

УДК 632.937: 579.64:663.15

UDC 632.937:579.64:663.15

03.00.00 Биологические науки

Biological sciences

**ВЛИЯНИЕ ДАВЛЕНИЯ ПРИ
ОПРЫСКИВАНИИ РАСТЕНИЙ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМИ
ПРЕПАРАТАМИ НА СОХРАНЕНИЕ
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ
МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ ЧИСЛЕННОСТЬ**

**THE EFFECT OF PRESSURE SPRAYING
PLANTS WITH MICROBIOLOGICAL
PREPARATIONS TO MAINTAIN THE
VIABILITY OF MICROORGANISMS AND
THEIR AMOUNT**

Котляров Владимир Владиславович
д. с-х. н., профессор
РИНЦ SPIN-код=5905-0474
*Кубанский государственный аграрный универси-
тет, Краснодар, Россия*

Kotlyarov Vladimir Vladislavovich
Dr.Sci.Agr., professor
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Сединина Наталья Викторовна
старший научный сотрудник-микробиолог
РИНЦ SPIN-код=4792-1196
*НИИ Биотехнологии и сертификации пищевой про-
дукции, Кубанский государственный аграрный уни-
верситет, Краснодар, Россия*

Sedinina Natalya Viktorovna
Main research worker-microbiologist
*SRI Biotechnology and food manufacturing
certification of Kuban State Agrarian University,
Krasnodar, Russia*

Донченко Дмитрий Юрьевич
к. б. н., старший научный сотрудник
РИНЦ SPIN-код=4352-6610
*Кубанский государственный аграрный универси-
тет, Краснодар, Россия*

Donchenko Dmitriy Yrievich
Cand.Biol.Sci., Main research worker
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Котляров Денис Владимирович
к. б. н., докторант кафедры физиологии и биохимии
растений
РИНЦ SPIN-код=2928-5639
*Кубанский государственный аграрный универси-
тет, Краснодар, Россия*

Kotlyarov Denis Vladimirovich
Cand.Biol.Sci.
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Вопросы микробиологической защиты растений становятся более актуальными. Применение микро-организмов позволяет решить следующие задачи: биологизация сельского хозяйства и оздоровление почв. Однако применение различных физических факторов воздействия на микроорганизмы, приводит к снижению числа жизнеспособных микроорга-низмов или их гибели, что сказывается на эффек-тивности их использования. В статье приведены примеры применения давления в биотехнологиче-ском процессе производства микробиологических препаратов, а также в процессе их использования при опрыскивании. Приведены конкретные приме-ры влияния давления на неспорообразующие бакте-рии - *Azotobacter chroococcum*, спорообразующие бактерии - *Bacillus megatherium* и грибы - *Tricho-derma viride*. Эти микроорганизмы используются в баковой смеси для защиты растений от болезней и насекомых-вредителей, разработанной ООО МИП «Кубанские агротехнологии» при ФГБОУ ВПО КубГАУ. Целесообразным является одновремен-ное применение обработок растений баковой сме-сью микроорганизмов вместе с гербицидом. Уста-

Questions of microbial plant protection become more relevant. The use of microorganisms can solve the fol- lowing problems: biologization of agriculture and sani- tation of soil. Application of various physical factors affecting the microorganisms reduces their number. This influences the efficiency of their use. This article gives examples of the application of pressure in the biotechnological process of microbial preparations and their use in the process of spraying. The effect of pres- sure on nonspore bacteria - *Azotobacter chroococcum*, spore-forming bacteria - *Bacillus megatherium* and fun- gi - *Trichoderma viride* has been presented in this arti- cle. These microorganisms are used in the tank medium for protecting plants against diseases and pests devel- oped by Ltd. "Kuban agrotehnology" of Kuban State Agrarian University. Efficiency is the simultaneous application of tank medium of microorganisms with herbicide. It was found that the application of the tank medium of microorganisms for spraying is necessary to limit the pressure of 4.5 atm. The use of higher spraying modes effects on reducing the number of viable bacte- ria. This fact has not been checked against fungi

новлено, что при применении баковой смеси микроорганизмов для опрыскивания необходимо ограничиться давлением 4,5 атм. Применение более высоких режимов опрыскивания сказывается на снижении числа жизнеспособных бактерий. В отношении грибов данный факт установлении не был

Ключевые слова: ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ, МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ, ПОЧВА, ИССЛЕДОВАНИЕ, БАКОВОЕ СРЕДСТВО, ГРИБ, БАКТЕРИЯ

Keywords: PLANT PROTECTION, MICROBIOLOGICAL PREPARATION, SOIL, RESEARCH INVESTIGATION, TANK MEDIUM, FUNGI, BACTERIUM

Использование микроорганизмов в защите растений от болезней и насекомых вредителей – один из способов биологизации сельского хозяйства, формирования супрессивности почв. Тот факт, что любые физические методы воздействия на живую микробную клетку могут иметь как положительное, так и отрицательное значение остаётся неизменным. Физиологические особенности клеток, средства и способы их защиты самих себя весьма разнообразны. Однако, физические факторы воздействия в виде температуры, давления, света, радиоактивных веществ при превышении определенных значений могут приводить к необратимым изменениям в клетках микроорганизмов. Давно известно, что бактерии малочувствительны к высокому давлению. Они переносят гидростатическое давление до 900 атм и живут на дне рек и морей. Известны барофильные микроорганизмы которые могут размножаться только при высоком давлении. Баротолерантные растут и размножаются при атмосферном давлении, но переносят и высокое давление. Барочувствительные не размножаются и не растут при высоком давлении. Возможность выдерживать определенное осмотическое давление определяется чувствительностью микроорганизмов (осмофилов, галлофилов, умеренных галлофилов) к концентрации солей, питательных веществ, сахара. Данные свойства используются в питании микроорганизмов, которое осуществляется за счет активной и пассивной диффузии при поступлении питательных веществ в микробные клетки при нахождении их в питательной среде определенного состава [3].

Свойство физической инактивации микроорганизмов за счет создания давления используются в процессах стерилизации. Так, например, процессы автоклавирования (стерилизации) питательных сред чаще всего протекают при давлении от 0,5 до 1,2 kgf/cm^2 , а процессы уничтожения микроорганизмов при 2,2 kgf/cm^2 . Этим значениям всегда соответствует определенная температура, достигаемая в автоклаве, и существуют временные режимы экспозиции при этих величинах давления соответственно.

В сельскохозяйственной биотехнологии и защите растений давление используется на следующих этапах и стадиях:

- автоклавирование питательной среды;
- аэрация процесса в случае культивирования аэробных микроорганизмов;
- фильтрация культуральных жидкостей;
- опрыскивание посевов.

Наибольший интерес для биотехнологов и агрономов представляет процесс опрыскивания. Современная техника, применяемая для опрыскивания, представлена машинами и установками роторного и форсуночного типа. При совмещении в баковой смеси микробиологических препаратов и химических, например гербицидов, необходимо обеспечить соблюдение давления в пределах 3,5-5 атм с тем, чтобы достичь равномерное распределение компонентов баковой смеси на гектар. Кроме того от применяемого давления зависит экономия или перерасход средств защиты растений.

Известно, что дрожжи сохраняют свою жизнеспособность при давлении 500 атм. Грибы и бактерии выдерживают давление до 3000 атм [3]. Однако, эти данные очень обширны и не дают конкретной оценки по влиянию давления при опрыскивании о сохранении жизнеспособности определенных микроорганизмов на выходе из отверстий форсунок опрыскателя. Получение данных о количественных изменениях микроорганизмов в результате воздействия давления стало **целью** нашего исследования.

Материал и методики исследования:

В качестве **объектов** исследования нами были выбраны три культуры микроорганизмов: 1 грибная форма и 2 бактериальные - спорообразующая и неспорообразующая. Выбор нижеперечисленных культур обусловлен тем, они используются для защиты растений в баковой смеси в препарате, разработанном на базе ООО МИП «Кубанские агротехнологии» Кубанского госагроуниверситета [1, 2].

В качестве представителя грибной микрофлоры использовали *Trichoderma viride* (рис. 1). Этот гриб улучшает структуру почвы, формирует её супрессивную микрофлору. Являясь антагонистом, в процессе развития выделяет в окружающую среду антибиотики виридин, триходермин, способные подавлять развитие почвенных фитопатогенов - *Fusarium*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Phythium*, *Botrytis*, *Phoma* [5]. Так же *T. viride* препятствует развитию возбудителей ржавчины, мучнистой росы. В отношении питательных субстратов, представленных целлюлозосодержащими остатками, *T. viride* быстро осваивает их, выделяя фермент целлюлазу, разлагающую высокомолекулярные полисахариды. Гриб способен активно размножаться. Конидиеносцы гриба септированные, разветвленные, образуют концентрические кольца и обычно находятся на боковых ветвях (рис. 2). *T. viride* формирует споры.



Рисунок 1. *Trichoderma viride* трёхсуточный рост на среде Чапека
(фото Н. В. Седининой, 2014)

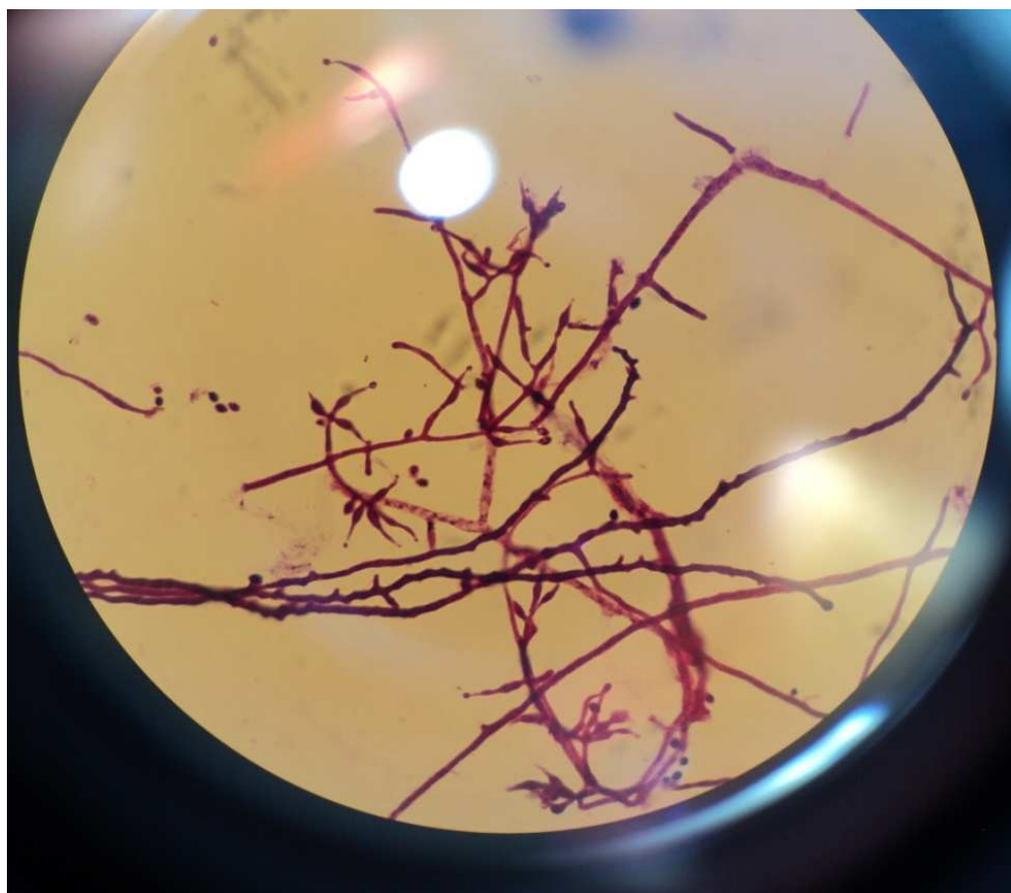


Рисунок 2. *Trichoderma viride* 1000^x (фото Н.В. Седининой., 2013)

Температурный оптимум развития гриба находится в интервале 22-30°C. рН оптимум составляет 5,0-6,8 [5].

В работе была использована трехсуточная культура, выращенная на среде Чапека.

В качестве представителя бактериальной неспоровой микрофлоры в исследовании применяли *Azotobacter chroococcum* - микроорганизмы, фиксирующие атмосферный азот и применяемые в защите растений в качестве антагониста возбудителей болезней [4, 6, 7]. Грамотрицательные короткие палочки, при культивировании их на азотсодержащих средах, способные к плеоморфизму (рис. 3). Колонии слизистые, при старении приобретают бурую окраску (рис. 4). В работе использовали суточную культуру *A. chroococcum*, выращенную на среде Эшби.

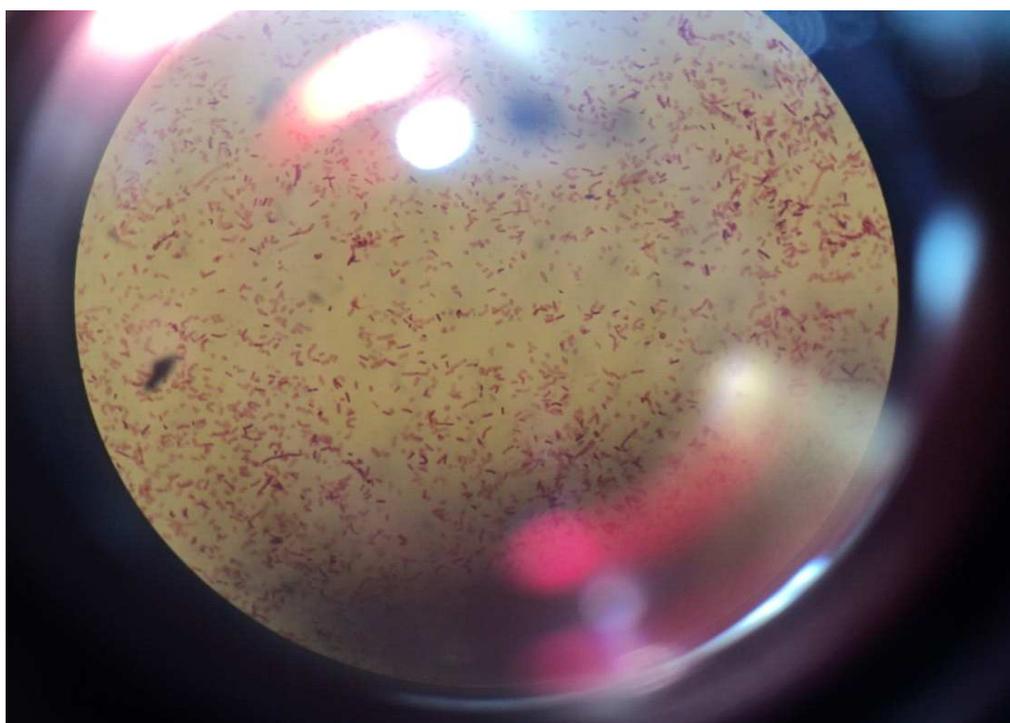


Рисунок 3. Микроскопия *Azotobacter chroococcum* 1000^x
(фото Н.В. Седининой, 2013)

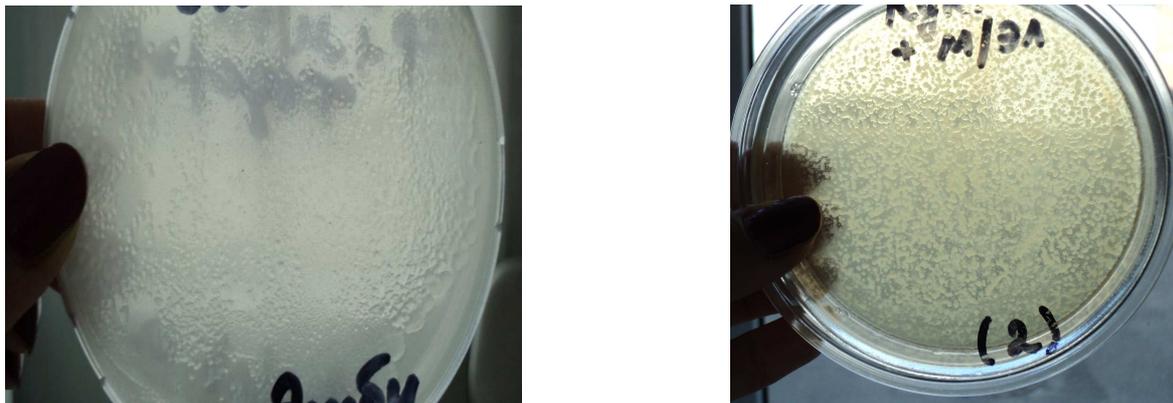


Рисунок 4. *Azotobacter chroococcum*; рост на среде Эшби (слева) и ГРМ-агаре (справа) (фото Н.В. Седининой, 2013, 2014)

В качестве представителя бактериальной спорообразующей микрофлоры была использована фосформобилизирующая бактерия - *Bacillus megatherium*. Эти бактерии при выделении фосфатазы, отщепляют фосфорную кислоту, переводят трудноусвояемые фосфаты в форму, доступную для питания растений. *B. megatherium* продуцент биологически активных веществ – витамина В₁₂, тиамин, пиридоксина, никотиновой и пантотеновой кислот [4, 6, 7]. Отличительной особенностью *B. megatherium* является то, что, клетки 14-20 суточной культуры приобретают дрожжеподобную, выпуклую, фасолеобразную форму [8] (рис. 5). В работе использовали суточную культуру, выращенную на среде ГРМ-агар .

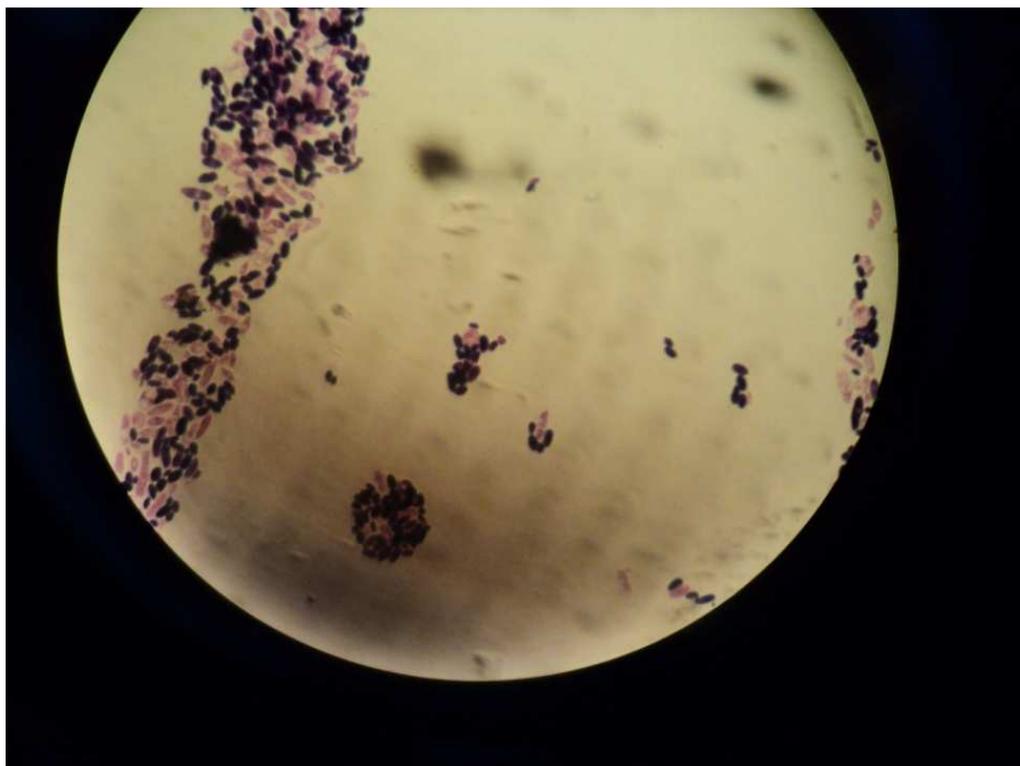


Рисунок 5. *Bacillus megatherium* микроскопия 20-суточная культура 1000^x
(фото Н.В. Седининой, 2013)

Из перечисленных культур, выращенных на средах, установленных нормативной документацией, были приготовлены смывы с косяков, а затем из них получены микробные взвеси по стандартам мутности на 5 и 10 ЕМ с соответствующей нагрузкой микроорганизмов, приняв, что 10 ЕМ соответствует $n \times 10^9$ КОЕ/мл. После чего, каждую приготовленную взвесь культур микроорганизмов в количестве 1 мл перенесли в 100 мл стерильного физиологического раствора (0,85% NaCl), разлитого в стерильные пластмассовые ёмкости. Эти образцы культур микроорганизмов – считаются контрольными. Из них были сделаны микробиологические посева для установления числа КОЕ (колониеобразующих) единиц в 1мл взвеси. Пластмассовые ёмкости закрывались завинчивающимися крышками, на которых имелся герметично закрепленный штуцер для присоединения шланга компрессора. Для создания давления внутри этих ёмкостей приме-

няли безмасляный компрессор OF 302-4B. Интервал давления, применяемого к культурам в ёмкостях, выбран от 2 до 5 атм. Шаг -1 атм. После достижения в ёмкостях давления в пределах выбранного интервала, культуры выдерживались при каждом режиме давления в течение 10 минут с тем, чтобы это максимально соответствовало времени пребывания микроорганизмов в опрыскивателе. Затем стерильной пипеткой из ёмкостей отбирали по 1 мл взвеси в 3-х повторностях и переносили в 9 мл стерильного физиологического раствора. Из приготовленного исходного разведения готовили ряд последующих разведений для посевов, так, чтобы в дальнейшем можно было подсчитать среднее число выросших КОЕ/мл каждой культуры. Применялся глубинный посев. *T. viride* выращивали на агаризованной среде Чапека при температуре $22 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 5 суток. *A. chroococcum* и *B. megatherium* выращивали на среде ГРМ-агар при температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 3 суток.

Результаты исследования (контроль и образец, к которому применялось максимальное давление) представлены на рисунках 6-11 и объединены в таблице 1.

Результаты исследования:



Рисунок 6. Рост *T. viride* на среде Чапека контрольный вариант без применения

давления (фото Н. В. Сединой, 2014)

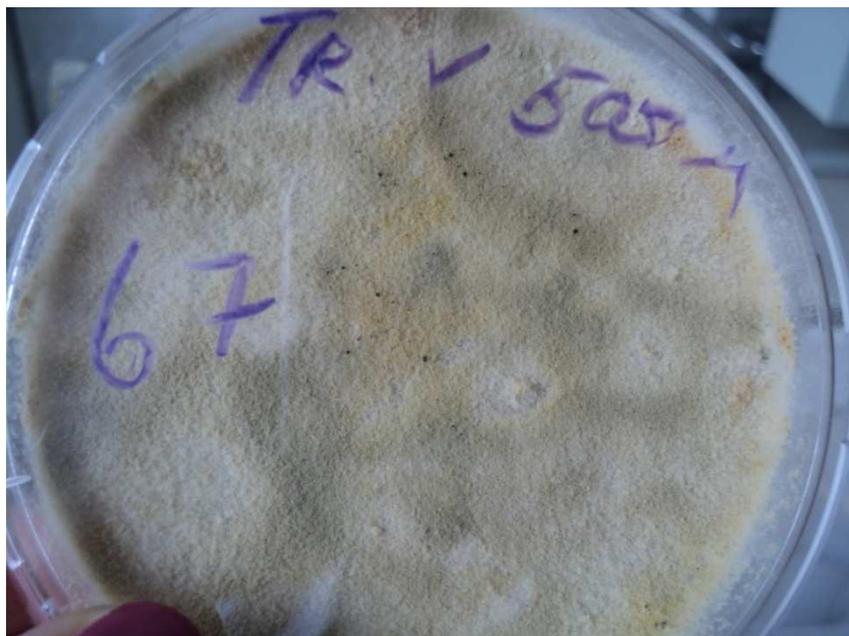


Рисунок 7. Рост *T. viride* на среде Чапека вариант с применением давления 5 атм (фото Н. В. Сединой, 2014)

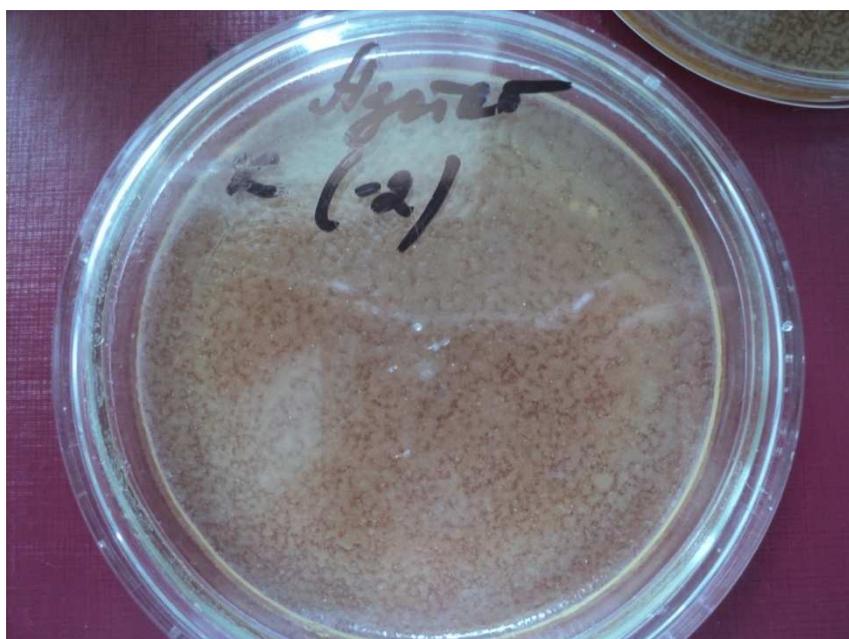


Рисунок 8. Рост *A. chroococcum* на среде ГРМ-агар контрольный вариант без применения давления (фото Н. В. Сединой, 2014)

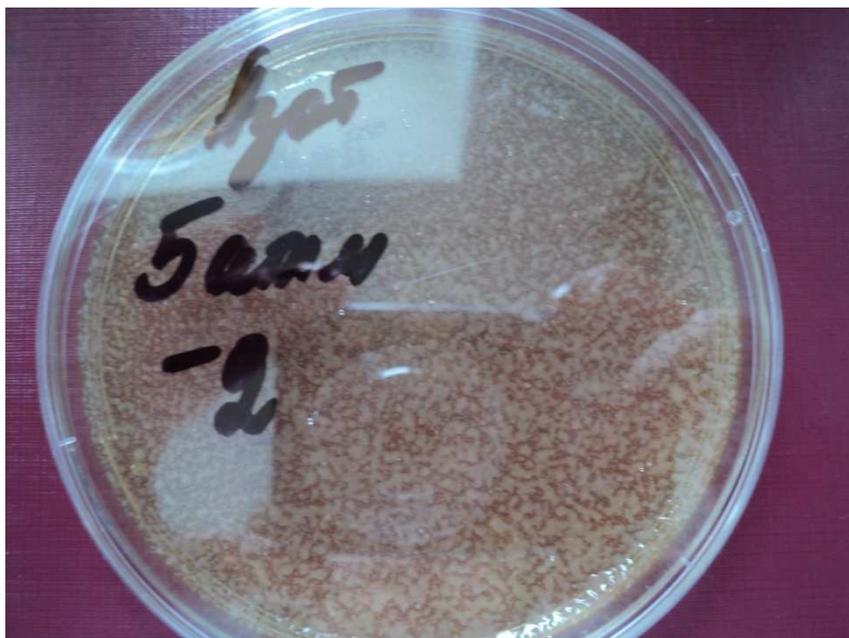


Рисунок 9. Рост *A. chroococcum* на среде ГРМ-агар вариант с применением давления 5 атм (фото Н. В. Сединой, 2014)



Рисунок 10. Рост *B. megatherium* на среде ГРМ-агар контрольный вариант без применения давления (фото Н. В. Сединой, 2014)



Рисунок 11. Рост *B. megatherium* на среде ГРМ-агар вариант с применением давления 5 атм (фото Н. В. Сединой, 2014)

Таблица 1- Количество микроорганизмов, КОЕ/мл до и после применения давления

Название культуры микроорганизмов	Вариант исследования				
	Контроль	2 атм	3 атм	4 атм	5 атм
<i>T. viride</i> , КОЕ/мл	$1,8 \times 10^4$	2×10^4	$3,2 \times 10^4$	$4,2 \times 10^4$	$6,7 \times 10^4$
<i>A. chroococcum</i> , КОЕ/мл	9×10^5	6×10^5	$5,5 \times 10^5$	5×10^5	$1,9 \times 10^5$
<i>B. megatherium</i> , КОЕ/мл	2×10^6	1×10^6	$2,2 \times 10^5$	1×10^5	5×10^4

Обсуждение и выводы:

Как показывают результаты исследования, представленные в таблице 1, в варианте с *T. viride* с увеличением применяемого к культуре микроорганизмов давления от 2 до 5 атм, происходит увеличение числа их КОЕ/мл. Мы это связываем с тем, что *T. viride* является грибом, имеющим многоклеточный септированный мицелий. При воздействии на *T. viride* давления происходит разрыв в местах соединения мицелия, что и даёт новые точки роста будущих колоний гриба.

В образцах бактериальных культур *A. chroococcum* и *B. megatherium* при увеличении давления в пределах выбранного интервала от 2 до 5 атм происходит снижение числа КОЕ/мл, и в сравнении с контролем, и с 9×10^5

до $1,9 \times 10^5$ КОЕ/мл для *A. chroococcum*, и с 2×10^6 до 5×10^4 КОЕ/мл для *B. megatherium*. Задержки роста или отставания его по времени в сравнении с контролем ни в одном из образцов отмечено не было.

Полученные в ходе исследования результаты, позволяют рекомендовать режим применения давления для опрыскивания посевов с целью защиты растений – не более $4 \pm 0,5$ атм. Данные исследования применены в процессе опрыскивания растений в хозяйствах, применяющих инновационную схему защиты растений, разработанную ООО МИП «Кубанские агротехнологии» при Кубанском госагроуниверситете. Кроме того представленные результаты исследования могут быть интересны биотехнологам, агрономам, применяющим микробиологические средства защиты растений.

Литература:

1. Котляров В.В., Сединина Н. В. Инновационная концепция микробиологической защиты растений // Материалы 3-го Всероссийского съезда по защите растений. Санкт-Петербург. 2013. С. 354-356.
2. Котляров В.В., Сединина Н. В., Котляров Д. В., Донченко Д. Ю. Экологизация и биологизация сельского хозяйства на примере технологии производства и применения бакового средства для защиты растений от болезней и насекомых-вредителей // Материалы 2-ой международной научно-практической конференции «Наука в современном информационном обществе» Москва. 2013. С. 142-144.
3. Микробиология: Учебник для агротехнологов / О. Д. Сидоренко, Е. Г. Борисенко, А. А. Ванькова, Л. И. Войно. – М., 2005. – 287 с.
4. Мосичев, С.М. Общая технология микробиологических производств / С. М. Мосичев, А. А. Складнев, В. Б. Котов М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. – 264с.
5. Биологическая защита растений / М. В. Штерншис, Ф. С. –У. Джалилов, И.В. Андреева, О.Г. Томилова; Под ред. М.В. Штерншис. – М.: КолосС, 2004. – 264с.
6. Применение физиологически активных веществ в агротехнологиях /В.В. Котляров, Ю.П. Федулов, К. А. Доценко, Д.В. Котляров, Е.К. Яблонская. – Краснодар: КубГАУ, 2013 – 169с.
7. Котляров В.В. Физиология иммунитета растений: Учебное пособие. /В.В. Котляров – Краснодар, 2006.- 102 с.
8. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева.- М.: Дрофа, 2004.- 256 с.
9. <http://www.floralworld.ru/regulators/yantarnaya.shtml>

References:

1. Kotljarov V.V., Sedinina N. V. Innovacionnaja koncepcija mikrobiologicheskoj zashhity rastenij // Materialy 3-go Vserossijskogo sezda po zashhite rastenij. Sankt-Peterburg. 2013. S. 354-352. (In Russian)
2. Kotljarov V.V., Sedinina N. V., Kotljarov D. V., Donchenko D. Ju. Jekologizacija i biologizacija sel'skogo hozjajstva na primere tehnologii proizvodstva i primenija bakovogo sredstva dlja zashhity rastenij ot boleznej i nasekomyh-vreditelej // Materialy 2-oj mezhdu-narodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii «Nauka v sovremennom informacionnom obshhestve» Moskva. 2013. S. 142-144.
3. Mikrobiologija: Uchebnik dlja agrotehnologov / O. D. Sidorenko, E. G. Borisenko, A. A. Van'kova, L. I. Vojno. – M., 2005. – 287 s. (In Russian)
4. Mosichev, S.M. Obshhaja tehnologija mikrobiologicheskikh proizvodstv / S. M. Mosichev, A. A. Skladnev, V. B. Kotov M.: Legkaja i pishhevaja prom-st', 1982. – 264s. (In Russian)
5. Biologicheskaja zashhita rastenij / M. V. Shternshis, F. S. –U. Dzhililov, I.V. Andreeva, O.G. Tomilova; Pod red. M.V. Shternshis. – M.: KolosS, 2004. – 264s. (In Russian)
6. Primenenie fiziologicheski aktivnyh veshhestv v agrotehnologijah / (In Russian) V.V. Kotlyarov, Ju.P. Fedulov, K. A. Docenko, D.V. Kotlyarov, E.K. Jablonskaja. – Krasnodar: KubGAU, 2013 – 169s. (In Russian)
7. Kotlyarov V.V. Fiziologija immuniteta rastenij: Uchebnoe posobie./ V.V. Kotljarov – Krasnodar, 2006.- 102 s. (In Russian)
8. Tepper, E. Z. Praktikum po mikrobiologii: Uchebnoe posobie dlja vuzov / E. Z. Tepper, V. K. Shil'nikova, G. I. Pereverzeva.- M.: Drofa, 2004.- 256 s.
9. <http://www.floralworld.ru/regulatoryors/yantarnaya.shtml>