	112,0	2,4	120,0
Контроль	4,2	-	15,7	-	48,9	-	58,5	-	110,0	2,0	100

Условные обозначения: Р – развитие, БЭ – биологическая эффективность

НСР<sub>0,5</sub>=0,3  
кг/куст

Таким образом, в агроклиматических условиях Юго-западной зоны виноградарства Крыма, а также в условиях Краснодарского края при использовании экспериментального образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW в защите винограда от серой гнили, милдью и оидиума получили высокие значения его биологической эффективности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из различных образцов выделили более 350 культивируемых ризосферных, эпифитных и эндофитных бактериальных штаммов, ассоциированных с растениями. Созданную коллекцию систематизировали по проявлению антагонистических свойств и синтезу фитогормона ИУК. Из общего числа отобрали 25 микроорганизмов с наибольшей антимикробной активностью, среди которых наиболее активным явился ризосферный штамм 11RW, способный подавлять развитие 6 тестируемых фитопатогенов, а также продуцировать ИУК. Штамм идентифицировали как *Pseudomonas asplenii* и депонировали во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под регистрационным номером В-13395 по процедуре национального патентного депонирования. После дополнительного изучения антифунгальной активности, выявления ростстимулирующих свойств, подтверждения безопасности по отношению к растениям и теплокровным животным штамм *P. asplenii* 11RW отобрали в качестве перспективного продуцента для дальнейшего исследования.

Изучили культуральные и физиолого-биохимические свойства штамма *P. asplenii* 11RW. Выявили, что штамм обладает выраженным фунгицидным действием и способен в различной степени подавлять 106 из 108 тестируемых фитопатогенных микромицетов. Одним из механизмов антибиоза является активная продукция сидерофоров – низкомолекулярных соединений, активно связывающих железо. Помимо этого, штамм *P. asplenii* 11RW синтезирует летучие соединения, ингибирующие развитие как мицелия

грибов, так и их конидий. Благодаря этим свойствам штамм обладает широким спектром подавления роста фитопатогенных грибов сельскохозяйственных, древесных и декоративных растений.

Показали ростстимулирующую активность штамма *P. asplenii* 11RW, объясняющуюся его способностью синтезировать основной фитогормон типа ауксинов, растворять неорганические фосфаты, продуцировать аммоний и летучие соединения, способствующие росту растений. Благодаря особенностям анализируемого продуцента быстро колонизировать корневую систему штамм способен реализовывать функции биоконтрольного агента против различных возбудителей грибного и бактериального происхождения.

Таким образом, проанализированные свойства (синтез фитогормонов, сидерофоров, летучих метаболитов, аммония, фосфатмобилизация, а также антагонистическое и рострегуляторное действие) являются основными механизмами биологической активности штамма *P. asplenii* 11RW, позволяющими отнести его к группе PGPR.

Подобрали питательную среду и условия культивирования, обеспечивающие высокий выход бактериальной биомассы. Показали возможность длительного хранения жидкой культуры штамма без внесения стабилизирующих добавок в течение 3 лет, по истечению которого культура сохраняет титр на уровне  $10^8$  КОЕ/мл и не теряет антагонистических свойств.

Продемонстрировали высокую биологическую эффективность экспериментального образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW в полевых условиях в защите яблони и винограда, демонстрирующую перспективность нового продукта для применения в сельском хозяйстве.

Конечный результат проведенного исследования заключается в получении стабильного при хранении препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW, обладающего высокой биологической активностью против возбудителей вредоносных заболеваний сельскохозяйственных культур, и государственной регистрации разработанного препарата под торговым названием «Биокомпозит-Про, Ж».

## ВЫВОДЫ

1. Создана коллекция ризосферных, эндофитных и эпифитных бактерий, ассоциированных с растениями, включающая более 350 изолятов. По результатам проведенного скрининга отобрали наиболее активный штамм 11RW, идентифицированный как *Pseudomonas asplenii*;

2. Показано, что штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW способен к продукции сидерофоров, ИУК, аммония, обладает широким спектром действия против фитопатогенных грибов и бактерий, способен к фосфатмобилизации, обладает ростстимулирующим действием, способен активно заселять корневую систему и реализовывать биоконтрольные функции. Штамм не обладает токсическим действием и безопасен для растений и теплокровных животных;

3. Предложен состав питательной среды и условия культивирования штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW с целью получения высокоэффективного антимикробного препарата. Продемонстрирована возможность длительного хранения жидкой культуры штамма без внесения стабилизирующих добавок в течение 3 лет с сохранением антагонистических свойств;

4. Разработанный экспериментальный образец препарата на основе *Pseudomonas asplenii* 11RW показал высокую биологическую эффективность в защите яблони от возбудителей парши, мучнистой росы и монилиальной плодовой гнили и винограда от серой гнили, милдью и оидиума. Выявлено, что при низком инфекционном фоне целесообразно листовое применение препарата с нормой 1 л/га; при умеренном или сильном развитии заболеваний необходимо применение препарата с нормой расхода 2-3 л/га блоком из двух-четырёх последовательных обработок;

5. По результатам проведенного исследования на основе штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW создан микробиологический фунгицид под торговым названием «Биокомполит-Про, Ж», прошедший государственную регистрацию, получивший свидетельство о государственной регистрации пестицида №018-02-3837-1 на срок по 24.10.2032 г. и допущенный к обороту на территории Российской Федерации.

## **РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

1. Созданная коллекция бактерий, ассоциированных с растениями, может быть использована для детального анализа их хозяйственно-полезных свойств, исследования возможности их практического применения и разработки биопрепаратов различного назначения для сельского хозяйства.

2. Разработанный фунгицид Биокомполит-Про, Ж рекомендован к применению для защиты яблони от парши, монилиальной плодовой гнили и мучнистой росы с 4-кратной обработкой в период вегетации и перед сбором урожая с нормой применения препарата 1,0-3,0 л/га и рабочей жидкости 800-1000 л/га (для сельскохозяйственного производства) и с нормой применения препарата 30 мл/10 л воды и рабочей жидкости 10 л/100 м<sup>2</sup> (для личных подсобных хозяйств).

3. Разработанный фунгицид Биокомполит-Про, Ж рекомендован к применению для защиты винограда от милдью, оидиума и серой гнили с 4-кратной обработкой в период вегетации и перед сбором урожая с нормой применения препарата 1,0-3,0 л/га и рабочей жидкости 800-1000 л/га (для сельскохозяйственного производства) и с нормой применения препарата 30 мл/10 л воды и рабочей жидкости 10 л/100 м<sup>2</sup> (для личных подсобных хозяйств).

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в рецензируемых журналах**

1. **Масленникова, С.Н.** Эндوفитные бактерии семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и ели гибридной ((*Picea abies* (L.) Karst × *Picea obovata* Ledeb) / **С.Н. Масленникова, А.И. Шургин, В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, А.В. Канарский // Вестн. Казанск. Технол. Универ. – 2012. – Т. 15, №16. – С. 175-178.**

2. **Масленникова, С.Н.** Ризосферные бактерии сеянцев *Pinus sylvestris* L. и оценка их хозяйственно ценных качеств / **С.Н. Масленникова, А.И. Шургин, В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, А.В. Канарский // Вестн. Казанск. Технол. Универ. – 2012. – Т. 15, №18.– С. 207-211.**

3. **Масленникова, С.Н.** Эндوفитные бактерии хвойных растений: последние исследования и перспективы применения / **С.Н. Масленникова, А.И. Шургин, В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, А.В. Канарский // Вестн. Казанск. Технол. Универ. – 2013. – Т. 16, №23.– С. 139-143.**

4. **Масленникова, С.Н.** Биоразнообразие ризосферных микроорганизмов древесных пород / **С.Н. Масленникова**, А.И. Шургин, В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, А.В. Канарский // **Вестн. Казанск. Технол. Универ.** – 2014. – Т. 17, №4. – С. 193-197.

5. Чеботарь, В.К. Эндофитные бактерии как перспективный биотехнологический ресурс и их разнообразие / В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова, **С.Н. Масленникова**, А.Н. Заплаткин, Н.В. Мальфанова // **Сельскохозяйств. Биол.** – 2015. – Т. 50, №5. – С. 648-654.

6. Chebotar, V.K. Endophytic bacteria of woody plants as the basis of complex microbial preparations for agriculture and forestry / V.K. Chebotar, A.V. Shcherbakov, **S.N. Maslennikova**, A. N. Zaplatkin, A.V. Kanarskiy, A.A. Zavalin // **Russ. Agricult. Sci.** – 2016. – Vol. 42, №5. – P. 339-342.

#### Патенты

1. Пат. 2711873 РФ № 2019120508. Бактериальный штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW для защиты растений от болезней / **С.Н. Масленникова**, С.Д. Каракотов. – Заявл. 02.07.2019; опубл. 23.01.2020, Бюл. №3. – 9 с.

2. Пат. 2752903 РФ № 2021103338. Смесь бактериальных штаммов, обладающая целлюлозолитической и фунгицидной активностью / **С.Н. Масленникова**, С.Д. Каракотов. – Заявл. 11.02.2021; опубл. 11.08.2021, Бюл. № 23. – 11 с.

3. Пат. 2778562 РФ № 2022104539. Смесь бактериальных штаммов, обладающая азотфиксирующей, фосфор- и калиймобилизующей активностью / **С.Н. Масленникова**, А.С. Петровский. – Заявл. 22.02.2022; опубл. 22.08.2022, Бюл. №24. – 10 с.

#### Статьи в других изданиях

1. Чеботарь, В.К. Эндофитные бактерии – основа комплексных микробных препаратов для сельского и лесного хозяйства / В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, **С.Н. Масленникова**, А.Н. Заплаткин, А.В. Канарский, А.А. Завалин // **Агрохимия.** – 2016. – №11. – С. 65-70.

2. **Масленникова, С.Н.** Оценка хозяйственно-ценных свойств ризосферных бактерий чайного растения (*Camelia sinensis* (L.) Kuntze) в условиях субтропической зоны России / **С.Н. Масленникова**, А.В. Щербаков, Е.В. Рогожина // **Субтропическое и декоративное садоводство.** – 2017. – №61. – С. 210-215.

3. **Масленникова, С.Н.** Выделение эпифитных бактерий персика (*Persica* Mill.) в условиях субтропической зоны России и оценка их хозяйственно-ценных свойств / **С.Н. Масленникова**, А.В. Щербаков, Е.В. Рогожина // **Субтропическое и декоративное садоводство.** – 2017. – №63. – С. 195-200.

4. Орынбаев, А.Т. Биологическая эффективность различных препаратов против семенной инфекции сосудистого бактериоза капусты / А.Т. Орынбаев, Ф.С-У. Джалилов, **С.Н. Масленникова** // **Овощи России.** – 2019. – №2 (46). – С. 88-91.

5. **Масленникова, С.Н.** Перспективный штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW в качестве продуцента для создания биофунгицида / **С.Н. Масленникова**, С.Д. Каракотов // **Агрохимический вестник.** – 2021. – №1. – С. 43-47.

6. Каракотов, С.Д. Применение микробиологических препаратов-деструкторов в технологии защиты сахарной свеклы от болезней / С.Д. Каракотов, **С.Н. Масленникова**, Г.А. Селиванова, М.Ю. Гаврилова // **Сахарная свёкла.** – 2021. – №3. – С. 18-21.

## Тезисы

1. **Масленникова, С.Н.** Ростстимулирующая и биоконтрольная активности штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW / **С.Н. Масленникова** // Современные проблемы медицины и естественных наук: сборник статей Международной научной конференции. Вып. 8, Йошкар-Ола, 15-19 апреля 2019 г. Мар. гос. ун-т. – Йошкар-Ола, 2019. – С. 143-145.
2. **Масленникова, С.Н.** Антагонистический потенциал ризосферной бактерии *Pseudomonas asplenii* 11RW против патогенных грибов сельскохозяйственных культур / **С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов** // Материалы VII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». – Актуальная биотехнология. – 2019. – №3 (30). – С. 39.
3. **Масленникова, С.Н.** Биоконтроль фузариозной корневой гнили ризосферными штаммами рода *Pseudomonas* / **С.Н. Масленникова** // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы XI Междунар. науч. конф. (Минск, 3-6 июня 2019 г.) / орг. ком. конф.: Э. И. Коломиец (председатель) и [др.]. – Минск: Беларуская навука, 2019. – С. 172-173.
4. **Масленникова, С.Н.** Бактерии р. *Pseudomonas* в качестве продуцентов для создания биопрепаратов / **С.Н. Масленникова** // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 72-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых (Н.Новгород, 23–26 апреля 2019 г.). Н.Новгород, Университет Лобачевского. – 2019. – С. 149.
5. **Масленникова, С.Н.** Антифунгальная активность ризосферной бактерии *Pseudomonas asplenii* 11RW против фитопатогенных грибов / **С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов** // IV Всероссийский съезд по защите растений с международным участием «Фитосанитарные технологии в обеспечении независимости и конкурентоспособности АПК России». Сборник тезисов докладов. – СПб.: ФГБНУ ВИЗР. – 2019. – С. 118.
6. **Масленникова, С.Н.** *Pseudomonas asplenii* 11RW в качестве биоконтрольного агента для защиты винограда / **С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов** // Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию отдела энтомологии, фитопатологии и защиты растений Никитского ботанического сада «Актуальные проблемы и перспективы интегрированной защиты плодовых, декоративных и лесных культур» / ФГБУН «НБС-ННЦ», г. Ялта, Республика Крым, Россия. 12–16 октября 2020 г. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2020. – С. 112-115.
7. **Масленникова, С.Н.** *Pseudomonas asplenii* 11RW в качестве антагониста заболеваний яблони / **С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов** // Материалы VIII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». – Актуальная биотехнология. – 2020. – №3 (34). – С. 198.