

Н.Н. Терещенко, А.Б. Бубина, Л.Н. Сысоева,
Т.И. Бурмистрова, Н.М. Трунова

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ОКСИГУМАТА ТОРФА И БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ *PSEUDOMONAS SP.* ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОПРЕПАРАТА СИСТЕМНОГО ДЕЙСТВИЯ

Аннотация. Исследование эффективности совместного применения оксигумата торфа и бактериальной культуры *Pseudomonas sp.* шт. В-6798 показало наличие выраженного синергического эффекта по отношению к показателям вегетативного роста пшеницы и огурца, а также фунгистатического воздействия на *Bipolaris sorokiniana* и снижение уровня зараженности семян пшеницы возбудителями корневых гнилей.

Ключевые слова: торфяные препараты, оксигумат, *Pseudomonas sp.* В-6798, *Bipolaris sorokiniana*, бактериальный препарат, ростостимулирующая и фунгистатическая активность.

Одна из наиболее актуальных задач современной аграрной науки – поиск эффективных и экологически безопасных средств защиты растений от болезней. По данным мировой статистики, ежегодно около 40% урожая теряется по причине высокой заболеваемости сельскохозяйственных растений, причем половина болезней вызвана возбудителями корневых гнилей [1]. Среди применяемых в настоящее время фунгицидов наибольший интерес представляют системные препараты на основе химических и биологических средств защиты растений, в частности продукты физико-химической переработки торфа и биопрепараты, созданные на основе моно- или поликультур бактерий рода *Pseudomonas*, обладающих ярко выраженным ростостимулирующим эффектом и супрессивным действием по отношению к широкому спектру патогенных грибов [2–4]. Согласно данным ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (г. Пушкин), биопрепараты способствуют существенному повышению продуктивности практически всех культур: зерновых, технических и овощных. При этом прибавка урожая зерновых составляет в среднем 15–20%, а овощных – не менее 20–30%. Кроме того, применение микробных препаратов положительно влияет и на качество продукции, повышая содержание протеина у зерновых культур, крахмала у картофеля, сахаров и витаминов у овощных [5].

Бактерицидные свойства верхового торфа в настоящее время широко известны: установлено, что различные варианты гуматов, оксигуматов и гидрогуматов, полученные путем физико-химической обработки торфа, обладают хорошо выраженными ростостимулирующими свойствами и устойчивым фунгистатическим эффектом [6–7]. Основными действующими веществами, определяющими уровень биологической активности таких препаратов, являются, по-видимому, сложные гуминовые комплексы. Установлено, что мо-

дифицированные гуминовые кислоты торфяных препаратов, как правило, значительно более активны, чем гуминовые кислоты исходного торфа [8–9].

Для защиты растений, на наш взгляд, наиболее перспективным является совместное использование торфяных и бактериальных препаратов, обеспечивающее комплексное, системное воздействие на растение, оказывающее одновременно выраженный ростостимулирующий и фунгистатический эффект.

В соответствии с этим основной целью наших исследований стала проверка эффективности совместного применения оксигумата торфа и бактериальной культуры рода *Pseudomonas* по отношению к семенам пшеницы и рассаде огурцов в сравнении с отдельной обработкой. Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

1) исследовать эффективность комплексного ростостимулирующего влияния оксигумата торфа и бактериальной культуры *Pseudomonas* sp. на семена зерновых и овощных культур;

2) исследовать эффективность комплексного воздействия оксигумата торфа и бактериальной культуры *Pseudomonas* sp. на гриб *Bipolaris sorokiniana*;

3) изучить эффективность воздействия совместной обработки семян пшеницы оксигуматом и бактериальной культурой *Pseudomonas* sp. на уровень зараженности семян пшеницы грибными инфекциями;

4) изучить влияние наиболее эффективных концентраций оксигумата на жизнеспособность бактерий *Pseudomonas* sp. для определения возможности создания комплексного биопрепарата системного действия.

Объекты и методы исследований

В экспериментах использовались оксигумат верхового пушицевого торфа и бактериальная культура *Pseudomonas* sp. штамм В-6798. Торфяной препарат (оксигумат) был разработан и предоставлен для эксперимента лабораторией физико-химических исследований торфа Сибирского НИИ сельского хозяйства и торфа СО Россельхозакадемии. Бактерии *Pseudomonas* sp. В-6798 были выделены в чистую культуру из активного ила очистных сооружений ТНХК и предоставлены лабораторией биокинетики и биотехнологии НИИ ББ ТГУ [10]. Фунгистатическую активность препаратов исследовали на чистой культуре гриба *Bipolaris sorokiniana*, выделенного с пораженных семян пшеницы. Ростостимулирующие свойства препаратов изучали на семенах пшеницы сорта Тулунская-12 и огурца сорта Кустовой.

Для определения ростостимулирующего эффекта от комплексного применения торфяного и бактериального препаратов был поставлен биотест на семенах пшеницы и вегетационный опыт с культурой огурца. В биотесте с пшеницей обработанные 0,05%-ным раствором перманганата калия и промытые дистиллированной водой семена пшеницы в течение 5 мин замачивали в следующих растворах:

- жидкая культура бактерий *Pseudomonas* sp. с титром 10^6 клеток/мл;
- 0,05%-ный раствор оксигумата по содержанию гуминовых кислот (ОГ(0,05%));
- 0,075%-ный раствор оксигумата (ОГ(0,075%));

- 0,05%-ный раствор оксигумата + бактерии *Pseudomonas* sp. штамм В-6798 (10^6 клеток/мл);
- 0,075%-ный раствор оксигумата + бактерии *Pseudomonas* sp. штамм В-6798 (10^6 клеток/мл).

В качестве контроля использовали семена, замоченные в дистиллированной воде. По истечении времени воздействия исследуемых растворов семена пшеницы помещали во влажные камеры, по 25 шт. в каждую. Ростостимулирующее воздействие препаратов определялось по прибавке сухого веса корней и зеленой массы пшеницы на 7-е сут биотеста по отношению к аналогичным показателям в контроле.

В вегетационном опыте с культурой огурца семена перед высевом в грунт предварительно обрабатывали 0,05%-ным раствором перманганата калия, а затем в течение 5 мин замачивали в следующих растворах оксигумата и бактериальной суспензии с разным титром клеток:

- жидкая культура бактерий *Pseudomonas* sp. (10^8 клеток/мл);
- жидкая культура бактерий *Pseudomonas* sp. (10^6 клеток/мл);
- 0,075 %-ный раствор оксигумата;
- 0,075 %-ный раствор оксигумата + жидкая культура бактерий *Pseudomonas* sp. (10^6 клеток/мл).

В качестве контроля использовали замачивание семян в дистиллированной воде.

В соответствии со второй задачей исследования – определением эффективности комплексного фунгистатического воздействия оксигумата торфа и бактериальной культуры *Pseudomonas* sp. – был поставлен биотест с чистой культурой гриба *Bipolaris sorokiniana*. Тест проводили в чашках Петри на комплексной питательной среде КГА : МПА = 1 : 1 (картофельно-глюкозный агар : мясопептонный агар) [11]. В питательную среду после отдельной стерилизации добавляли расчетное количество оксигумата, обеспечивающего его 0,05-ную и 0,075%-ную по ГК концентрацию в среде. Застывшую питательную среду из серии рабочих разведений засеивали бактериальной культурой *Pseudomonas* sp. В-6798. На 3-и сутки после появления колоний бактерий в центр чашки Петри помещали агаровый блок гриба *Bipolaris sorokiniana*. Для биотеста использовали чашки с плотностью бактериальной культуры, соответствующей 20–30 колониям на чашке. О степени фунгистатического влияния препаратов судили по подавлению скорости роста гриба по сравнению с контролем – показателями роста гриба на чистой питательной среде без добавления оксигумата и бактерий *Pseudomonas* sp.

В соответствии с третьей задачей для изучения влияния совместной обработки семян пшеницы оксигуматом и бактериальной культурой на уровень зараженности семян грибными инфекциями был поставлен биотест, согласно которому семена пшеницы на 5 мин замачивали последовательно в различных концентрациях оксигумата (ОГ (0,01%)), ОГ (0,1%)) и в суспензии бактерий *Pseudomonas* sp. с титром 10^6 клеток/мл. Далее семена проращивали во влажной камере при температуре +20...+22°C в течение 7 сут. Семена с признаками грибного поражения микроскопировали для идентификации агента поражения.

Для оценки возможности создания комплексного промышленного биопрепарата, совмещающего полезные свойства оксигумата и бактерий *Pseu-*

domonas sp., был проведен микробиологический тест, в котором исследовали динамику численности бактерий, культивируемых в течение 2 сут на жидкой питательной среде МПБ (мясопептонный бульон) с добавлением оксигумата. В питательную среду предварительно добавляли расчетное количество торфяного препарата, обеспечивающее 0,075%-ную концентрацию гуминовых кислот. Численность бактерий анализировали методом предельных разведений и высевов на МПА через определенные промежутки времени культивирования.

Результаты исследований

Результаты биотеста на семенах пшеницы показали, что раздельная обработка семян бактериальным препаратом в большей степени повлияла на увеличение зеленой массы пшеницы и обеспечила 8%-ную прибавку по отношению к контролю. Воздействие торфяного препарата оказалось не столь однозначным. Так, например, применение оксигумата в 0,05%-ной концентрации более заметное влияние оказало на зеленую массу, тогда как обработка 0,075%-ным оксигуматом, напротив, в большей степени простимулировала рост корней проростков (табл. 1).

Наиболее эффективной оказалась совместная обработка семян пшеницы торфяным и бактериальным препаратами: максимальные прибавки зеленой массы и корней проростков были получены именно в вариантах с совместной обработкой: оксигумат (0,075%) + бактерии *Pseudomonas* sp.; оксигумат (0,05%) + бактерии *Pseudomonas* sp.

Совместная обработка семян пшеницы оксигуматом и бактериальной культурой обеспечила усиление взаимного влияния обоих препаратов, т.е. эффект синергизма, при котором влияние от комплексного применения препаратов оказалось значительно выше таковых каждого препарата в отдельности (табл. 1).

Результаты биотеста с пшеницей позволяют сделать вывод о целесообразности и перспективности совместного применения оксигумата из пушицевого торфа и препарата на основе культуры бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 для предпосевной обработки пшеницы.

Результаты вегетационного опыта с рассадой огурца также показали высокую эффективность совместной обработки семян торфяным и бактериальными препаратами. Фенологические наблюдения за состоянием рассады показали, что устойчивый и максимальный по опыту положительный эффект от совместной обработки препаратами стал проявляться начиная с 22-х сут опыта на стадии 3-го настоящего листа. На протяжении всего последующего периода наблюдений наиболее заметный эффект совместной обработки семян всегда проявлялся на самом молодом листе (табл. 2).

Приведенные в табл. 3 показатели роста растений огурца свидетельствуют о том, что раздельная обработка семян как оксигуматом, так и бактериальными суспензиями оказала положительное влияние не только на параметры вегетативного роста растений (вес зеленой массы и длина стеблей), но и на формирование завязей. Примечательно, что и оксигумат, и бактериальные суспензии в случае их раздельного применения сколько-либо заметного положительного воздействия на развитие корней (как на длину, так и на массу) не оказали.

Т а б л и ц а 1

Эффективность совместной и раздельной обработки семян пшеницы оксигумматом и бактериальной культурой *Pseudomonas* sp. B-6798 (10⁶ клеток/мл)

Варианты опыта	Зеленая масса			Корни	
	Масса проростков, г	Прибавка к контролю, %		Масса проростков, г	Прибавка к контролю, %
Контроль (H ₂ O)	4,078 ± 0,38	0		4,707 ± 0,22	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	4,418 ± 0,23	8,33		4,934 ± 0,08	4,82
ОГ (0,075%)	4,251 ± 0,43	4,24		5,206 ± 0,29	10,6
ОГ(0,075%) + <i>Pseudomonas</i> sp.	5,479 ± 0,26	34,35		6,112 ± 0,34	31,97
ОГ (0,05%)	4,447 ± 0,17	9,04		4,783 ± 0,24	1,61
ОГ (0,05%) + <i>Pseudomonas</i> sp.	5,609 ± 0,39	37,54		5,561 ± 0,35	18,14

Т а б л и ц а 2

Результаты фенологических наблюдений в вегетационном опыте с огурцом

Срок, сут	Вариант опыта	Кол-во листьев	Прибавка длины листа к контролю, %						Прибавка ширины листа к контролю, %					
			2-й лист	3-й лист	4-й лист	5-й лист	6-й лист	1-й лист	2-й лист	3-й лист	4-й лист	5-й лист		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
22	Контроль (H ₂ O)	4	100	100				100	100					
	<i>Ps.</i> sp. (10 ⁶)*	4	101	117				95	152					
	<i>Ps.</i> sp. (10 ⁸)**	4	92	98				90	139					
	ОГ (0,075%)***	4	76	130				83	151					
	ОГ (0,075%) + <i>Ps.</i> sp. (10 ⁶)*	4	120	156				125	182					
27	Контроль (H ₂ O)	4	100	100	100			100	100	100				
	<i>Ps.</i> sp. (10 ⁶)*	4	102	101				99	115					

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	<i>Ps. sp.</i> (10^8)**	4	120	52				125	120			
	ОГ ($0,075\%$)	4	98	67				101	74			
	ОГ($0,075\%$) + <i>Ps. sp.</i> (10^6)*	5	115	125	170			123	179	156		
33	Контроль (H ₂ O)	5	100	100	100	100		100	100	100	100	
	<i>Ps. sp.</i> (10^6)*	6	92	90	87	112		89	90	123	142	
	<i>Ps. sp.</i> (10^8)**	5	105	109	94	73		113	115	102	89	
	ОГ ($0,075\%$)	6	101	92	83	94		114	98	86	122	
	ОГ($0,075\%$) + <i>Ps. sp.</i> (10^6)*	7	113	114	154	144		113	115	62	73	
45	Контроль (H ₂ O)	6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	<i>Ps. sp.</i> (10^6)*	7	92	87	83	80	135	72	88	91	142	167
	<i>Ps. sp.</i> (10^8)**	6	86	126	111	163	103	109	117	116	192	130
	ОГ ($0,075\%$)	7	64	97	105	126	96	80	109	121	142	130
	ОГ($0,075\%$) + <i>Ps. sp.</i> (10^6)*	8	103	123	112	167	326	137	125	95	191	484
НСР ₀₅ ***		1,7	12,4	10,7	8,5	21,1	19,8	22,6	16,9	17,0	20,4	19,5

* *Ps. sp.* (10^6) – суспензия бактериальной культуры *Pseudomonas sp.* с титром 10^6 клеток/мл; ** *Ps. sp.* (10^8) – суспензия бактериальной культуры *Pseudomonas sp.* с титром 10^8 клеток/мл; *** НСР₀₅ – наименьшая существенная разница с контролем при $p < 0,5$.

Таблица 3

**Влияние совместной и отдельной обработки семян огурца оксигуматом
и бактериальной культурой *Pseudomonas* sp. В-6798
на рост и развитие рассады огурца, %**

Вариант опыта	Прибавка кол-ва завязей	Прибавка кол-ва листьев	Прибавка длины стеблей	Прибавка длины корней	Прибавка зеленой массы	Прибавка массы корней
<i>Pseudomonas</i> sp. (10^6 клеток/мл)	26,1±1,5	1,6±0,01	0	0	8±1,2	0
<i>Pseudomonas</i> sp. (10^8 клеток/мл)	0	0	0	0	0	0
ОГ (0,075%)	12,5±0,6	0	10,5±2,7	0	6,6±0,8	0
ОГ (0,075%) + <i>Pseudomonas</i> sp. (10^6 клеток/мл)	63,6±2,3	49,2±1,3	119,0±3,5	15,02±1,6	154,0±2,7	72,0±3,6

Как и в опытах с пшеницей, наиболее заметное положительное влияние на рассаду огурца оказала совместная обработка семян оксигуматом и бактериальной суспензией *Pseudomonas* sp. с титром 10^6 клеток/мл, обеспечив максимальные прибавки всех определяемых показателей. Зеленая масса и вес корней увеличились соответственно на 154 и 72%, количество завязей и листьев – на 63,6 и 49,2%, а длина стебля и корней – на 119 и 15% по отношению к контролю (см. табл. 3). Поскольку суммарный эффект совместной обработки семян огурца торфяным и бактериальным препаратами был выше суммы эффектов их отдельного применения, можно сделать вывод о проявлении синергического эффекта в результате комплексного применения обоих препаратов, что полностью соответствует данным, ранее полученным для пшеницы.

Согласно результатам теста с чистой культурой фитопатогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* бактериальная культура *Pseudomonas* sp. обеспечила 67%-ное подавление радиального роста гриба по отношению к контролю (табл. 4). Оксигумат, примененный в концентрации 0,075% по ГК, обеспечил также довольно сильное (69%-ное) подавление скорости роста гриба, тогда как оксигумат в 0,05%-ной концентрации оказал значительно менее выраженное влияние на рост гриба *Bipolaris sorokiniana*. В данном варианте скорость роста гриба была всего на 11% ниже, чем в контроле. При этом максимальное подавление этого показателя было отмечено в варианте с совместным применением 0,075%-го торфяного препарата и культуры *Pseudomonas* sp., которое превысило контрольные показатели на 76%, что свидетельствует о целесообразности совместного применения оксигумата и бактериальной культуры *Pseudomonas* sp. В-6798 для подавления корневых гнилей, в частности гельминтоспориоза.

Таблица 4

Эффективность комплексного влияния оксигумата и бактериальной культуры *Pseudomonas* sp. В-6798 (10^6 клеток/мл) на скорость роста гриба *Bipolaris sorokiniana*

Вариант	Скорость роста гриба, мм/ч	Подавление скорости роста гриба, %
Контроль	0,0329±0,015	—
<i>Pseudomonas</i> sp.	0,0107±0,017	67,5
ОГ (0,075%)	0,0100±0,023	69,5
ОГ (0,075%) + <i>Pseudomonas</i> sp.	0,0076±0,027	76,9
ОГ (0,05%)	0,0291±0,011	11,5
ОГ (0,05%) + <i>Pseudomonas</i> sp.	0,0159±0,018	51,7

Результаты биотеста по изучению влияния совместной обработки семян пшеницы торфяным и бактериальным препаратами на уровень зараженности семян грибными инфекциями представлены в табл. 5. Используемые в биотесте семена в целом отличались невысоким уровнем зараженности, который не превышал 8,5%. Возможно, по этой причине обработка семян чистым бактериальным препаратом не оказала выраженного положительного влияния на уровень зараженности по сравнению с контролем. Обработка семян в чистом 0,1%-ном оксигумате обеспечила 40%-ное снижение степени их инфицирования (см. табл. 5).

Таблица 5

Эффективность совместного применения оксигумата и бактериальной культуры *Pseudomonas* sp. В-6798 (10^6 клеток/мл) для снижения зараженности семян пшеницы, %

Вариант	Зараженность семян	Фунгистатический эффект
Контроль	8,5	—
<i>Pseudomonas</i> sp.	6,5	+23,0
ОГ (0,1%)	5,1	+40,0
ОГ (0,1%) + <i>Pseudomonas</i> sp.	0	+100
ОГ (0,01%)	16,5	–94,1
ОГ (0,01%) + <i>Pseudomonas</i> sp.	8,3	+2,3

Наилучшие результаты были получены в варианте совместной обработки семян 0,1%-ным оксигуматом и бактериальным препаратом (фунгистатический эффект 100%).

Обращает на себя внимание тот факт, что в результате обработки семян пшеницы 0,01%-ным оксигуматом уровень зараженности увеличился почти в 2 раза. Возможно, это связано с тем, что при разбавлении оксигумата концентрация веществ, обладающих фунгицидными свойствами, опускается ниже пороговых значений чувствительности гриба, но при этом гриб может использовать некоторые составляющие оксигумата в качестве дополнительного источника питания или физиологически активных веществ, стимулирующих его рост. Обработка семян культурой бактерий *Pseudomonas*

сп. совместно с 0,01%-ным оксигуматом не оказала заметного влияния на зараженность семян.

Возможность создания комплексного промышленного биопрепарата, содержащего полезные свойства оксигумата и *Pseudomonas* sp., оценивали по данным микробиологического теста, в рамках которого исследовали динамику численности бактерий, культивируемых в течение 24 ч на жидкой питательной среде М9 с добавлением оксигумата. Поскольку, согласно полученным ранее экспериментальным данным, наиболее эффективная концентрация оксигумата соответствовала 0,075% по ГК, в питательную среду добавляли расчетное количество торфяного препарата, обеспечивающее 0,075%-ную концентрацию гуминовых кислот. В качестве контроля использовали культивирование бактерий *Pseudomonas* sp. на среде М9 без оксигумата.

Результаты микробиологического теста, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что оксигумат в исследованной концентрации обладает выраженным супрессивным воздействием по отношению к бактериям *Pseudomonas* sp.

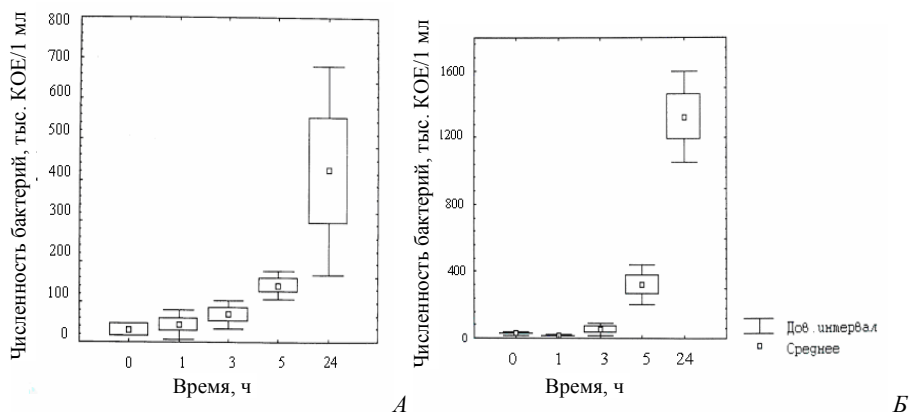


Рис. 1. Динамика численности бактерий *Pseudomonas* sp. B-6798 в жидкой питательной среде М9 с добавлением 0,075%-ного оксигумата (А) по сравнению с контролем (Б)

Рост бактерий на среде, содержащей оксигумат (0,075%), замедлен по сравнению с ростом в его отсутствие. Спустя сутки численность псевдомонад в опытной среде почти в 4 раза ниже, чем в контроле. Следовательно, для создания жидкого комплексного препарата простого добавления оксигумата в питательную среду недостаточно. Необходимо более подробно изучить и оценить эффективность различных режимов культивирования бактерий *Pseudomonas* sp. B-6798 в присутствии оксигумата. Несмотря на это, не вызывает сомнений эффективность совместной предпосевной обработки семян оксигуматом и бактериальным препаратом. При опрыскивании вегетирующих растений смешивание препаратов необходимо проводить непосредственно перед обработкой.

Литература

1. Пересыпкин В.Ф. Болезни зерновых культур. М.: Колос, 1979. 278 с.
2. Ермолаева Н.И., Иванова Н.И. и др. Биопрепараты на основе ризосферных псевдомонад // Защита растений. 1992. № 8. С. 24–25.
3. Ашмарина Л.Ф., Дашкевич В.С., Дашкевич Н.Ю. и др. Испытывается новый биопрепарат // Защита растений. 2001. № 3. С. 41.
4. Palleroni N.I. Introduction to the Family *Pseudomonaceae* // The Prokaryotes. Berlin; Heidelberg; New York: Springer – Verlag, 1981. Vol. 1. P. 655–665.
5. Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соровский журнал. 1998. № 20. С. 25–31.
6. Кухаренко Т.А. Гуминовые кислоты различных твердых горючих ископаемых и возможность их использования в качестве сырья для производства гуминовых удобрений // Гуминовые удобрения: Теория и практика их применения. Харьков: Изд-во ХГУ, 1957. С. 19–29.
7. Наумова Г.В., Сайцина Т.И. Гуминовые препараты торфа и их эффективность при сельскохозяйственном использовании // Химия твердого топлива. 1991. № 1. С. 95–100.
8. Христева Л.А. О природе действия физиологически активных форм гуминовых кислот и других стимуляторов роста растений // Гуминовые удобрения: Теория и практика их применения. Киев: Урожай, 1968. Ч. 3. С. 15–28.
9. Христева Л.А., Реутов В.А. Гуминовые удобрения: Теория и практика их применения. Днепропетровск: Колос, 1973. Ч. 4. 308 с.
10. Патент РФ 21022474. Штамм метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. ВКПМ В-6798, способный использовать формальдегид в качестве единственного источника углерода и энергии в бедной минеральной среде / Е.В. Евдокимов, М.В. Миронов, А.В. Евдокимов, И.Э. Маниенко, Е.В. Корниевская. 8 с.
11. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. М.: Колос, 1983. 295 с.