



ПОЛИТЕХ
Санкт-Петербургский
политехнический университет
Петра Великого

На правах рукописи

Косульников Юрий Витальевич

**Технология получения и методы применения
биопрепаратов на основе клубеньковых
бактерий**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук**

Санкт-Петербург
2022

Работа выполнена в лаборатории экологии симбиотических и ассоциативных ризобактерий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСХМ)

Научный руководитель:

Лактионов Юрий Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологии симбиотических и ассоциативных ризобактерий ФГБНУ ВНИИСХМ

Официальные оппоненты:

Кипрушкина Елена Ивановна, доцент, доктор технических наук, доцент факультета биотехнологий ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО»

Шамцян Марк Маркович, доцент, кандидат технических наук, заведующий кафедрой технологии микробиологического синтеза ФГБОУ ВО СПбГТИ (ТУ)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений" (ФГБНУ ВИЗР)

Защита состоится **«31» мая 2022 г. в 14.00** на заседании диссертационного совета **У.03.01.06** федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (195251, г. Санкт-Петербург, ул. Новороссийская, 48, аудитория 201).

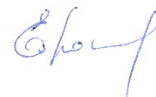
С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого по адресу: 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29 и на сайте ФГАОУ ВО «СПбПУ» www.spbstu.ru

Автореферат разослан «___» апреля 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета **У.03.01.06**

доцент, к. т. н.



Аронова Е.Б.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По решению Правительственной комиссии по высоким технологиям и инновациям от 1 апреля 2011 г. была разработана Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации №1853п-П8, утвержденная Председателем Правительства РФ. Данная Программа призвана заложить системные основы развития биотехнологии и биоэкономики в России, а также обеспечить базу для индустриального развития технологий микробного синтеза, нацеленных, в том числе, на выпуск биопрепаратов для сельского хозяйства. К данному направлению относится широкий спектр продуктов на основе различных микроорганизмов: биоконсерванты растительного сырья (силосные закваски), пищевые добавки для скота и птицы (пробиотики), биологические средства защиты растений (биопестициды), биоудобрения на основе микроорганизмов, вступающих в мутуалистические взаимоотношения с растениями (Коломиец Э.И. Микробные биотехнологии как основа экологизации и повышения продуктивности сельскохозяйственного производства // Микробные биотехнологии: сб. науч. тр. Минск, 2018. Т. 10. С. 3–11).

Для формирования эффективных растительно-микробных ассоциаций в сельскохозяйственной практике используют биопрепараты на основе ассоциативной и симбиотической микрофлоры. К последней относятся клубеньковые бактерии (ризобии), способные вступать в тесные мутуалистические взаимодействия с бобовыми растениями с образованием азотфиксирующего бобово-ризобияльного симбиоза. Симбиотическая азотфиксация обеспечивает весь агроценоз легкоусваиваемыми формами азота, что повышает его продуктивность и позволяет отказаться от применения дорогостоящих и экологически небезопасных минеральных азотных удобрений при возделывании бобовых агрокультур.

В отечественном сельском хозяйстве прием предпосевной инокуляции семян имеет ограниченное распространение. Связано это с тем, что эффективность инокулянтов значительно снижается при переходе с опытного на производственный уровень, который подразумевает промышленную технологию культивирования ризобий, длительное хранение инокулянтов в складских условиях, практику смешения препаратов ризобий с пестицидами и длительную выдержку обработанных семян перед посевом (рис. 1).

Несмотря на большое количество работ, посвященных генетическим аспектам конструирования эффективных бобово-ризобияльных симбиозов (И.А. Тихонович, Н.А. Проворов, М.Л. Румянцева, А.Х. Баймиев и др.) и популяционной экологии клубеньковых бактерий (А.П. Кожемяков, С.А. Четкова и др.), до сих пор не решена проблема низкой интегрированности приема предпосевной инокуляции семян с современными агротехнологиями, что не позволяет раскрыть потенциал продуктивности бобово-ризобияльного симбиоза в производственных условиях.



Рисунок 1. Общая технологическая схема получения и применения инокулянтов на основе клубеньковых бактерий

Степень разработанности темы исследования

Проблема низкой эффективности препаратов ризобий в условиях сельскохозяйственного производства является комплексной, так как образование эффективных клубеньков на корнях бобовой агрокультуры является результатом действия целой совокупности факторов. Помимо высокой симбиотической совместимости партнеров и благоприятных почвенно-климатических условий образования симбиоза, “успех” инокуляции обусловлен такими параметрами как: титр ризобий на момент применения препарата (т.е. использования инокулянта для приготовления рабочего раствора), состав и концентрация химических протравителей в составе рабочего раствора, устойчивость ризобий к химическому стрессу и время прямого контакта бактерий с пестицидами, устойчивость ризобий к высушиванию на обработанных семенах, эффективность протектора, обеспечивающего защиту бактерий от осмотического стресса и время, прошедшее с момента обработки семян до их заделки в почву.

Каждый из вышеприведенных аспектов изучался различными коллективами исследователей, однако степень разработанности данных факторов существенно варьирует.

Так, проблеме низкого титра бактерий на момент применения биопрепарата посвящено множество исследований, в том числе работы по совершенствованию рецептур питательных сред, обеспечивающих повышенный титр ризобий в жидкой культуре (Sayeda M. Ali, Gamil Amin, Mohammed Fayez, Mahmoud El-Tahan, Mohammed Monib & Nabil A. Hegazi Production of rhizobia biofertilizers using baker's yeast effluent and their application to *Leucaena leucocephala*, Archives of Agronomy and Soil Science, 2005, 51:6, 605-617) и изучены факторы, влияющие на сохранность ризобий в процессе хранения препаратов (Лактионов Ю.В., Попова Т.А., Андреева О.А., Ибаттулина Р.П., Кожемяков А.П. Создание стабильной формы ростостимулирующих микробиологических препаратов и их эффективность // В сб.: Современные подходы в биотехнологии Республики Татарстан. – Казань, 2013. – 34-38 с).

Кроме того, рядом исследователей выявлена возможность модификации жидких культур ризобий различными композициями полимеров, повышающих устойчивость бактерий к различным стресс-факторам, что позволяет увеличить срок хранения инокулянта и, в конечном итоге, обеспечить наибольшее количество жизнеспособных клеток на момент применения препарата (Das, K., Prasanna, R., and Saxena, A. K. Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia Microbiol.* 2017. 62, 425–435).

В связи с продолжающимся трендом на интенсификацию сельского хозяйства большое число исследований посвящено изучению степени токсичности различных марок ХСЗР для ризобий (Борзенкова Г.А. Применение эффективных протравителей и инокулянтов в технологии возделывания различных сортов сои // Земледелие. – 2014. - №4. – 37-39 с.)

При этом, недостаточно изученным остается вопрос о том, какие именно компоненты пестицида определяют его токсичность для бактерий, а также каким образом возможно повысить устойчивость клубеньковых бактерий к токсическому стрессу при контакте бактерий с пестицидами в рабочем растворе.

Относительно малоизученным является вопрос о степени устойчивости того или иного штамма ризобий к осмотическому стрессу, которому подвергаются бактерии при их высыхании на обработанных семенах (Vriezen, J. A. C., F. J. de Bruijn, and K. Nußlein. Desiccation responses and survival of *Sinorhizobium meliloti* USDA 1021 in relation to growth-phase, temperature, chloride and sulfate availability. // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2006. - №42. – 172–178 p).

Данный пробел, очевидно, требует восполнения, так как подавляющее большинство современных агротехнологий возделывания бобовых подразумевает применение инокулянтов с помощью предпосевной обработки семян с их последующей выдержкой (по экономическим и технологическим причинам) в течение нескольких суток перед посевом. В течение данного времени титр ризобий на семени может как незначительно упасть (при условии высокой осмотической устойчивости штамма и эффективности протектора), так и сократиться до нуля ввиду чувствительности бактерий к высыханию и низкой эффективности или полном отсутствии протектора в составе рабочего раствора.

Стоит отметить, что данные по эффективности различных веществ в качестве протектора ризобий, защищающих бактерии от высыхания на обработанных семенах носят отрывочный и, зачастую, противоречивый характер (Титова Л.В., Бровка И.С., Леонова Н.О., Воцелко С.К., Иутинская Г.А., Патыка В.Ф. Роль липкогенных компонентов в повышении физиологической активности ризобий и продуктивности соево-ризобияльного симбиоза // *Мікробіол., журн.* – 2012. – № 4 (6), – С. 9–16.).

Цель и задачи исследования

Цель работы заключалась в совершенствовании технологии получения и применения препаратов клубеньковых бактерий, с последующей оценкой ее эффективности в производственных условиях.

В соответствии с целью были определены следующие задачи:

1. сравнить производительность периодического и полунепрерывного (отъемно-доливного) режимов культивирования медленнорастущих видов клубеньковых бактерий;

2. определить степень стабильности препаратов ризобий в процессе полугодового хранения жидких инокулянтов в герметичных пластиковых канистрах и в двойных поливинилхлоридных пакетах, поддерживающих газообмен с окружающей средой;

3. выработать рекомендации по эффективному совмещению в один технологический прием метода обработки семян инокулянтами быстро- и медленнорастущих видов клубеньковых бактерий и метода обработки семян широко применяемыми химическими фунгицидами;

4. оценить перспективность введения в состав биопрепаратов водорастворимых полимеров, полисахаридов или сахаридов, применение которых должно позволить увеличить допустимый временной интервал между обработкой семян и их посевом.

Научно-практическая новизна исследования

1. Впервые для производства препаратов медленнорастущих видов ризобий использован полунепрерывный режим культивирования в ферментерах с рабочим объемом 500 л. Показано, что полунепрерывный режим культивирования является более производительным в сравнении с периодическим режимом;

2. Впервые в качестве упаковочного материала для хранения препаратов ризобий сои и люпина использован пакет из двойной поливинилхлоридной пленки, что способствует сохранению высокого титра клеток клубеньковых бактерий в процессе полугодового хранения жидких биопрепаратов;

3. Впервые проведено сравнение эффективности водорастворимых полимеров, полисахаридов и сахаридов в качестве протектора нанесенных на семена клубеньковых бактерий. Благодаря добавлению данных веществ к раствору инокулянта, на обрабатываемых им семенах образуется защитная пленка, снижающая скорость сокращения числа жизнеспособных ризобий, что позволяет осуществлять эффективную заблаговременную инокуляцию семян;

4. Впервые определено, что температура бакового раствора, содержащего химический фунгицид и клубеньковые бактерии, значительно влияет на жизнеспособность последних. Показано, что протравители на основе одного и того же действующего вещества (флудиоксонил), но произведенным по различным технологиям («Максим» и «Протект») могут различаться по токсическому воздействию, оказываемому на клетки быстро- и медленнорастущих видов ризобий.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Показана высокая производительность полунепрерывного режима культивирования при производстве препаратов ризобий медленнорастущих видов *B. japonicum* *шт.* 634б и *B. lupini* *шт.* 363а. Оценена стабильность биопрепаратов в процессе их полугодового хранения в упаковках из различных материалов в складских условиях. Оценена токсичность широко применяемых пестицидных протравителей семян для клубеньковых бактерий инокулянтов. Показано, что быстрорастущие виды ризобий более чувствительны к токсическому действию фунгицидов, чем медленнорастущие. Тем не менее, для быстрорастущих видов ризобий могут быть подобраны условия, повышающие их устойчивость к химическим пестицидам. Определена эффективность применения ряда водорастворимых полимеров, полисахаридов и сахаридов в качестве добавок, защищающих бактерии от высыхания на обработанных семенах.

Объекты исследования

Объектами исследования служили штаммы медленнорастущих ризобий сои (*B. japonicum* *шт.* 634б, 640, ВР-648, ВР-733) и люпина (*B. lupini* *шт.* 363а, 367а), и штаммы быстрорастущих ризобий гороха (*R. leguminosarum* *b. viciae* *шт.* 260б) и чечевицы (*R. leguminosarum* *bv. viciae* *шт.* 712) из коллекции ФГБНУ ВНИИСХМ.

В качестве химических пестицидных протравителей семян исследовали смачивающиеся порошки Беномил, Бенорад Фундазол и концентраты суспензий Максим, Протект, Протект Форте, Синклер, Оплот, Тирада.

В качестве водорастворимых полимеров изучали поливинилпирролидон и поливиниловый спирт, в качестве водорастворимых полисахаридов и сахаридов изучали альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлозу и трегалозу.

Методология и методы исследования

Культуры изучаемых видов клубеньковых бактерий получали посредством их выращивания в ферментерах на полусинтетической питательной среде на основе маннита, дрожжевого экстракта и солей (таб. 1).

Культивирование бактерий в ферментере проводили при 28°C, при интенсивности аэрации (1 л воздуха/1 л среды в мин.) и при оборотах мешалки 180-200 об./мин. После 7 суток культивирования часть бактериальной суспензии разливали в асептических условиях по 250 мл в стерильные колбы, которые закрывали ватными пробками и помещали в холодильник на хранение.

Таблица 1. Состав питательной среды для получения инокулюма (Yadav J. et al., 2011)

Компонент среды	Концентрация компонента (г/л)
маннит	10,0
дрожжевой экстракт	1,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCO ₃	следы

Для построения кривых роста штаммов медленно растущих видов ризобий при различных режимах культивирования осуществляли периодический отбор проб бактериальной культуры из ферментера. Далее готовили серии 10-кратных разведений культуры с последующим высевом на чашки Петри с агаризованной питательной средой (таб. 1), которые затем помещали в термостат (t=28°C). Спустя 3-5 суток для быстрорастущих видов ризобий и 7-10 суток для медленно растущих видов подсчитывали число колониеобразующих единиц (КОЕ) и определяли титр бактерий в изначально отобранных пробах. Повторность опыта – трехкратная.

Оценку влияния условий хранения на стабильность биопрепаратов проводили по результатам анализа титра жизнеспособных клеток клубеньковых бактерий сои и люпина в процессе полугодового хранения жидких инокулянтов на их основе в складских условиях. Приготовленную, согласно ранее описанной технологии, бактериальную культуру разливали по упаковочным тарам в предварительно обработанном УФ боксе. Наполненные полиэтиленовые канистры объемом 3 л и 5 л складировали по 6 шт. в пенопластовые короба.

Наполненные двойные поливинилхлоридные пакеты объемом 3 л помещали по системе bag-in-box в картонные коробки, которые затем по 9 шт. складировали в пенопластовые короба. Короба закрывали пенопластовыми крышками и помещали на склад, где они хранились при температуре 15-17°C в течение всех 6 мес. проведения эксперимента. Жизнеспособность клубеньковых бактерии оценивали путем периодического, с интервалом в 2 мес., определения титра бактериальных клеток в канистрах и пакетах. Повторность опыта – трехкратная.

Для изучения токсического воздействия пестицидов на клубеньковые бактерии готовили баковый раствор (многокомпонентный раствор, используемый для обработки семян сразу несколькими препаратами), который содержал бактериальную культуру и химический протравитель. Через определенные интервалы времени (1, 2, 4, 8, 24 часа) делали посеvy вариантов баковых растворов различных инокулянтов с фунгицидами на чашки Петри с агаризованной питательной средой для последующего определения титра жизнеспособных бактерий.

Обработку семян разными вариантами баковых растворов осуществляли следующим образом:

1. готовили навески семян в чашке Петри по 25 г;
2. семена обрабатывали бактериальной суспензией объемом 50 мкл, разбавленной в водопроводной воде (контрольный вариант), или в баковом растворе, включавшем протравитель или протектор (опытные варианты).

Определение числа клеток жизнеспособных бактерий на обработанных семенах проводили по авторской методике следующим образом:

1. 8 инокулированных семян, через определенные интервалы времени после обработки, помещали в пробирку с 8 мл стерильной воды, далее пробирку встряхивали в течение 1 мин на вортексе для приготовления смыва с семян. Повторность – трёхкратная;
2. проводили посев серии разведений отобранных смывов с семян на чашки Петри с агаризованной питательной средой (таб. 1). Повторность – трехкратная;
3. осуществляли подсчет числа образовавшихся бактериальных колоний с использованием полученных данных для определения числа жизнеспособных клеток ризобий на 1 семени.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel 10 методом дисперсионного анализа.

Основные положения, выносимые на защиту диссертационной работы:

1. полунепрерывный режим культивирования по сравнению с периодическим является более производительным способом получения бактериальных препаратов на основе ризобий медленнорастущих видов;
2. двухслойная поливинилхлоридная пленка перспективна в качестве материала упаковочной тары для хранения жидких инокулянтов в складских условиях, поскольку обеспечивает сохранность более высоких титров жизнеспособных клеток ризобий медленнорастущих видов;
3. пестицидные протравители на основе одного и того же действующего вещества, но произведенные по разной технологии (разные производители),

значительно различаются по своей токсичности в отношении ризобий медленнорастущих и быстрорастущих видов;

4. введение водорастворимых полимеров, полисахаридов или сахаридов в баковый раствор с инокулянтом способствует сохранению высоких значений титра жизнеспособных ризобий на обработанных семенах, что позволяет увеличить допустимый временной интервал между обработкой и посевом семян.

Достоверность полученных результатов обеспечивается за счет:

- поэтапного описания полученных результатов и методов исследования
- использования дисперсионного анализа для обработки результатов
- публикации полученных результатов в виде научных статей в журналах, в том числе, рекомендованных ВАК
- апробации полученных результатов в форме докладов на различных международных и отечественных научно-практических конференциях.

Апробация результатов исследования

Основные результаты научно-квалификационной работы докладывались и обсуждались на международной научно-практической конференции «Роль молодых ученых в решении актуальных задач АПК» (г. Санкт-Петербург, 2016 и 2018 г.), на международной выставке «ЮгАгро» (г. Краснодар, 2018, 2019, 2021 гг.), на международной выставке «Биоиндустрия» (г. Санкт-Петербург, 2017, 2018, 2019, 2021 гг.), на VI международном бизнес-форуме «Мировая Соя» 2021.

Публикации

Всего опубликовано 13 работ, в том числе 2 патента, 1 статья в изданиях, включенных в перечень ВАК и 2 статьи в отечественных изданиях, которые входят в международную реферативную базу Scopus.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, и списка литературы, включающего 130 наименований, среди которых 54 отечественных и 76 иностранных авторов. Работа изложена на 114 страницах машинописного текста, включает 8 таблиц и 28 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, сформированы цель и задачи исследования, представлены основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе «Обзор литературы» рассмотрена роль биопрепаратов в современных технологиях возделывания бобовых культур, описаны современные формы инокулянтов, технологии культивирования клубеньковых бактерий, режимы хранения и методы применения препаратов ризобий. Рассмотрены стресс-факторы, которым могут подвергаться клубеньковых бактерий в процессе хранения и применения инокулянтов.

Во второй главе “Материалы и методы исследований” описаны исследуемые штаммы клубеньковых бактерий и приведен состав используемой питательной среды; приведены характеристики ферментеров и параметры режимов культивирования, рассмотрены используемые химические протравители семян, виды антибиотиков, виды водорастворимых полимеров, полисахаридов и сахаридов. Так же описаны методы проведения лабораторных, производственных и микрополевых экспериментов.

В третьей главе “Результаты исследований” приводятся результаты лабораторных, производственных и микрополевых опытов.

Результаты исследований и их обсуждение

Сравнение эффективности процессов производства инокулянтов на основе медленнорастущих видов ризобий при периодическом и полунепрерывном режимах культивирования бактерий в ферментере объемом 500 л;

Известно, что производительность периодического режима культивирования зависит от скорости роста конкретного вида клубеньковых бактерий. Например, быстрорастущие ризобии гороха и чечевицы достигают стационарной фазы роста на 2 суток культивирования, при условии посева ферментера культурой в количестве 5% от объема питательной среды. В свою очередь, для получения готового препарата медленнорастущих ризобий сои и люпина при тех же параметрах ферментационного процесса ($t=28^{\circ}\text{C}$, $R=1\text{м}^3/1\text{м}^3$ в мин., $n=200$ об./мин., рН 6,5-7,5) требуется уже 5-6 суток культивирования, что обусловлено более продолжительной лаг-фазой и фазой ускорения роста у данных видов клубеньковых бактерий (рис. 2).

Бактериальная культура при полунепрерывном режиме культивирования поддерживалась в интервале, преимущественно, экспоненциальной фазы роста, что обеспечивает минимальные потери рабочего времени на непроизводительные лаг-фазу и фазу ускоренного роста бактерий (рис. 3).

При полунепрерывном режиме культивирования ризобий сои половину объема культуры в момент достижения бактериями стационарной фазы роста, которую определяли по максимальной плотности клеток (титр $1,6-1,8 \cdot 10^9$ КОЕ/мл), переносили путем передавливания по линии в ферментер накопитель, а оставшуюся половину культуры разводили в 2 раза питательной средой, что приводило к соответствующему снижению титра до $0,8-0,9 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

В наших опытах данная операция занимала 1 ч, что отражено в характере кривых роста на вышеприведенном графике. После выхода процесса на технологический режим ($t=28^{\circ}\text{C}$, $R=1\text{м}^3/1\text{м}^3$ в мин., $n=200$ об./мин.) культивирование ризобий продолжали до повторного достижения титра, характерного для стационарной фазы роста бактерий. Для ризобий сои данный титр составлял $1,6-1,8 \cdot 10^9$ КОЕ/мл и достигался за 24 ч после разведения культуры. При этом, с каждым циклом отъемно-доливного культивирования титр культуры несколько повышался, и достигал на пятом цикле $2,3-2,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, дальнейшего роста значений титра не отмечали.

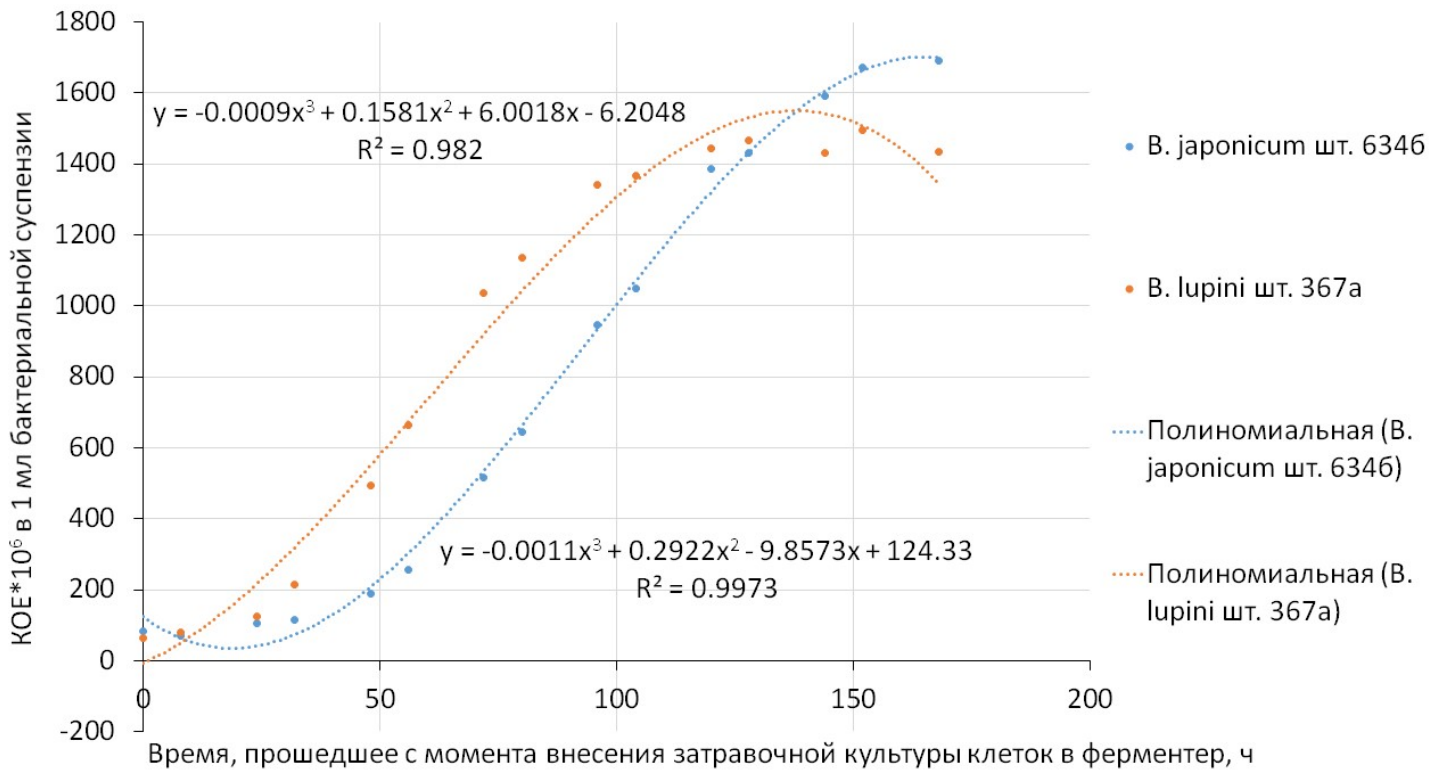


Рисунок 2. Кривые роста клубеньковых бактерий сои и люпина при периодическом режиме культивирования при $t=28^{\circ}\text{C}$; $R=1\text{м}^3/1\text{м}^3$ в мин.; $n=200$ об./мин.; pH 6,5-7,5

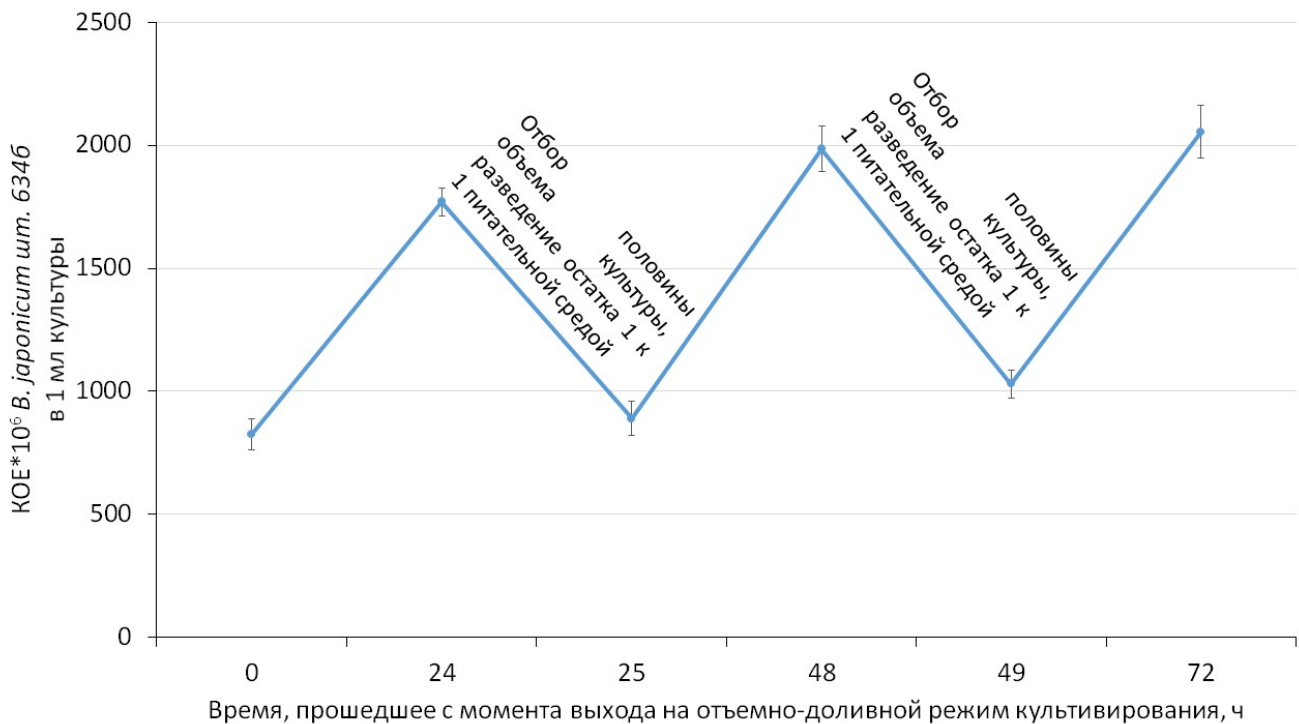


Рисунок 3. Кривая роста клубеньковых бактерий сои при полунепрерывном режиме культивирования с 24-часовым отъемно-доливным циклом при $t=28^{\circ}\text{C}$; $R=1\text{м}^3/1\text{м}^3$ в мин.; $n=200$ об./мин.; pH 6,5-7,5

Отъемно-доливное культивирование ризобий люпина осуществляли по той же технологии и с теми же временными интервалами, что и для ризобий сои. По окончании каждого цикла культуру разводили в два раза питательной средой при достижении бактериями титра $1,4-1,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, каждый цикл культивирования продолжался 24 часа. Титр клеток ризобий люпина также возрастал с каждым циклом культивирования, но, в отличие от ризобий сои, стабилизировался на уровне $1,9-2,1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл уже на 3 цикле культивирования.

Таким образом, на примере клубеньковых бактерий сои и люпина было показано, что полунепрерывный режим культивирования медленнорастущих видов ризобий является, по сравнению с периодическим режимом, более производительным, что выражается в получении препарата бактерий с титром не менее $1,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл в объеме, равном рабочему объему ферментера (500 л) всего за 48 ч, т.е. в 3 раза быстрее, чем при периодическом режиме культивирования при тех же параметрах процесса.

Изучение динамики титра ризобий медленнорастущих видов в процессе хранения жидкой культуры инокулянта в упаковочных тарах из разных материалов в складских условиях

В промышленном производстве инокулянтов для розлива препарата используются, как правило, упаковки из различных полимерных материалов, в частности – герметичные пластиковые канистры и поливинилхлоридные пакеты с различными форм-факторами. В связи с этим представляет интерес изучение эффективности практики хранения жидких препаратов ризобий в герметичных пластиковых канистрах и в двойных поливинилхлоридных пакетах.

Исследуемая тара была наполнена жидкой культурой ризобий сои и люпина, полученной в стационарной фазе роста клеток в процессе полунепрерывного культивирования, осуществляемого по ранее описанной технологии. На момент наполнения тары титр ризобий сои составлял $1,7 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, а титр ризобий люпина $1,4 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Бактериальные культуры разливали без разведения по 5 л канистрам, предварительно простерилизованным 5% р-ом препарата БэбиДез, а также по стерильным двойным поливинилхлоридным пакетам. В треть наполняемых пакетов был добавлен антибиотик ванкомицин из расчета 1 мкг антибиотика на 1 мл культуры, который в производственной практике вносится с целью подавления роста возможной контаминации культуры ризобий медленнорастущих видов посторонней грамположительной микрофлорой. Ванкомицин в пакеты добавлялся с целью определения влияния антибиотика на жизнеспособность ризобий в процессе хранения инокулянта при непрерывном газообмене культуры с окружающей средой. Тара с препаратами хранилась в складских условиях при температуре 10-15°C в течение 6 мес., по прошествии которых определяли титр содержимого (рис. 4).

Через 6 мес. хранения титр ризобий сои в 5 л пластиковых канистрах составлял около $0,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, т.е. сократился более чем в 3 раза с момента розлива. Титр ризобий люпина составлял около $0,2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, т.е. сократился примерно в 7 раз. При этом, титр ризобий сои и люпина в поливинилхлоридных пакетах составлял $1,2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл и $1,1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл соответственно.

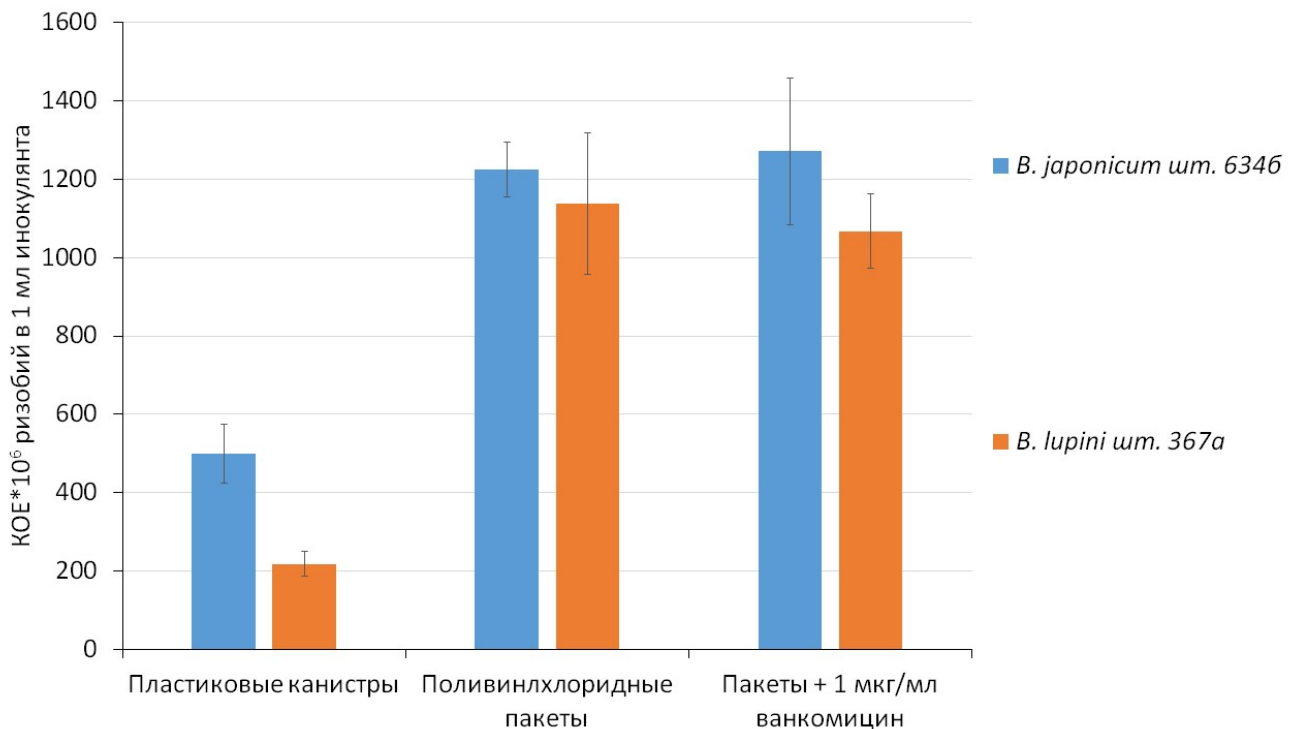


Рисунок 4. Титр бактериальных культур через 6 мес. хранения препаратов в таре из различных материалов в складских условиях при $t=10-15^{\circ}\text{C}$

Таким образом было определено, что для хранения культур ризобий медленнорастущих видов более технологичной упаковкой являются поливинилхлоридные пакеты, которые обеспечивают поддержание титра ризобий сои и люпина на уровне не менее $1,1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл на протяжении 6 мес. хранения, в то время как в герметичных пластиковых канистрах при тех же условиях хранения титр ризобий составлял не более $0,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. При этом, в случае фасовки жидкой культуры инокулянтов по пакетам с добавлением антибиотика ванкомицин в концентрации 1 мкг/мл достоверно не снижало титр ризобий сои и люпина.

Изучение устойчивости различных видов ризобий к различным маркам химических пестицидов при объединении операций протравливания и инокуляции семян в один технологический прием;

В опыте по изучению токсичности концентратов фунгицидных суспензий для клубеньковых бактерий сои, люпина гороха и чечевицы было показано, что концентрация и состав действующих веществ протравителя не определяет степень токсичности пестицида для клубеньковых бактерий. Так, протравители на основе одного и того же действующего вещества с одинаковой концентрацией в составе препаратов (препараты «Максим» и «Протект» на основе 25 г/л флудиоксонила) могут значительно различаться по токсичности для клубеньковых бактерий (таб. 2).

Таблица 2. Доля жизнеспособных ризобий в смеси с 10 и 20 % растворами фунгицидов в зависимости от времени, прошедшего с момента смешения (t=16-18 °C) ($M \pm SEM$), %

Время, ч	Штамм ризобий и концентрация фунгицида							
	<i>Bradyrhizobium</i>				<i>Rhizobium</i>			
	<i>japonicum</i> 634		<i>lupini</i> 367a		<i>leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> um. 260б		<i>leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> um. um. 712	
	10 %	20 %	10 %	20 %	10 %	20 %	10 %	20 %
Максим, КС								
2	79,02±4,95	67,31±3,56	82,56±5,64	73,76±4,26	83,43±5,23	81,6±5,26	81,67±5,27	63,33±3,21
4	75,52±4,20	65,91±3,24	75,36±4,58	69,92±3,98	74,11±4,13	67,2±3,89	71,67±7,13	60,00±3,14
8	68,88±3,98	31,12±1,72	64,48±3,67	47,36±2,58	70,19±3,98	34,7±1,94	41,67±2,10	23,33±0,79
Протект, КС								
2	75,20±4,45	50,30±3,12	60,69±3,33	33,49±1,49	62,58±3,09	31,11±1,21	81,67±5,28	13,41±0,26
4	58,57±2,89	32,47±1,32	48,43±2,98	25,63±0,71	52,02±2,27	22,14±0,76	71,67±7,16	3,66±0,19
8	36,25±1,97	18,23±0,45	35,06±1,73	9,43±0,14	32,52±1,67	13,98±1,05	41,67±2,13	0,00
Протект Форте, ВСК								
2	69,73±3,64	52,93±3,16	55,03±3,57	38,76±2,03	39,00±1,99	17,00±0,54	2,62±0,16	0,00
4	46,12±2,31	27,73±0,86	46,64±2,75	18,12±0,41	36,00±1,75	14,00±0,34	1,07±0,12	0,00
8	28,68±0,95	22,03±0,69	22,65±0,74	3,69±0,10	22,00±0,68	1,00±0,12	0,12±0,10	0,00

Тем не менее было показано, что препараты ризобий гороха и чечевицы, чувствительных к пестицидам, можно эффективно, т.е. без существенного снижения титра клеток, совмещать с фунгицидами в баковом растворе посредством понижения его температуры. Так, после 4 часа контакта клубеньковых бактерий гороха с 20% раствором фунгицида «Протект» при температуре 26-28°C не удалось выделить жизнеспособных ризобий, при температуре 16-18°C титр ризобий гороха составлял $25 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, а при температуре раствора в 2-5 °C титр жизнеспособных ризобий составлял около $100 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, т.е. был в 4 раза большим, чем при температуре 16-18°C (рис. 5).

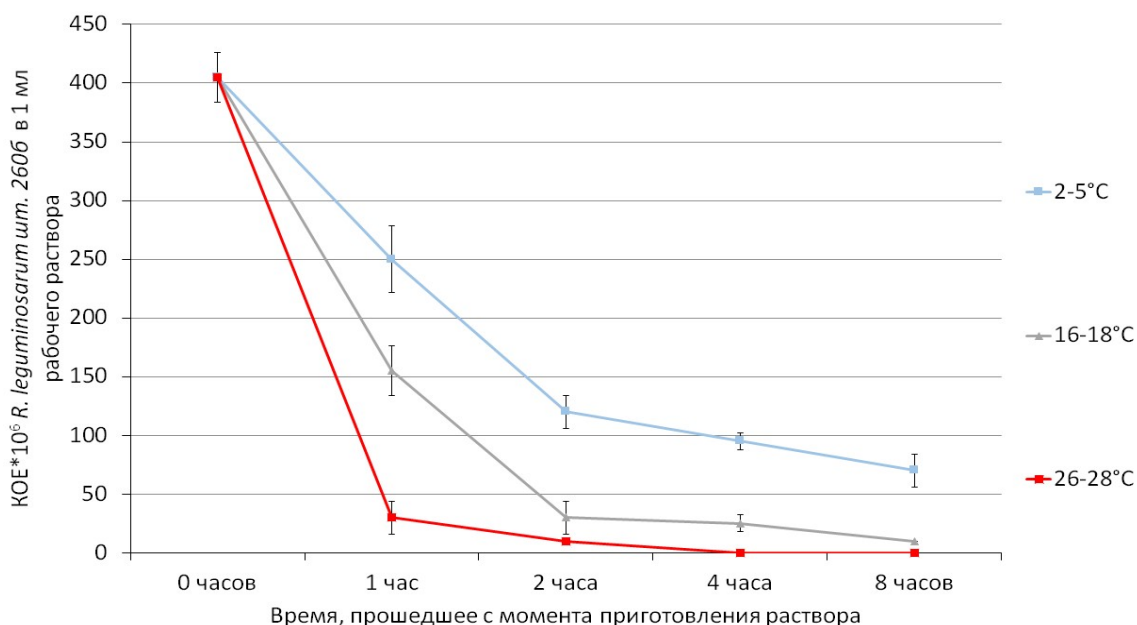


Рисунок 5. Оценка токсичности фунгицидного препарата на жизнеспособность клубеньковых бактерий *R. leguminosarum* bv. *viciae* um. 260б в 20% растворе фунгицида «Протект»

Разработка протектора для защиты ризобий от осмотического стресса на инокулированных семенах на основе водорастворимых полимеров, полисахаридов и сахаридов;

Нами было определено, что ризобии на инокулированных семенах находятся в явно неблагоприятных условиях, что выражается в снижении числа жизнеспособных клеток на 1 семени с $100 \cdot 10^3$ КОЕ через 8 ч после обработки до $25 \cdot 10^3$ КОЕ через 24 ч после обработки, и полной гибели бактерий через 48 ч после обработки. Установлено, что поливиниловый спирт обоих марок (PVA 4-88, PVA 4-98), карбоксиметилцеллюлоза и альгинат натрия эффективно защищают клетки ризобий на семенах только в течение первых 2 суток, что указывает на то, что эти соединения являются неэффективными в качестве протекторов. В то же время, 8-10% раствор поливинилпирролидона в составе бакового раствора обеспечивает поддержание от $10-40 \cdot 10^3$ КОЕ на 1 семени даже через 10 суток после инокуляции (рис. 6).

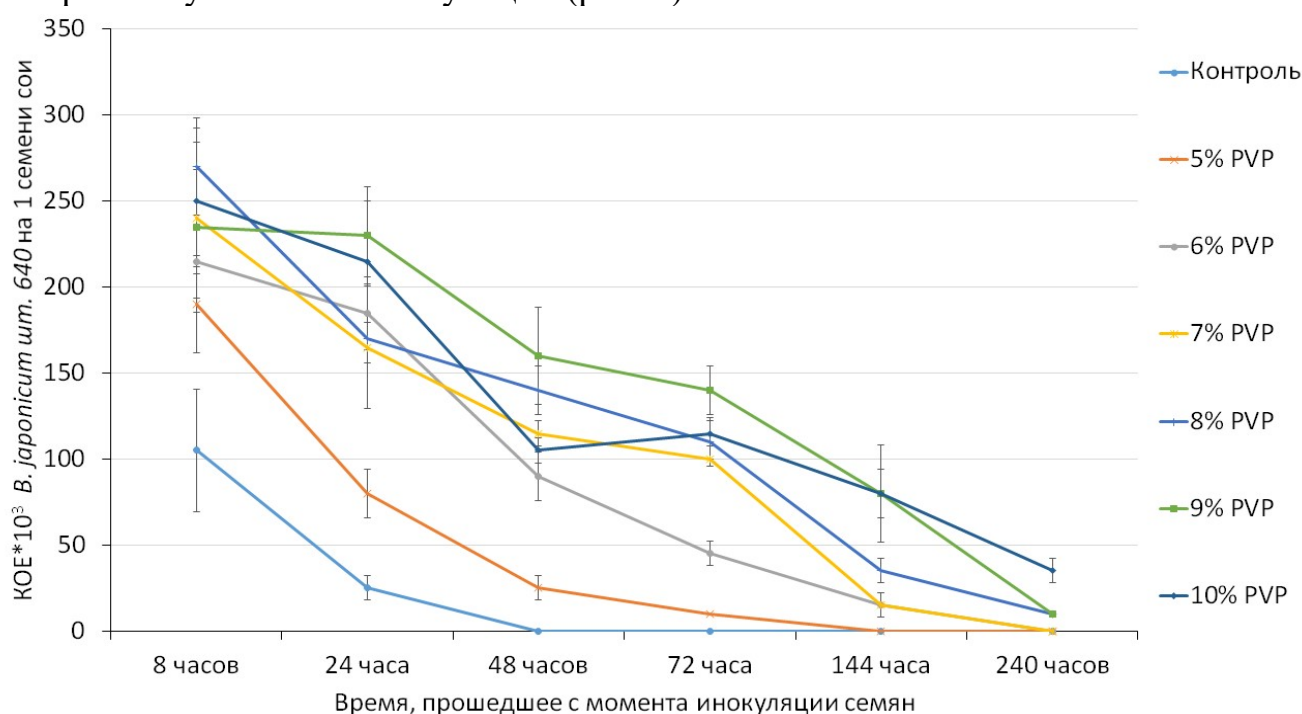


Рисунок 6. Оценка протекторных свойств поливинилпирролидона в баковом растворе по динамике изменения титра ризобий на инокулированных семенах сои

Нами была исследована возможность использования трегалозы в качестве протектора ризобий на инокулированных семенах. Было показано, что добавление в баковый раствор трегалозы обеспечивает более высокие значения титра клеток *V. jarrowii* шт. 640 на ранних стадиях после инокуляции (8-72 часа) семян по сравнению с вариантами, в которых использовали поливинилпирролидон. Самый высокий протекторный эффект трегалозы наблюдали при ее 20% концентрации в баковом растворе. Показано, что использование указанного протектора позволило сохранить более $500 \cdot 10^3$ КОЕ на 1 семени через 8 часов после обработки семенного материала и около $100 \cdot 10^3$ КОЕ через 144 часа после обработки (Рис. 7).

Таким образом, было показано, что использование 10% р-ра поливинилпирролидона или 20% р-ра трегалозы в качестве веществ, защищающих ризобии от осмотического стресса на обработанных семенах, позволяет осуществить эффективную заблаговременную инокуляцию семян за 10 суток до их посева.

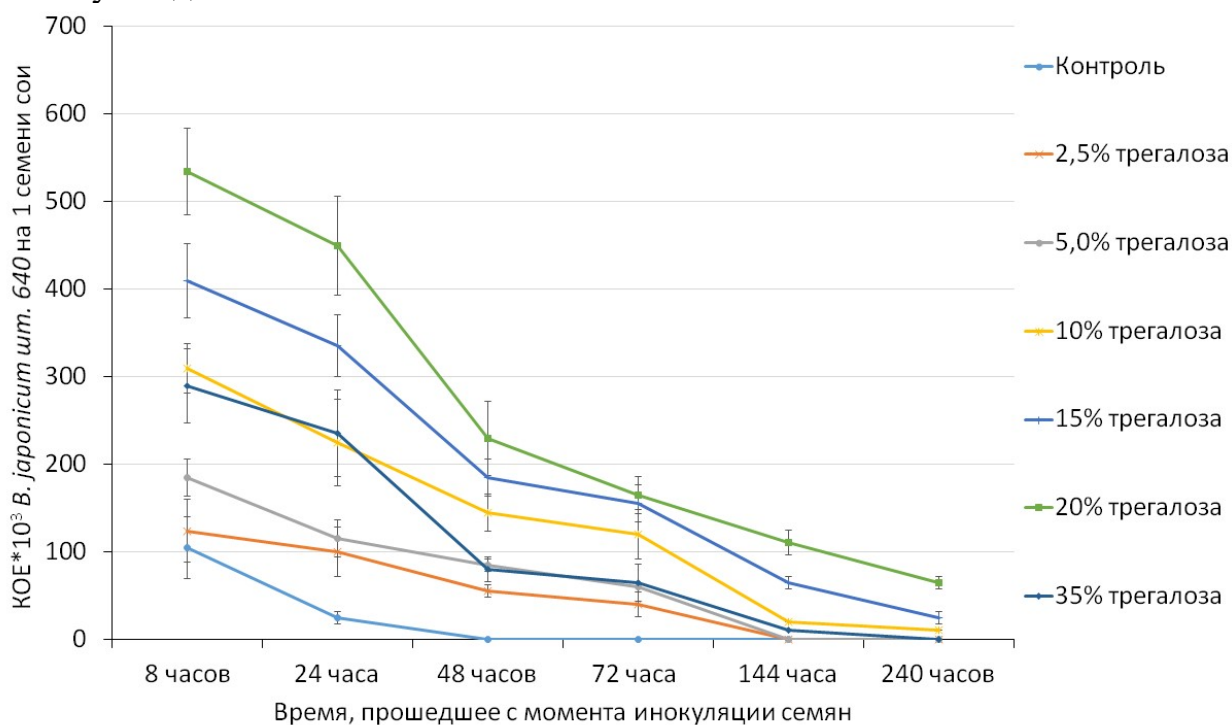


Рисунок 7. Оценка протекторных свойств трегалозы в баковом растворе по динамике изменения титра ризобий на инокулированных семенах сои

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для повышения эффективности приема предпосевной инокуляции семян в условиях интенсивного агропромышленного производства необходимо обеспечить интеграцию современных био- и агротехнологий при возделывании бобовых культур, т.е. необходимо усовершенствовать методики эффективного совмещения инокулянтов с ХСЗР в одном баковом растворе и разработать протекторы, повышающие жизнеспособность бактерий на обработанных семенах. При этом, необходимо обеспечить как можно больший титр инокулянта на момент его применения, что позволит в той или иной степени скомпенсировать потери бактерий от различных стресс-факторов и повысить шанс закрепления вносимых бактерий в ризосфере агрокультуры.

По результатам проведенных исследований сформулированы следующие **выводы:**

1. Полунепрерывный режим культивирования ризобий медленно растущих видов является более производительным в сравнении с периодическим режимом при использовании ферментера с рабочим объемом 500 л. При полунепрерывном режиме культивирования тот же объем культуры ризобий, с титром не менее $1,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, производится за время в 3 раза меньшее, чем при периодическом режиме культивирования при прочих равных параметрах технологического процесса;

2. Двухслойный поливинилхлоридный пакет, по сравнению с герметичной пластиковой канистрой, является более технологичной тарой для хранения жидких культур ризобий медленнорастущих видов. В наполненных инокулянтном канистрах через 6 мес. их хранения на складе при температуре 10-15°C титр ризобий сои составлял около $0,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, т.е. сократился более чем в 3 раза с момента розлива. При тех же условиях хранения упаковка из поливинилхлоридной пленки позволяла результативно поддерживать титр ризобий сои в течение 6 мес. на уровне $1,2-1,4 \cdot 10^9$ КОЕ;

3. Протравители на основе одного и того же действующего вещества могут существенно отличаться по своей токсичности для ризобий. В частности, доля жизнеспособных клеток *B. japonicum* после 8 часов контакта в баковом растворе с 20% фунгицидов Максим и Протект (фунгициды на основе одного и того же д.в.) при температуре 16-18°C составляла 31,12% и 18,23% соответственно. При разработке методик применения баковых растворов инокулянтов и химических фунгицидов необходимо учитывать токсичность пестицидов для ризобий с ростом температуры бакового раствора. В частности, титр клубеньковых бактерий сои в контакте с 20% раствором фунгицида Протект за 4 часа при температуре 2-5°C сокращается не более чем в 2 раза, в то время как при температуре 16-18°C титр бактерий падает более чем в 4 раза;

4. Ведение в баковый раствор с инокулянтном водорастворимых полимеров, полисахаридов и сахаридов способствует поддержанию жизнеспособности клубеньковых бактерий на обработанных семенах в течение более продолжительного времени. В варианте с водным раствором инокулянта жизнеспособные бактерии не удается выделить из смывов с семян уже спустя 2 суток после их обработки, в то время как использование поливинилпирролидона и трегалозы в качестве протектора ризобий обеспечивает наличие десятков тысяч жизнеспособных клеток на 1 семени спустя 10 суток после их обработки.

По результатам исследования были сформулированы следующие **практические предложения**

1. При производстве препаратов медленнорастущих видов ризобий следует переходить с периодического на более производительный отъемно-доливной режим культивирования;

2. Для увеличения срока хранения инокулянтов в качестве тары для препаратов целесообразно использовать воздухопроницаемые поливинилхлоридные пакеты;

3. Для эффективного совмещения инокуляции и протравливания семян в одну операцию необходимо учитывать такие факторы как: марка протравителя, вид ризобий, концентрация протравителя в баковом растворе, температурный режим и время выдержки бакового раствора;

4. Для заблаговременной инокуляции семян необходимо использовать протекторы на основе поливинилпирролидона и трегалозы, которые следует добавлять в баковый раствор перед его применением.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ (ДИССЕРТАЦИИ) ОПУБЛИКОВАНЫ В СЛЕДУЮЩИХ ИЗДАНИЯХ:

Статьи в изданиях, включенных в перечень ВАК

1. **Косульников Ю.В.** Сравнение эффективности поливинилпирролидона и трегалозы в качестве протекторов ризобий на инокулированных семенах сои / Ю.В. Лактионов, Ю.В. Косульников // Бутлеровские сообщения. 2021. Т.66. №4. С.21-25. RO1: jbc-01/21-66-4-21

Статьи в журналах, входящих в международные реферативные базы данных

2. **Косульников Ю.В.** О факторах, влияющих на токсичность протравителей семян для симбиотических азотфиксаторов в составе биопрепаратов / **Ю.В. Косульников**, Ю.В. Лактионов // Сельскохозяйственная биология – 2018. – Т. 53, № 5. – С. 1037-1044.

3. **Косульников Ю.В.** Протекторные свойства водорастворимых полимерных композиций и их твердофазной модификации при предпосевной обработке инокулированных семян сои *glycine max* (L.) Merr. / Ю.В. Лактионов, **Ю.В. Косульников**, Д.В. Дудникова, В.В. Яхно, А.П. Кожемяков // Сельскохозяйственная биология – 2019. – Т. 54, №5. – С. 1052-1059

4. **Kosulnikov Y.V.** Determination of toxicity of various preparative forms of pesticidal fungicides for nodule bacteria inoculants / Y.V. Laktionov, Y.V. Kosulnikov, V.V. Yachno and A.P. Kozhemyakov // E3S Web Conf., 224 (2020) 04032

Статьи в других изданиях:

5. **Косульников Ю.В.** Влияние водорастворимых полимеров на выживаемость клубеньковых бактерий люпина (*RHIZOBIUM LUPINI*) / Ю.В. Лактионов, **Ю.В. Косульников**, Д.В. Дудникова // Зерновое хозяйство России – 2018. – №3. – С. 22-26

6. **Косульников Ю.В.** Оценка устойчивости штаммов клубеньковых бактерий сои к рекомендуемым химическим фунгицидам / Ю.В. Лактионов, **Ю.В. Косульников**, Д.В. Дудникова, В.В. Яхно, А.П. Кожемяков // Зерновое хозяйство России – 2019. - №1. – С. 62-67

7. **Косульников Ю.В.** Изучение токсичности ряда протравителей зернобобовых культур для клубеньковых бактерий сои и люпина / **Ю.В. Косульников** // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета – 2019. - №1(54). – С. 52-56.

8. **Косульников Ю.В.** Увеличение допустимых сроков между предпосевной обработкой семян сои биопрепаратом и ее высевом / Ю.В. Косульников // Роль молодых ученых в решении актуальных задач АПК: Сборник статей СПбГАУ. – СПб., 2016. – С. 26-29.

9. **Косульников Ю.В.** Устойчивость различных штаммов клубеньковых бактерий сои к рекомендуемым для сои протравителям семян / Ю.В. Ко-

сульников // Роль молодых ученых в решении актуальных задач АПК: Сборник статей СПбГАУ. – СПб., 2018. – С. 26-29.

10. **Косульников Ю.В.** Совместное использование биопрепарата клубеньковых бактерий и пестицида табу для предпосевной инокуляции семян сои / Д.В. Дудникова, Ю.В. Косульников // Вестник студенческого научного общества – 2018. – Т. 9, № 1. – С. 33-36.

11. **Косульников Ю.В.** Эволюция способов получения и внесения микробиологических препаратов / Ю.В. Лактионов, Ю.В. Косульников, А.П. Кожемяков // В сборнике: Перспективы использования инновационных форм удобрений, средств защиты и регуляторов роста растений в агротехнологиях сельскохозяйственных культур. Материалы докладов участников 9-ой научно-практической конференции "Анапа-2016". Под редакцией В.Г. Сычева. – 2016. – С. 94-96

Патенты:

12. №2728471. Инокулянт для семян сои. / Ю.В. Лактионов, А.П. Кожемяков, **Ю.В. Косульников**, Д. В. Николаенко, В.В. Яхно //

13. №2738726. Штамм клубеньковых бактерий *Mezorhizobium* RСAM02723 – Стимулятор урожайности нута и способ получения инокулянта для нута. / Ю.В. Лактионов, А.П. Кожемяков, **Ю.В. Косульников**, В.В. Яхно //