

Научная статья

УДК 633.854.78:632.937

DOI: 10.25230/2412-608X-2023-3-195-63-68

**Элементы технологии
производства микробиопрепаратов
на основе перспективных
бактериальных штаммов
антагонистов возбудителя
сухой гнили подсолнечника**

Любовь Васильевна Маслиенко
Любовь Анатольевна Дейнега
Евгения Алексеевна Ефимцева

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК
Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17
biometod@vniimk.ru

Аннотация. Разработаны элементы технологии производства микробиопрепаратов в препаративной форме смачивающийся порошок при стационарном культивировании перспективных бактериальных штаммов антагонистов возбудителя сухой гнили подсолнечника. Определены оптимальные источники азотного и углеродного питания и сложные питательные среды для выращивания трех перспективных штаммов бактерий из родов *Bacillus* и *Pseudomonas*. Для штамма 5B-1 *Bacillus subtilis* лучшим источником азотного питания установлен кукурузный экстракт, а источниками углеродного питания – глицерин и меласса. Наибольший вес сухой бактериальной биомассы штамма D 1-1 *Bacillus* sp. установлен на питательной среде, где в качестве азотного питания выступал азотнокислый натрий, а в качестве источников углерода – сахароза и меласса. Для обоих штаммов бактерий рода *Bacillus* определены оптимальные сложные питательные среды: Чапека для бактерий и Тайлона-3. Для культивирования штамма 14-4 *Pseudomonas* sp. лучшими источниками азотного питания установлены кукурузный экстракт и азотнокислый натрий, а углеродного – сахароза. Наиболее оптимальными сложными питательными средами для этого штамма определены Кинга В и Чапека для бактерий.

Ключевые слова: бактерии-антагонисты, сухая гниль подсолнечника, микробиопрепараты, стационарное культивирование, источники углеродного и азотного питания, питательные среды

Для цитирования: Маслиенко Л.В., Дейнега Л.А., Ефимцева Е.А. Элементы технологии производства микробиопрепаратов на основе перспективных бактериальных штаммов антагонистов возбудителя сухой гнили подсолнечника // Масличные культуры. 2023. Вып. 3 (195). С. 63–68.

UDC 633.854.78:632.937

Elements of the production technology of microbiopreparations based on promising bacterial antagonist strains of dry rot pathogen on sunflower

Maslienko L.V., head of the lab., chief researcher, doctor of biology

Deynega L.A., junior researcher

Efimtseva E.A., junior researcher

V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops

17 Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia

biometod@vniimk.ru

Abstract. The elements of production technologies of microbiopreparations in a preparative form wetting powder at a stationary surface cultivation of promising bacterial antagonist strains of a dry rot pathogen on sunflower. The optimal sources of nitrogen and carbon-based and compound nutrient media for cultivation of three promising bacterial strains from the genera *Bacillus* and *Pseudomonas*. An excellent source of nitrogen for a strain 5B-1 *Bacillus subtilis* is corn steep liquor, and of carbon – glycerin and molasses. The highest weight of dry bacterial biomass of a strain D 1-1 *Bacillus* sp. was on a nutrient medium where sodium nitrogen was used as a nitrogen source and sucrose and molasses – as a carbon-based source. For both bacterial strains of a genus *Bacillus* the optimal were such compound nutrient media as Chapek's for bacteria and Tylon-3. For cultivation of a strain 14-4 *Pseudomonas* sp. the best nitrogen sources were corn steep liquor and sodium nitrogen, and carbon-based – sucrose. The most optimal compound nutrient medium for these strains were King B and Chapek's for bacteria.

Key words: bacteria-antagonists, dry rot on sunflower, microbiopreparations, stationary cultivation, sources of carbon and nitrogen nutrition, nutrient mediums

Введение. В регионах с теплым климатом наблюдается тенденция увеличения распространения и вредоносности сухой гнили подсолнечника, возбудителем которой являются грибы рода *Rhizopus* Eh-

генб. [1]. Болезнь распространена во многих странах возделывания подсолнечника. При благоприятных условиях потери урожая от сухой гнили могут достигать 40 %, что наносит значительный экономический урон сельхозтоваропроизводителям [2; 3; 4; 5; 6].

В современной экологической ситуации назрела крайняя необходимость биологизации сельскохозяйственного производства. Поэтому разработка биотехнологий получения и применения современных конкурентоспособных микробных препаратов для сельского хозяйства, позволяющих снизить отрицательные последствия применения химических пестицидов, становится первоочередной задачей социально-экономического развития государств. В нашей стране нет зарегистрированных биологических препаратов для защиты подсолнечника от сухой гнили.

В лаборатории биометода агротехнологического отдела ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК с 2021 г. ведутся исследования по разработке микробиологического метода снижения вредоносности сухой гнили подсолнечника. Так, в результате ступенчатого скрининга коллекционных бактериальных штаммов антагонистов к агрессивному изоляту возбудителя сухой гнили подсолнечника *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl. было выделено три штамма, обладающих антифунгальной активностью *in vitro*, а также защитным и колонизирующим эффектом на фоне искусственного заражения патогеном. Отобранные штаммы не проявляли фитотоксичности к культуре, а, напротив, обладали ростостимулирующей активностью [7; 8; 9].

Данные исследования посвящены разработке элементов технологии производства микробиопрепаратов на основе выделенных трех перспективных бактериальных антагонистов из родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, включающих подбор оптимальных источников азотного и углеродного питания, а также сложных жидких питательных сред при стационарном культивировании штаммов.

Материалы и методы. Объектами исследований служили два штамма бактерий из рода *Bacillus* – D 1-1 *Bacillus* sp. и 5Б-1 *Bacillus subtilis*, и один из рода *Pseudomonas* – 14-4 *Pseudomonas* sp., источники азотного и углеродного питания, а также сложные питательные среды.

Определение оптимальных элементов питания для выращивания перспективных штаммов-продуцентов микробиопрепаратов проводили на жидкой питательной среде Чапека для бактерий [10], которая являлась эталоном. Источниками азотного питания служили пептон, азотнокислый натрий, дрожжевой и кукурузный экстракты, с неизменным источником углеродного питания – сахароза (эталон). Источниками углеродного питания служили глюкоза, сахароза, глицерин и меласса, при этом неизменным компонентом азотного питания был азотнокислый натрий (эталон). Стационарное выращивание антагонистов осуществляли при температуре 25 °С в течение 10 суток в колбах Эрленмейера (250,0 мл) с объемом питательной среды 100,0 мл, при этом в каждую колбу высевали одинаковый агаровый блок со штаммом антагонистом.

Определение оптимальных сложных жидких питательных сред проводили при стационарном культивировании бактериальных штаммов. Испытывали среды: Тайлона-3 – для бактерий из рода *Bacillus*, Кинга В – для бактерии из рода *Pseudomonas*, а также Чапека для бактерий, мясо-пептонный бульон (МПБ) и пептон-дрожжевую среду [11; 12; 13].

По окончании культивирования штаммов определяли вес сухой биомассы путем осаждения и высушивания выращенной бактериальной пленки при температуре 105 °С до постоянного веса. Повторность в каждом опыте трехкратная.

Результаты и обсуждение. В процессе выполнения исследований нами была разработана шкала для учета роста бактериальных штаммов при стационарном

культивировании на жидких питательных средах (рис. 1), где:

0 баллов – отсутствие роста или только обрастание посевного блока;

1 балл – рост бактерии поверхностный отдельными колониями или только по краю в колбе, может присутствовать и слабый глубинный рост;

2 балла – тонкая сплошная поверхностная бактериальная пленка или только глубинный рост бактерии;

3 балла – плотная складчатая поверхностная бактериальная пленка.



0 баллов

1 балл



2 балла

3 балла

Рисунок 1 – Шкала оценки роста бактериальных штаммов на жидких питательных средах при стационарном культивировании, 2023 г. (ориг.)

Для бактериального штамма 5Б-1 *Bacillus subtilis* в качестве наиболее благоприятного источника азотного питания выступил кукурузный экстракт, где образовалась тонкая сплошная поверхностная пленка (2 балла) и вес сухой биомассы составил 0,43 г/100 мл среды, что существенно по отношению к эталону. При

выращивании на питательной среде с добавлением дрожжевого экстракта и азотнокислого натрия наблюдали менее обильный поверхностный рост бактерии (1 балл), но присутствовал слабый глубинный. Вес бактериальной биомассы в этих вариантах был примерно одинаковым – 0,32–0,33 г/100 мл среды. Неблагоприятным источником азотного питания для бациллярного штамма оказался пептон, при добавлении которого на поверхности среды формировались лишь отдельные колонии бактерии (1 балл) и вес сухой биомассы составил всего 0,27 г/100 мл среды (рис. 2).

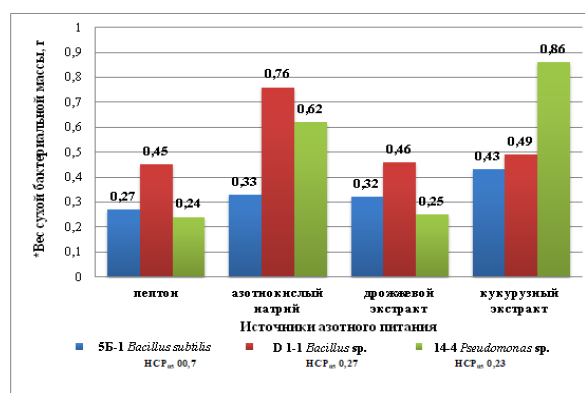


Рисунок 2 – Влияние различных источников азотного питания на рост бактериальных штаммов на питательной среде Чапека для бактерий, через 10 суток стационарного культивирования, 2023 г. (ориг.)

* вес сухой бактериальной биомассы в расчете на 100 мл питательной среды

Для штамма D 1-1 *Bacillus* sp. максимальный вес бактериальной биомассы установлен на питательной среде, где в качестве азотного питания выступал азотнокислый натрий (эталон) – 0,76 г/100 мл среды, при этом в данном варианте выявлен глубинный рост бактерии (2 балла). При добавлении пептона, дрожжевого и кукурузного экстрактов наблюдался слабый глубинный рост (1 балл), поэтому вес сухой биомассы был значительно ниже эталона и варьировал от 0,45 до 0,49 г/100 мл среды.

Лучшими источниками азотного питания для культивирования штамма

14-4 *Pseudomonas* sp. оказались кукурузный экстракт и азотнокислый натрий, при добавлении которых формировалась тонкая сплошная пленка (2 балла), а вес сухой биомассы составил 0,86 г и 0,62 г/100 мл среды соответственно. Тогда как при добавлении пептона и дрожжевого экстракта рост штамма псевдомонады был слабым (1 балл), а вес снижался в 2,5–3,6 раза и составил 0,24–0,25 г/100 мл среды.

Лучшими источниками углеродного питания для бактериального штамма 5Б-1 *Bacillus subtilis* установлены глицерин и меласса. При добавлении глицерина в среде сформировались отдельные поверхностные колонии и слабый глубинный рост (1 балл), а вес сухой биомассы составил 0,46 г/100 мл среды, что существенно по отношению к эталону. При добавлении мелассы выросла сплошная тонкая поверхностная пленка (2 балла) при весе сухой бактериальной биомассы 0,40 г/100 мл среды. Неблагоприятными источниками углерода установлены глюкоза и сахароза, при добавлении которых рост колоний был слабым (1 балл) и установлен минимальный вес сухой бактериальной биомассы – 0,26–0,33 г/100 мл среды соответственно (рис. 3).

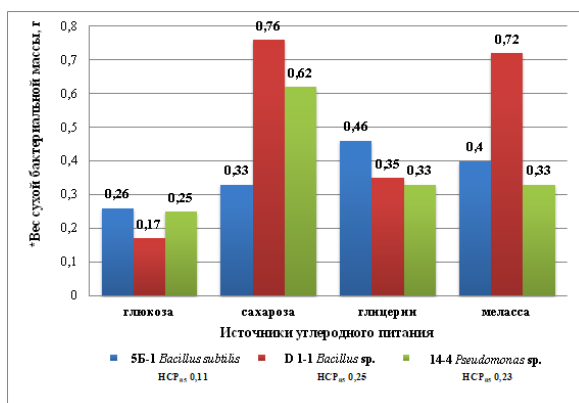


Рисунок 3 – Влияние различных источников углеродного питания на рост бактериальных штаммов на питательной среде Чапека для бактерий, через 10 суток стационарного культивирования, 2023 г. (ориг.)

* вес сухой бактериальной биомассы в расчете на 100 мл питательной среды

При стационарном культивировании штамма D 1-1 *Bacillus* sp. было выявлено два лучших элемента в качестве источника углерода – сахароза (эталон) и меласса, между которыми не было существенных различий. Следует отметить, что в среде с мелассой сформировалась плотная сплошная бактериальная поверхностная пленка (3 балла), а с сахарозой – отдельные колонии глубинного роста (2 балла), но при этом вес сухой биомассы отличался незначительно – 0,76 и 0,72 г/100 мл среды соответственно. Глюкоза и глицерин оказались неблагоприятными для выращивания данного штамма, так как при их добавлении отмечался слабый рост колоний (1 балл), а вес снижался в 2,1–4,5 раза и составил 0,17–0,35 г/100 мл среды соответственно.

Для бактерии 14-4 *Pseudomonas* sp. оптимальным источником углерода установлена сахароза (эталон), при добавлении которой к среде наблюдалось формирование отдельных поверхностных колоний и глубинного роста (2 балла), и при этом установлен максимальный вес сухой биомассы (0,62 г/100 мл среды). Тогда как добавление глюкозы, глицерина и мелассы тормозило рост штамма (1 балл), а вес сухой бактериальной биомассы снижался в 2 раза, составив 0,25–0,33 г/100 мл среды, что существенно по отношению к эталону.

С целью определения оптимальных питательных сред для культивирования штаммов бактерий изучали пять сложных сред (Тайлона-3, Кинга В, пептон-дрожжевую, Чапека для бактерий и мясо-пептонный бульон (МПБ)).

Для штаммов 5Б-1 *Bacillus subtilis* и D 1-1 *Bacillus* sp. максимальный вес сухой бактериальной биомассы (0,33 и 0,76 г/100 мл среды соответственно) получен на синтетической универсальной среде Чапека для бактерий (эталон), при этом в колбах отмечен глубинный рост отдельными колониями (2 балла). На среде Тайлона-3 эти штаммы сформировали плотную поверхностную пленку (3 бал-

ла), однако вес сухой бактериальной биомассы снижался в 1,3–1,5 раз (0,25 и 0,48 г/100 мл среды соответственно), что существенно по отношению к эталону.

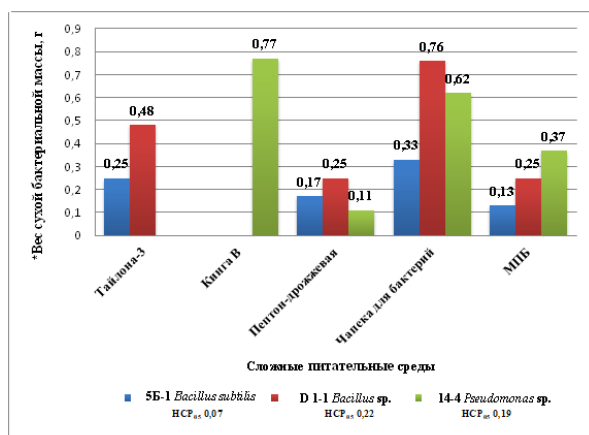


Рисунок 4 – Влияние сложных питательных сред на рост бактериальных штаммов, через 10 суток культивирования, 2023 г. (ориг.)

* вес сухой бактериальной массы в расчете на 100 мл питательной среды

Для бактерии 14-4 *Pseudomonas sp.* максимальный рост поверхностной пленки (3 балла) и вес сухой биомассы выявлен на среде Кинга В – 0,77 г/100 мл среды, что не существенно по отношению к эталону, так как на среде Чапека для бактерий при глубинном росте этот показатель был достаточно высокий – 0,62 г/100 мл среды. Показатели роста и веса на двух других средах (МПБ и пептон-дрожжевая) были существенно ниже эталона.

Заключение. Определены оптимальные условия выращивания перспективных бактериальных штаммов-продуцентов для разработки элементов технологии производства микробиопрепаратов в препаративной форме смачивающийся порошок. Для штамма 5B-1 *Bacillus subtilis* установлен наиболее благоприятный источник азотного питания – кукурузный экстракт, с наибольшим весом сухой биомассы – 0,43 г/100 мл среды. Лучшими источниками углеродного питания вы-

ступили глицерин, при добавлении которого в среде наблюдался слабый глубинный рост при весе сухой биомассы 0,46 г/100 мл среды, и меласса с формированием тонкой сплошной поверхностной пленки – 0,40 г/100 мл среды. Наиболее благоприятной сложной питательной средой оказалась Чапека для бактерий с весом сухой биомассы 0,33 г/100 мл среды и Тайлона-3 – 0,25 г/100 мл среды.

Наибольший вес сухой бактериальной массы для штамма D 1-1 *Bacillus sp.* установлен на питательной среде, где в качестве азотного питания выступал азотнокислый натрий при весе сухой бактериальной массы 0,76 г/100 мл среды, а в качестве источников углерода – сахароза и меласса (0,76 и 0,72 г/100 мл среды соответственно). Оптимальной средой, на которой штамм рос в глубине среды отдельными колониями, определена Чапека для бактерий при весе сухой бактериальной биомассы 0,76 г/100 мл среды, а максимальная поверхностная пленка установлена на среде Тайлона-3 (0,48 г/100 мл среды).

Лучшими источниками азотного питания для культивирования штамма 14-4 *Pseudomonas sp.* являются кукурузный экстракт и азотнокислый натрий, при добавлении которых вес сухой биомассы составил 0,86 и 0,62 г/100 мл среды соответственно. Максимальный вес сухой биомассы (0,62 г/100 мл среды) выявлен при использовании сахарозы в качестве единственного источника углерода в питательной среде. Наиболее оптимальными сложными питательными средами установлены Кинга В с весом сухой биомассы 0,77 г/100 мл среды и Чапека для бактерий (0,62 г/100 мл среды).

Список литературы

1. Бородин С.Г., Котлярова И.А., Соснина Ю.М. Грибы рода *Rhizopus* Ehrenb. на подсолнечнике // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2007. – Вып. 2 (137). – С. 55–57.
2. Шинкарев В.П., Масленникова Т.И. Распространение болезней подсолнечника и борьба с ними за рубежом: обзорная информация. – М., 1990. – С. 38–39.

3. Rogers C.E., Thompson T.E., Zimmer D.E. *Rhizopus* head rot of sunflower; etiology and severity in the southern plains // *Plant Dis.* – 1978. – Vol. 62. – No 9. – P. 769 – 771.

4. Yang S.M. [et al.]. *Rhizopus* headrot of cultivated sunflower in Texas // *Plant Diss. Rep.* – 1979. – Vol. 63. – No 10. – P. 833–835.

5. Ačimovič M. Occurrence of sunflower diseases in Bulgaria, Romania, Hungary and Yugoslaviji // *Helia.* – 1980. – No 3. – P. 33–36.

6. Acimovic M. Prouzrokovaci bolesti suncokreta i njihovo suzbijanje. – Nolit-Beograd, 1983. – P. 104.

7. Lyubov Maslienکو, Lyubov Datsenko and Evgeniya Efimtseva. Primary screening of fungal antagonist strains from the collection of V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops against the sunflower dry rot pathogen *Rhizopus oryzae* // *AIP Conference Proceedings.* – 2023. – 2777. – 020013. DOI: 10.1063/5.0140254.

8. Lyubov Maslienکو, Lyubov Datsenko and Evgeniya Efimtseva. Primary screening of bacterial antagonist strains to the sunflower dry rot pathogen *Rhizopus oryzae* // *AIP Conference Proceedings.* – 2023. – 2817. – 020059. DOI: 10.1063/5.0148452.

9. Дейнега Л.А., Маслиенко Л.В., Ефимцева Е.А. Способность перспективных штаммов антагонистов возбудителя сухой гнили *Rhizopus oryzae* колонизировать растущий корень подсолнечника на фоне искусственного заражения проростков в лабораторных условиях // В сб.: Защита растений от вредных организмов: материалы XI междунар. науч.-практ. конференции. – Краснодар: КубГАУ. – 2023. – С. 117–119.

10. Скворцова, И.Н. Идентификация почвенных бактерий рода *Bacillus*. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. – 26 с.

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

12. King, E.O., Ward M.K., and D.E. Raney. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin // *J. Lab. Clin. Med.* – 1954. – Vol. 44 (2). – P. 301–307.

13. Тихонович И.А., Оследкин Ю.С. Каталог культур микроорганизмов. – СПб.-Пушкин, 2005. – 88 с.

References

1. Borodin S.G., Kotlyarova I.A., Sosnina Yu.M. Griby roda *Rhizopus* Ehrenb. na podsolnechnike // *Maslichnye kultury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK.* – 2007. – Вып. 2 (137). – S. 55–57.

2. Shinkarev V.P., Maslennikova T.I. Rasprostranenie bolezney podsolnechnika i bor'ba s nimi za rubezhom: obzornaya informatsiya. – М., 1990. – S. 38–39.

3. Rogers C.E., Thompson T.E., Zimmer D.E. *Rhizopus* head rot of sunflower; etiology and severity in the southern plains // *Plant Dis.* – 1978. – Vol. 62. – No 9. – P. 769 – 771.

4. Yang S.M. [et al.]. *Rhizopus* head rot of cultivated sunflower in Texas // *Plant Diss. Rep.* – 1979. – Vol. 63. – No 10. – P. 833–835.

5. Ačimovič M. Occurrence of sunflower diseases in Bulgaria, Romania, Hungary and Yugoslaviji // *Helia.* – 1980. – No 3. – P. 33–36.

6. Acimovic M. Prouzrokovaci bolesti suncokreta i njihovo suzbijanje. – Nolit-Beograd, 1983. – P. 104.

7. Lyubov Maslienکو, Lyubov Datsenko and Evgeniya Efimtseva. Primary screening of fungal antagonist strains from the collection of V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops against the sunflower dry rot pathogen *Rhizopus oryzae* // *AIP Conference Proceedings.* – 2023. – 2777. – 020013. DOI: 10.1063/5.0140254.

8. Lyubov Maslienکو, Lyubov Datsenko and Evgeniya Efimtseva. Primary screening of bacterial antagonist strains to the sunflower dry rot pathogen *Rhizopus oryzae* // *AIP Conference Proceedings.* – 2023. – 2817. – 020059. DOI: 10.1063/5.0148452.

9. Deynega L.A., Maslienکو L.V., Efimtseva E.A. Spособnost' perspektivnykh shtammov antagonistov vzbuditelya sukhoy gnili *Rhizopus oryzae* kolonizirovat' rastushchiy koren' podsolnechnika na fone iskusstvennogo zarazheniya prorostkov v laboratornykh usloviyakh // V sb.: Zashchita rasteniy ot vrednykh organizmov: materialy XI mezhdunar. nauch.-prakt. konferentsii. – Krasnodar: KubGAU. – 2023. – S. 117–119.

10. Skvortsova, I.N. Identifikatsiya pochvennykh bakteriy roda *Bacillus*. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. – 26 с.

11. Egorov N.S. Vydelenie mikrobov-antagonistov i biologicheskie metody ucheta ikh antibioticheskoy aktivnosti. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1957. – 78 с.

12. King, E.O., Ward M.K., and D.E. Raney. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin // *J. Lab. Clin. Med.* – 1954. – Vol. 44 (2). – P. 301–307.

13. Tikhonovich I.A., Osledkin Yu.S. Katalog kul'tur mikroorganizmov. – SPb.-Pushkin, 2005. – 88 с.

Сведения об авторах

Л.В. Маслиенко, зав. лаб., гл. науч. сотр., д-р биол. наук

Л.А. Дейнега, мл. науч. сотр.

Е.А. Ефимцева, мл. науч. сотр.

Получено/Received

12.09.2023

Получено после рецензии/Manuscript peer-reviewed

15.09.2023

Получено после доработки/Manuscript revised

18.09.2023

Принято/Accepted

21.09.2023

Manuscript on-line

30.11.2023