

УДК 632.9+632.981.32+579.64

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-0-4-90-94

**БИОПОЛИМЕРНАЯ ПРЕДПОСЕВНАЯ ОБРАБОТКА СЕМЯН
ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ**

© С.П. Четвериков, Р.К. Биккузина, Д.В. Четверикова

Повышение устойчивости растений к болезням и увеличение их всхожести и прорастания – актуальная задача развития сельского хозяйства, которая решается применением биопрепаратов на основе живых культур микроорганизмов при обработке семян. Необходимость исследований, связанных с определением периода времени, в течение которого на семенах сохраняются жизнеспособные активные клетки нанесенных микроорганизмов биологических препаратов, связана с тем, что только достаточно высокий титр клеток на зерне перед посевом может гарантировать будущую хорошую приживаемость в ризосфере интродуцированного микроорганизма. Целью данной работы являлась оценка динамического воздействия обработки биополимерами на приживаемость и жизнеспособность микроорганизмов биопрепаратов, и сохранение их биологической активности при совместной предпосевной обработке семян. Показано, что предпосевная обработка семян пшеницы и ячменя биопрепаратами для защиты сельскохозяйственных растений от фитопатогенов и повышения их урожайности «Елена», СХП (на основе штамма ризосферных бактерий *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51) и «Азолен», СХП (на основе штамма свободноживущих азотфиксирующих почвенных бактерий *Azotobacter vinelandii* ИБ 4) совместно с биополимерами – экзополисахаридами «Азопол» (продуцент *Azotobacter vinelandii* ИБ 1) и «739» (продуцент *Paenibacillus ehimensis* ИБ 739) по своим потребительским качествам и удобству в применении лишена ряда недостатков ранее использовавшихся биопрепаратов. Использование в качестве прилипателей растворов экзополисахаридов бактериального происхождения как альтернатива химическому полисахариду способствует увеличению периода жизнеспособности бактерий на поверхности семян. Подобный положительный эффект обусловлен защитным действием, оказываемым раствором биополимера, тем самым блокируя высушивание и гибель бактериальных клеток. Такая биополимерная обработка пролонгированного действия положительно сказывается на приживаемости и жизнеспособности микроорганизмов биопрепаратов и сохранении их биологической активности. Титр микроорганизмов биологических препаратов «Елена» и «Азолен» на семенах в процессе их хранения в течение 9 месяцев снижается не более чем на 30% практически со 100% сохранением антагонистической активности ингибирования роста фитопатогенных грибов.

Ключевые слова: биополимер, биопрепарат, обработка семян.

Полимерные частицы широко используются для создания принципиально новых лекарственных форм, названными системами доставки лекарств или макромолекулярными терапевтическими системами. Их использование позволяет осуществить длительную и непрерывную передачу лекарственного вещества в организм по заданной программе, причем во многих случаях в орган-мишень. Перспективным носителем для получения частиц являются природные полисахариды, в частности, альгиновые кислоты. Аналогичного эффекта можно достичь и в сельскохозяйственной практике.

Одной из актуальных задач развития сельского хозяйства является повышение устойчивости растений к болезням и увеличение их всхожести и прорастания – это и простая традиционная обработка семян пестицидами, и многослойное капсулирование. Для защиты растений от болезней наряду с химическими фунгицидами широко используются биопрепараты на основе живых культур микроорганизмов [1].

Известно, что различные микроорганизмы обладают полезным действием на растения. Эти микроорганизмы включают бактерии родов *Rhizobium* (включая *Bradyrhizobium*), *Pseudomonas*,

ЧЕТВЕРИКОВ Сергей Павлович – д.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: che-kov@mail.ru

БИККУЗИНА Регина Камилловна, Уфимский государственный нефтяной технический университет,
e-mail: biolab316@yandex.ru

ЧЕТВЕРИКОВА Дарья Владимировна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: biolab316@yandex.ru

Serratia, *Bacillus* (включая *Paenibacillus*), *Pasteuria*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Azospirillum*. Такие микроорганизмы могут доставляться к растению посредством использования композиций инокулянтов.

Композиции инокулянтов могут наноситься прямо на семена растений перед посадкой семян. Однако зачастую наблюдались изменчивые и несогласующиеся между собой результаты, возможно, вследствие потери жизнеспособности бактерий или возможного изменения дозировки, обусловленной изменениями жизнеспособности инокулянтов, т.к. у микроорганизмов инокулянта нет времени для адаптации к новой окружающей среде [2].

В настоящее время в практике растениеводства для повышения жизнеспособности микроорганизмов биологических препаратов при нанесении их на семена растений добавляются вспомогательные компоненты, продлевающие срок выживаемости бактерий и способствующие их фиксации на основе сахаров или полимеров. В частности для неспецифического прикрепления используются синтезируемые бактериями высокомолекулярные экзополисахариды, играющие большую роль при формировании микроорганизмами биопленок [3].

Необходимость исследований, связанных с определением периода времени, в течение которого на семенах сохраняются жизнеспособные активные клетки нанесенных микроорганизмов биологических препаратов, связана с тем, что только достаточно высокий титр клеток на зерне перед посевом может гарантировать будущую хорошую приживаемость в ризосфере интродуцированного микроорганизма.

Целью данной работы являлась оценка динамического воздействия обработки биополимерами на приживаемость и жизнеспособность микроорганизмов биопрепаратов, и сохранение их биологической активности при совместной предпосевной обработке семян.

Условия эксперимента. В качестве объектов исследований использовали разработанные в УИБ УФИЦ РАН биопрепарат «Елена», СХП (на основе штамма ризосферных бактерий *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51, ТУ 9291-017-22657427-2002) и микробиологическое удобрение «Азолен», СХП (на основе штамма свободноживущих азотфиксирующих почвенных бактерий *Azotobacter vinelandii* ИБ 4, ТУ 9291-018-22657427-2005) для защиты сельскохозяйствен-

ных растений от фитопатогенов и повышения их урожайности. Биопрепараты прошли Государственную регистрацию и допущены к обороту на территории Российской Федерации. Промышленное производство препаратов осуществляет ЗАО НПП «Биомедхим» (г. Уфа).

Для биополимерной обработки использовали высоковязкие биополимеры бактерий *Azotobacter vinelandii* ИБ 1 («Азопол») и *Paenibacillus ehimensis* ИБ 739 («739») – полисахариды-полиурониды с молекулярной массой в интервале 250–450 кДа, стабильные в диапазоне рН 4.0–9.0 в широком интервале температур, хорошо растворимые в высокоминерализованной воде с сохранением высокого уровня вязкости [4, 5]. В качестве контрольного варианта прилипателя-адгезива использовали традиционный вариант с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) [6, 7].

Суспензию для обработки семян готовили смешением с водой порошка биопрепарата и сухого полимера. Концентрация биополимера в рабочем растворе составляла 1%, в контрольном варианте использовали 10% раствор КМЦ. Обработку вели из расчета 10 мл рабочего раствора на 1 кг нестерильных зерен пшеницы или ячменя ($\sim 1 \cdot 10^5$ клеток биопрепарата/г зерна). Обработанные зерна хранили в стеклянных колбах, закрытых ватно-марлевыми пробками при температуре $4 \pm 6^\circ\text{C}$. Равномерность распределения суспензии по поверхности семян оценивали добавлением в нее 0.1% красителя.

Численность интродуцированных жизнеспособных микроорганизмов на семенах определяли высевом водных смывов с 1 г зерен. Инокулированные семена помещали в ступку с 10 мл стерильной водопроводной воды и легко растирали для удаления верхнего слоя с семян. Из полученной суспензии готовили ряд последовательных разведений, которые высевали на мясопептонный агар МПА. Через трое суток инкубации в термостате при 28°C подсчитывали количество выросших колоний и определяли количество КОЕ в расчете на 1 г семян.

Сохранение биологической активности биопрепаратов оценивали по наличию антагонизма в отношении фитопатогенных грибов методом совместного выращивания бактерий и фитопатогенов в чашках Петри [8, 9]. В качестве тест-организмов для определения антигрибной активности использовали *Fusarium avenaceum* ВКМ 132, *F. culmorum* ВКМ 844, *F. gibbosum* ВКМ 848, *F. graminearum* ВКМ 1668, *F. moniliforme*, *F. nivale* ВКМ3106, *F. oxysporum* ВКМ 137,

F. semitectum ВКМ 1938, *F. solani* ВКМ 142, *Alternaria alternata*, *Bipolaris sorokiniana*. Культуры *F. moniliforme*, *A. alternata* и *B. sorokiniana* являются местными изолятами из Коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН.

Результаты и их обсуждение. В существующей сельскохозяйственной практике для предпосевной обработки биопрепараты могут использоваться только в жидком виде; сухие препараты разводятся водой, приобретая при этом практически все недостатки жидких препаративных форм. Поэтому обработка посевного материала может проводиться только непосредственно перед посевом. В этом плане биопрепараты сильно уступают химическим протравителям, обработка которыми может проводиться заблаговременно за несколько месяцев.

Ранее было показано, что срок жизнеспособности клеток на зерне крайне ограничен. В течение полутора недель после инокуляции зерен численность популяции штамма-антагониста на их поверхности снижалась в 50 раз, а через 20 дней после бактеризации вообще не удалось обнаружить на семенах жизнеспособных клеток штамма. Совместная обработка семян пшеницы суспензией клеток штамма-антагониста и растворами экзополисахаридов в различных концентрациях способствовала поддержанию на семенах титра бактерий, на несколько порядков превышающего контрольные значения [10].

В табл. 1 и 2 представлены данные о выживаемости микроорганизмов биопрепаратов в динамике соответственно на семенах пшеницы и ячменя, подвергнутых биополимерной предпосевной обработке. Видно, что совместная обработка суспензией клеток штамма-антагониста и растворами

биополимеров способствует поддержанию на семенах титра бактерий, который в худшем случае не понижается даже через 9 месяцев хранения.

Биополимерная обработка способствует прочному связыванию микроорганизмов с поверхностью семян, адгезия к которым не зависит от родовой принадлежности микроорганизмов.

Использование в качестве прилипателей растворов экзополисахаридов бактериального происхождения как альтернатива химическому полисахариду, в частности КМЦ, способствует увеличению периода жизнеспособности бактерий на поверхности семян. Подобный положительный эффект может быть обусловлен защитным действием, оказываемым раствором биополимера, тем самым блокируя высушивание и гибель бактериальных клеток.

Немаловажно, что практически не изменяется и биологическая активность микроорганизмов, составляющих основы биопрепаратов «Елена» и «Азолен» (табл. 3).

При замачивании в воде микроорганизмам биопрепаратов требуется несколько часов для выхода из неактивного состояния и восстановления нормального обмена веществ. Эту длительную лаг-фазу можно использовать при проведении предпосевной обработки семян. Если операции по растворению биопрепаратов проводить с минимальным количеством воды, а по биополимерной обработке семян минимальным количеством суспензии, и в течение короткого промежутка времени, то семена высыхают естественным образом, а микроорганизмы не успевают активизироваться и остаются в покоящейся форме на семенах. Наши данные показали, что это предотвращает гибель микроорганизмов в процессе хранения семян.

Т а б л и ц а 1

Численность микроорганизмов в смывах с семян пшеницы, $\times 10^5$ КОЕ/г

Экспозиция, месяцы	Биопрепарат					
	«Елена»			«Азолен»		
	Биополимер					
	КМЦ	«Азопол»	«739»	КМЦ	«Азопол»	«739»
0	1.5±0.2	2.3±0.4	3.5±0.6	1.5±0.5	1.5±0.3	1.6±0.2
0.5	1.3±0.3	2.0±0.3	2.3±0.3	4.1±0.5	1.2±0.2	2.2±0.3
1	1.0±0.1	1.5±0.3	2.0±0.1	0.8±0.1	2.5±0.4	6.5±0.4
1.5	0.3±0.1	3.9±0.5	0.7±0.1	0.6±0.1	0.8±0.2	1.1±0.3
3	0.5±0.2	5.5±0.6	0.5±0.2	0.8±0.2	0.9±0.2	0.9±0.2
6	1.9±0.4	9.3±0.6	7.7±0.5	1.2±0.4	2.1±0.3	3.3±0.4
7	1.3±0.3	2.0±0.4	3.3±0.3	4.0±0.5	1.2±0.3	2.2±0.3
8	1.0±0.2	1.5±0.4	2.1±0.4	1.6±0.3	2.5±0.4	6.5±0.4
9	1.0±0.2	12.2±1.0	7.7±0.5	1.0±0.2	2.1±0.4	3.2±0.5

Численность микроорганизмов в смывах с семян ячменя, $\times 10^5$ КОЕ/г

Экспозиция, месяцы	Биопрепарат					
	«Елена»			«Азолен»		
	Биополимер					
	КМЦ	«Азопол»	«739»	КМЦ	«Азопол»	«739»
0	1.6±0.3	8.8±0.6	1.5±0.3	1.5±0.2	1.3±0.2	1.7±0.3
0.5	1.0±0.3	7.0±0.5	1.0±0.3	0.5±0.5	1.0±0.4	2.0±0.4
1	0.3±0.1	3.0±0.6	4.0±0.5	0.3±0.2	2.5±0.6	2.6±0.4
1.5	0.3±0.1	0.7±0.2	0.8±0.3	0.2±0.1	0.4±0.1	0.3±0.1
3	0.2±0.1	0.7±0.2	0.8±0.2	0.2±0.1	0.3±0.1	0.5±0.1
6	1.3±0.3	6.2±0.4	1.0±0.2	0.2±0.1	1.0±0.3	2.0±0.3
7	1.0±0.3	7.0±0.4	2.0±0.4	0.2±0.1	2.5±0.3	2.0±0.3
8	1.1±0.4	6.5±0.5	1.5±0.3	0.1±0.05	2.5±0.6	2.0±0.3
9	1.3±0.4	6.2±0.3	1.2±0.3	0.1±0.05	1.0±0.2	2.0±0.2

Таблица 3

Антагонистическая активность микроорганизмов биопрепаратов «Елена» и «Азолен» (72 ч инкубации при 28°C), диаметр зоны ингибирования роста фитопатогенных грибов, мм

Штаммы фитопатогенных грибов	«Елена», до обработки	«Елена», остаточная	«Азолен», до обработки	«Азолен», остаточная
<i>Alternaria alternate</i> (Fr.) Keissl	22.3±3.0	21.8±3.3	30.5±4.0	30.0±3.3
<i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Shoemaker	30.5±2.8	30.5±3.0	29.6±3.5	29.0±3.0
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc BKM 132	16.9±2.5	15.8±2.3	18.3±2.3	17.9±1.9
<i>F. culmorum</i> (W.G. Smith) Sacc. BKM 844	22.2±2.0	21.5±3.2	31.2±2.2	31.5±3.1
<i>F. gibbosum</i> Appel et Wollenw BKM 848	31.1±3.6	32.0±3.2	20.0±1.6	20.2±1.2
<i>F. graminearum</i> Schwabe BKM 1668	17.0±2.0	17.2±3.1	16.7±2.2	15.7±3.3
<i>F. moniliforme</i> J. Sheld	20.1±2.5	20.0±2.6	18.5±2.3	18.0±2.7
<i>F. nivale</i> (Fr.) Ces. ex Sacc. BKM 3106	28.8±4.2	29.2±3.8	11.8±2.2	11.2±2.0
<i>F. oxysporum</i> Schltdl BKM 137	25.9±3.8	26.0±3.0	12.9±2.5	12.2±2.3
<i>F. semitectum</i> Berk et Ravenel BKM 1938	17.7±3.3	17.7±2.7	14.6±2.4	13.8±3.1
<i>F. solani</i> (Mart) Sac BKM 142	16.6±2.9	16.4±2.8	13.5±2.7	13.9±2.8

Таким образом, совместная обработка биополимерами «Азопол» и «739» и биопрепаратами по своим потребительским качествам и удобству в применении лишена ряда недостатков ранее использовавшихся биопрепаратов. Такая биополимерная обработка положительно сказывается на приживаемости и жизнеспособности микроорганизмов биопрепаратов и сохранении их биологической активности при совместной предпосевной обработке семян: титр микроорганизмов биологических препаратов «Елена» и «Азолен» на семенах пшеницы и ячменя в процессе их хранения в течение 9 месяцев снижается не более чем на 30% практически со 100% с сохранением антагонистической активности ингибирования роста фитопатогенных грибов.

Литература

1. Логинов О.Н., Мелентьев А.И., Силищев Н.Н., Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф., Свешнико-

ва Е.В. Роль бактерий-антагонистов фитопатогенов в защите сельскохозяйственных растений от болезней. Уфа: Гилем, 2001. 66 с.

2. Жидкие бактериальные инокулянты с повышенным сроком годности и повышенной стабильностью на семенах: пат. 2428467. Рос. Федерация. № 2007127833/10, заявл. 14.11.2005; опубли. 10.09.2011. Бюл. № 25.

3. Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation // *Molecules*. 2009. V. 14. P. 2535–2554.

4. Логинов Я.О., Худайгулов Г.Г., Четвериков С.П., Мелентьев А.И., Логинов О.Н. Биополимер альгинатной природы с преобладанием L-гиалуриновой кислоты // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2011. Т. 47. № 3. С. 343–347.

5. Четвериков С.П., Худайгулов Г.Г., Логинов О.Н. Полиурониды бактерий родов *Pseudomonas* и *Paenibacillus* // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2012. № 3. С. 89–95.

6. Самоконсервирующий биопрепарат для защиты растений от болезней (варианты) и способ его получения (варианты): пат. 2380906. Рос. Феде-

рация. № 2008114859/13, заявл. 18.04.2008; опубл. 20.08.2009. Бюл. № 4.

7. Биопрепарат под бобовую культуру жидкой формы на основе клубеньковых бактерий: пат. 2514217. Рос. Федерация. № 2012151105/10, заявл. 29.11.2012; опубл. 27.04.2014. Бюл. № 12.

8. Четвериков С.П., Логинов О.Н. Новые метаболиты *Azotobacter vinelandii*, обладающие антигрибной активностью // Микробиология. 2009. Т. 78, № 4. С. 479–483.

9. Логинов О.Н., Четвериков С.П., Гусаков В.Н. Триглицеридпептиды – новая группа антигрибных метаболитов псевдомонад (*Pseudomonas*) // Доклады Академии Наук. 2003. Т. 393, № 5. С. 715–717.

10. Свешникова Е.В. Новые бактерии рода *Pseudomonas* – антагонисты фитопатогенов и перспективы их использования в сельскохозяйственной практике: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2003. 23 с.

References

1. Loginov O.N., Melentyev A.I., Silishchev N.N., Galimzyanova N.F., Boyko T.F., Svshnikova E.V. Role of bacterium - antagonists of phytopathogens in the protection of agricultural plants from diseases. Ufa, Gilem, 2001. 66 p.

2. Liquid bacterial inoculants with extended useful life and enhanced stability on seeds. Patent RF 2428467. No. 2007127833/10, appl. November 14, 2005; publ. September 10, 2011. Bull. no. 25.

3. Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P. Bacterial extracellular polysaccharide involved in biofilm formation. *Molecules*, 2009, vol. 14, pp. 2535–2554.

4. Loginov Ya.O., Khudaygulov G.G., Chetverikov S.P., Melentyev A.I., Loginov O.N. Biopolymer of alginate nature with a predominance of L-guluronic acid. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2011, vol. 47, no. 3, pp. 343–347.

5. Chetverikov S.P., Khudaygulov G.G., Loginov O.N. Bacterial polyuronides of the genera *Pseudomonas* and *Paenibacillus*. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*, 2012, no. 3, pp. 89–95.

6. Semiconservative biological product for protection of plants against diseases and method for its production (variants), Patent RF 2380906. No. 2008114859/13, appl. April 18, 2008; publ. August 20, 2009. Bull. no. 4.

7. Biological preparation for leguminous crop of liquid form based on nodule bacteria. Patent RF 2514217. No. 2012151105/10, appl. November 29, 2012; publ. April 27, 2014. Bull. no. 12.

8. Chetverikov S.P., Loginov O.N. New metabolites of *Azotobacter vinelandii* with antifungal activity. *Mikrobiologiya*, 2009, vol. 78, no. 4, pp. 479–483.

9. Loginov O.N., Chetverikov S.P., Gusakov V.N. Triglyceridepeptides, a new group of antifungal metabolites of pseudomonads (*Pseudomonas*). *Doklady Biology*, 2003, vol. 393, no. 5, pp. 715–717.

10. Svshnikova E.V. New bacteria of the genus *Pseudomonas* – antagonist of phytopathogens and their potential use in agricultural practice, PhD in Biology. Ufa, 2003. 23 p.

BIOPOLYMER PRESOWING TREATMENT OF SEEDS ENSURING THE PROLONGED ACTION

© S.P. Chetverikov¹, R.K. Bikkuzina², D.V. Chetverikova¹

¹ Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

² Ufa State Petroleum Technological University, 1, ulitsa Kosmonavtov, 450062, Ufa, Russian Federation

Increasing the plants' germination and their resistance to diseases is an important problem for the agriculture development, which is solved by the use of biological preparations based on living cultures of microorganisms for the seeds' treatment. The need for determination of the period after treatment during which viable active microbe cells of biological preparations remain on the seeds surface due to the fact that only a sufficiently high titer of cells on the grain before sowing can in future guarantee good survival of the introduced microbe in the rhizosphere. The aim of this work was to assess the dynamic impact of joint presowing treatment of seeds by biopolymer and biopreparation' on the survival and viability of their microorganisms. It is shown that the presowing treatment of wheat and barley seeds by biological products "Elena" (based on a strain of rhizosphere bacteria *Pseudomonas aureofaciens* IB 51) and "Azolen" (based on a strain of free-living nitrogen-fixing soil bacteria *Azotobacter vinelandii* IB 4), providing protection of agricultural plants against phytopathogens and increase the yield, in combination with biopolymers – exopolysaccharides "Azopol" (producer of *Azotobacter vinelandii* IB 1) and "739" (producer of *Paenibacillus ehimensis* IB 739) was more convenient and has a higher consumer properties in comparison of previously used biological products. The use of adhesives based on bacterial exopolysaccharides solutions as an alternative to chemical polysaccharide helps to increase the period of bacteria viability on the seeds surface. Such a positive effect is due to the protective action exerted by the biopolymer solution, thereby blocking the drying and death of bacterial cells. This biopolymer treatment with prolonged action has a positive impact on the survival and viability of microorganisms of biological products and the preservation of their biological activity. The titer of microorganisms of biological preparations "Elena" and "Azolen" on seeds during their storage within 9 months decreases no more than 30% with practically 100% preservation of biological activity, which consists in inhibiting the growth of phytopathogenic fungi.

Key words: biopolymer, biological product, seed treatment.