



Научная статья

УДК 579.2

DOI: 10.52957/27821900_2022_02_24

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИМИЧЕСКИХ, РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ И ВЕЩЕСТВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОУДОБРЕНИЙ

Е. А. Лейтес, Е. С. Яценко, В. А. Петухов

Елена Анатольевна Лейтес, канд. техн. наук, доцент; Елена Сергеевна Яценко, канд. биол. наук, доцент; Виктор Анатольевич Петухов, инженер
Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия, leites-elena@yandex.ru

Ключевые слова:
глицин, глюкоза,
Pseudomonas fluorescens, *Bacillus subtilis*, биоудобрения

Аннотация: Исследовано влияние глицина, глюкозы, желатина (в порошке и гранулированного), муки мясокостной, гороха и некоторых других растительных веществ на рост численности микроорганизмов *Pseudomonas fluorescens* AP-33 и *Bacillus subtilis* 26-D, применяющихся в составе биологических удобрений. Показано, что некоторые из растительных веществ, таких как зима-любка, кровохлебка, центелла азиатская, способствуют росту бактерий *Pseudomonas fluorescens*, а некоторые - крапива двудомная, крушина, толокнянка - угнетают их рост. Установлено, что наиболее эффективными добавками из изученных, влияющими на увеличение численности *Pseudomonas fluorescens* AP-33, являются химические (глицин), растительные (клетчатка гороха) и вещества животного происхождения (мука мясокостная), увеличивая рост численности в 2,5; 5,0 и 5,8 раз соответственно. Численность *Bacillus subtilis* 26-D возрастала при добавлении клетчатки гороха в 3,3 раза и муки мясокостной - в 6,7 раза.

Для цитирования:

Лейтес Е.А., Яценко Е.С., Петухов В.А. Использование химических, растительных веществ и веществ животного происхождения для разработки биоудобрений // *От химии к технологии шаг за шагом*. 2022. Т. 3, вып. 2. С. 24-29. URL: <http://chemintech.ru/index.php/tor/2022tom3no2>

Введение

С ростом численности населения все большее внимание уделяется увеличению количества продуктов питания. Истощение земель и поражение растений различными заболеваниями привело к использованию химических средств защиты растений. Введение химических средств защиты растений в сельскохозяйственную практику позволило повысить урожайность и, соответственно, увеличить выпуск продуктов питания. Мировое производство пестицидов возрастает на 11% в год и достигло порядка 5 млн т [1].

Вместе с тем их повсеместное использование привело к загрязнению химикатами почвы, грунтовых вод и воздуха практически во всех странах, что имеет не только экологические, но экономические и социальные последствия.



Некоторые пестициды содержат в своем составе тяжелые металлы: ртуть, цинк, медь. Минеральные удобрения, добываемые из горных пород, содержат примеси тяжелых металлов. Фосфорные удобрения содержат наибольшее их количество, например, в простом суперфосфате могут присутствовать свинец, кадмий, медь, цинк, хром, кобальт, никель, ванадий [2].

В суперфосфатах, а также в калийных удобрениях могут присутствовать в качестве примесей уран, стронций, радий, торий, которые, попадая в организм человека и животных с растительной пищей, приводят к внутреннему облучению.

Результатом внесения минеральных удобрений является подкисление почвы, вымывание из нее кальция, магния, марганца, цинка, меди, что может снизить устойчивость растений к различным заболеваниям.

Важнейшим фактором повышения продуктивности сельскохозяйственных растений и улучшения почвенного плодородия является научно обоснованное применение удобрений [3].

Увеличение количества вносимых минеральных удобрений с целью повышения урожайности приводит к нарушению баланса основных биогенных элементов, поражению фитопатогенами, возникновению у растений стрессовых реакций. Избыток нитратов при увеличении доз азотных удобрений приводит к накоплению их в растениях и зерне [4-6].

В последнее время в практике сельского хозяйства все больше внимания привлекают экологические способы повышения урожайности, а именно применение биоудобрений. Биоудобрения регулируют поступление загрязняющих веществ из окружающей среды, ограничивают рост фитопатогенов и увеличивают урожаи сельскохозяйственных растений. Ризосферные бактерии, находящиеся в симбиозе с растением способствуют адаптации растений к стрессу [7-10].

Целью данной работы является использование химических, растительных веществ и веществ животного происхождения для разработки биоудобрений.

Действие биопрепаратов, применяемых в сельскохозяйственной практике, еще не досконально изучено, поскольку в полевых условиях в разных климатических регионах и при внесении разных доз минеральных удобрений они могут проявлять различную эффективность [7, 8].

На рынке биологических средств защиты растений можно найти препараты на основе живых культур микроорганизмов. Разработкой новых пестицидов занимаются во всем мире, выпуская биогенные биофунгициды, биоинсектициды и росторегуляторы. Авторы [11] прогнозируют в течение следующих 5-10 лет увеличение использования биологических препаратов для замены/дополнения существующих пестицидов, а также в долгосрочной перспективе – их плотное внедрение в сельскохозяйственную практику.

В литературе встречается достаточное количество работ, посвященных использованию разных штаммов бактерий *Bacillus subtilis*.

Bacillus subtilis может растворять фосфор в почве, усиливать фиксацию азота и продуцировать сидерофоры, которые способствуют его росту и подавляют рост патогенов. *Bacillus subtilis* повышает стрессоустойчивость растений-хозяев, индуцируя



экспрессию генов реакции на стресс, фитогормонов и связанных со стрессом метаболитов [12].

В работе [13] изучалось влияние бактерий *Bacillus subtilis* 2, вносимых в почву одновременно с различными дозами азотных удобрений, на физиологическое состояние растительно-микробной системы. Показано, что при ассоциативном симбиозе с микроорганизмами возрастает адаптация растений к высоким дозам азотных удобрений. Штаммы *Bacillus subtilis* 26Д и *Bacillus subtilis* 11 ВМ проявляли ослабляющее действие на токсичные ионы кадмия. Каждый штамм проявлял себя индивидуально в зависимости от вида растений [14].

В обзоре [15] рассмотрены молекулярные механизмы регуляторных систем, их физиологическое значение во взаимовыгодном взаимодействии *Bacillus subtilis* и растений.

Штамм *Bacillus subtilis* 26D применяли после повреждения картофеля колорадским жуком. При этом отмечали быстрое восстановление темпов роста побегов, влажной и сухой массы корней растений после поражения вредителями [16].

Штаммы *Bacillus subtilis* BZR 336g и BZR 517, выделенные из природных источников, проявляющие антифунгальное действие в отношении фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *Microdochium nivale* и *Pyrenophora tritici-repentis*, а также способствующие росту и развитию растений, применяли для защиты озимой пшеницы от вредоносных болезней [17].

В последнее время появляются исследования, посвященные применению бактерии *Pseudomonas fluorescens* для защиты растений.

Pseudomonas fluorescens – обычная грамотрицательная палочковидная бактерия. *Pseudomonas fluorescens* имеет простые потребности в питании и хорошо растет в среде с минеральными солями, дополненной любым из достаточного количества источников углерода [18].

Показано, что некоторые представители *Pseudomonas fluorescens* являются потенциальными агентами биоконтроля, которые подавляют болезни растений, защищая семена и корни от грибковых инфекций [19]. Использование изолятов *Pseudomonas fluorescens* 9 и 10 может увеличить рост конских бобов и урожайность [20].

Препараты на основе *Pseudomonas fluorescens*, например, планриз и другие, разрешены к применению против болезней картофеля (фитофтороз и др.), сахарной свеклы (кагатная гниль), капусты (черная ножка), ячменя ярового (гельминтоспориозная корневая гниль) и других культур. Штамм AP-33 *Pseudomonas fluorescens* проявляет фунгистатический эффект.

Изучение условий ускоренного роста микроорганизмов *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* при добавлении в питательную среду различных веществ будет способствовать расширению ассортимента микробных биопрепаратов на российском рынке экологически безопасных средств защиты растений.

Основная часть

Для удешевления биопрепаратов важны исследования по влиянию различных веществ на рост численности микроорганизмов. Для культивирования *Pseudomonas*



fluorescens используют различные химические вещества: углеводы, аминокислоты, белки, и т.д. В представленной работе для глубинного культивирования *Pseudomonas fluorescens* AP-33 применяли питательную среду следующего состава: меласса, фосфат калия, сульфат железа (III), нитрат аммония, сульфат магния, горох шлифованный, растительный экстракт, вода. Растительное сухое сырье в количестве 10 г на 1 л каждого экстракта вносили после стерилизации в автоклаве. Значение pH выдерживали в пределах 7,5-7,6. Время стерилизации составляло 30 мин. при давлении 1,0 Bar. После автоклавирования питательную среду остужали до комнатной температуры и фильтровали. Культивирование микроорганизмов производилось при температуре (28 ± 2) °C с принудительной аэрацией со скоростью вращения 125 об/мин в шейкере-инкубаторе «Innova 44» в течение 20–24 часов. Опыты воспроизводили трижды. Численность микроорганизмов оценивали методом стандартных десятикратных разведений с высевом в стерильных условиях в чашки Петри на агаризованную среду вышеуказанного состава. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Влияние растительных экстрактов на численность *Pseudomonas fluorescens* AP-33 в процессе культивирования

№	Растительный препарат		КОЕ/мл · 10 ⁻⁸
1	Зималюбка	<i>Chimáphila umbelláta</i>	60±10
2	Кровохлебка	<i>Sanguisorba officinalis</i>	60±10
3	Крапива двудомная	<i>Urtica díblica</i>	40±10
4	Толокнянка (лист)	<i>Arctostáphylos úva-úrsi</i>	40±10
5	Крушина	<i>Frángula ál nus</i>	30±10
6	Центелла азиатская	<i>Centella asiatica</i>	60±10
7	Без добавления растительных экстрактов		50±10

Из таблицы 1 видно, что некоторые из растений, таких как зималюбка, кровохлебка, центелла азиатская, способствуют росту бактерий, а некоторые – толокнянка, крапива двудомная, крушина – угнетают их рост.

Поиск стимуляторов роста микроорганизмов привел к использованию различных химических, растительных веществ и веществ животного происхождения, добавлявшихся в среду для культивирования *Pseudomonas fluorescens* AP-33.

Для изучения влияния химических, растительных веществ и веществ животного происхождения на рост *Pseudomonas fluorescens* AP-33 применяли питательную среду следующего состава: меласса, фосфат калия, сульфат железа (III), нитрат аммония, сульфат магния, лопух, хвощ, вода до 1 л. Вещества (глицин, глюкоза и пр.) добавляли в количестве 5 г на 1 л каждого экстракта до стерилизации в автоклаве. Значение pH выдерживали в пределах 7,5-7,6. Время стерилизации составляло 30 мин при давлении 1,0 Bar. После автоклавирования питательную среду остужали до комнатной температуры и фильтровали. Культивирование микроорганизмов производилось при температуре (28 ± 2) °C с принудительной аэрацией со скоростью вращения 125 об/мин в шейкере-инкубаторе «Innova 44» в течение 20–24 часов. Опыты воспроизводили трижды. Численность микроорганизмов оценивали методом стандартных десятикратных разведений с высевом в



стерильных условиях в чашки Петри на агаризованную среду вышеуказанного состава с соответствующими добавками. Результаты влияния химических, растительных веществ и веществ животного происхождения на рост *Pseudomonas fluorescens* AP-33 представлены в таблице 2.

Для изучения влияния химических, растительных веществ и веществ животного происхождения на рост *Bacillus subtilis* 26-D применяли питательную среду того же состава, что и для *Pseudomonas fluorescens* AP-33. Вещества (глицин, глюкоза и пр.) добавляли в количестве 5 г на 1 л каждого экстракта до стерилизации в автоклаве. Применяемая методика аналогична вышеописанной для *Pseudomonas fluorescens* AP-33. Результаты влияния химических, растительных веществ и веществ животного происхождения на рост *Bacillus subtilis* 26-D также представлены в таблице 2.

Таблица 2. Влияние химических, растительных веществ и веществ животного происхождения на рост микроорганизмов *Pseudomonas fluorescens* AP-33 и *Bacillus subtilis* 26-D

Добавка в питательную среду	КОЕ/мл·10 ⁻⁶	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> AP-33	<i>Bacillus subtilis</i> 26-D
Глицин	30±5	5±1
Глюкоза	15±1	10±1
Желатин (порошок)	10±1	10±1
Желатин (гранулированный)	5±1	20±1
Горох (клетчатка)	70±10	50±10
Мука мясокостная	60±5	100±10
Контроль	12±1	15±1

Из таблицы 2 видно, что на рост *Pseudomonas fluorescens* AP-33 оказывают положительное воздействие добавки глицина, увеличивая его в 2,5 раза, муки мясокостной - в 5,0 раз и гороха (клетчатка) - в 5,8 раза. На увеличение численности *Bacillus subtilis* 26-D влияют добавки клетчатки гороха - в 3,3 раза и муки мясокостной - в 6,7 раза.

Выводы

Исследовано влияние химических, растительных веществ и веществ животного происхождения на рост микроорганизмов *Pseudomonas fluorescens* AP-33 и *Bacillus subtilis* 26-D и показано, что некоторые из растений, таких как зималюбка, кровохлебка, центелла азиатская, способствуют росту бактерий, а некоторые – крапива двудомная, крушина, толокнянка – угнетают их рост.

Установлено, что наиболее эффективными добавками из изученных, влияющими на увеличение численности *Pseudomonas fluorescens* AP-33, являются химические (глицин), растительные (клетчатка гороха) и вещества животного происхождения (мука мясокостная). Численность *Bacillus subtilis* 26-D возрастала при добавлении веществ растительного и животного происхождения – муки мясокостной и клетчатки гороха.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Алтайского государственного университета, проект № 16/22 –ВГ.



Список источников

1. **Carvalho F.P.** Pesticides, environment, and food safety // *Food and Energy Security*. 2017. Vol. 6, no. 2. P. 48–60.
2. **Белоус Н.М., Шаповалов В.Ф., Моисеенко Ф.В., Драганская М.Г.** Влияние различных систем удобрения на накопление тяжелых металлов в сельскохозяйственной продукции // *Вестник Брянской государственной сельскохозяйственной академии*. Брянск, 2006. С. 22-29.
3. **Сычев В.Г.** Динамика изменения, пути воспроизводства и совершенствование методов оценки плодородия почв Европейской части России: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. Курск, 2000. 48 с.
4. **Кудеяров В.Н.** Цикл азота в почве и эффективность удобрений. М.: Наука, 1989. 216 с.
5. **Хитров Н.Б., Молчанов Э.Н., Назарова Л.Ф.** Методическое обеспечение мониторинга земель сельскохозяйственного назначения // *Почвоведение*. 2010. № 5. С. 634–636.
6. **Baset Mia M.A., Shamsuddin Z.H., Wahab Z., Marziah M.** The effect of rhizobacterial inoculation on growth and nutrient accumulation of tissue-cultured banana plantlets under low N-fertilizer regime // *African J. of Biotechnology*. 2009. V. 8 (21). P. 5855–5866.
7. **Завалин А.А.** Биопрепараты, удобрения и урожай. М.: Изд-во ВНИИА, 2005. 302 с.
8. **Кожемяков А.П., Белоброва С.Н., Орлова А.Г.** Создание и анализ базы данных по эффективности микробных препаратов комплексного действия // *Сельскохозяйственная биология*. 2011. № 3. С. 112–115.
9. **Тихонович И.А., Завалин А.А., Благовещенская Г.Г., Кожемяков А.П.** Использование биопрепаратов – дополнительный источник элементов питания растений // *Плодородие*. 2011. № 3. С. 9–13.
10. **Цыганова Е.Н., Звягинцев Д.Г., Лысак Л.В., Степанов А.А.** Действие бактериально-гумусового препарата на биологическую активность почв // *Почвоведение*. 2013. № 7. С. 867–871.
11. **Максимова Н.В., Феклистова И.Н., Лысак В.В., Гринева И.А.** Бактерии на страже урожая // *Наука и инновации*. 2019. №3 (193). С. 12-16.
12. **Hashem A, Tabassum B, Fathi Abd Allah E.** Bacillus subtilis: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress // *Saudi J Biol Sci*. 2019. No. 6. P. 1291-1297. DOI: 10.1016/j.sjbs.2019.05.004.
13. **Пищик В.Н., Воробьев Н.И., Моисеев К.Г., Свиридова О.В., Сурин В.Г.** Влияние бактерий *Bacillus subtilis* на физиологическое состояние растений пшеницы и микробиоценоз почвы при использовании различных доз азотных удобрений // *Почвоведение*. 2015, № 1. С. 87–94.
14. **Курамшина З.М., Смирнова Ю.В., Хайруллин Р.М.** Влияние эндофитных штаммов бактерий *Bacillus subtilis* на рост сельскохозяйственных культур при Cd-стрессе // *Вестник Башкирского университета*. 2013. Т. 18, № 1. С. 73-76.
15. **Kazutake Hirooka** Transcriptional response machineries of Bacillus subtilis conducive to plant growth promotion, Bioscience // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014. Vol. 78, iss. 9. P. 1471-1484. DOI:10.1080/09168451.2014.943689.
16. **Sorokan A., Veselova S., Benkovskaya G., Maksimov I.** Endophytic Strain Bacillus subtilis 26D Increases Levels of Phytohormones and Repairs Growth of Potato Plants after Colorado Potato Beetle Damage // *Plants (Basel)*. 2021. Vol. 10 (5). 923. DOI:10.3390/plants10050923
17. **Асатурова А.М., Сидорова Т.М., Томашевич Н.С., Жевнова Н.А., Хомяк А.И., Козицын А.Е., Дубяга В.М., Павлова М.Д., Сидоров Н.М., Аллахвердян В.В.** Изучение антагонистических и ростстимулирующих свойств штаммов Bacillus subtilis, перспективных для создания эффективных биофунгицидов // *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. 2020. Т. 21, № 3. С. 263-272.
18. **Palleroni N.J.** The Pseudomonas story. *Environment microbiology*. 2010. Vol. 12(6). P. 1377–1383.
19. **Girija Ganeshan, A. Manoj Kumar.** **Pseudomonas fluorescens, a potential bacterial antagonist to control plant diseases** // *Journal of Plant Interactions*. 2005. Vol. 1, iss. 3. P. 123-134.
20. **Fekadu Alemu, Tesfaye Alemu.** Pseudomonas fluorescens Isolates Used as a Plant Growth Promoter of Faba Bean (Vicia faba) in Vitro as Well as in Vivo Study in Ethiopia // *American Journal of Life Sciences*. 2015. Vol. 3(2). P. 100-108. DOI: 10.11648/j.ajls.20150302.17

Поступила в редакцию 09.06.2022

Одобрена после рецензирования 17.06.2022

Принята к опубликованию 17.06.2022