

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГНПО «Химический синтез и биотехнологии»
Институт микробиологии
БЕЛОРУССКИЙ РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ФОНД
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
БЕЛОРУССКОЕ ОБЩЕСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ
МИКРОБИОЛОГОВ

МИКРОБНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

Сборник научных трудов

*Основан в 2007 году
Том 7*

Минск
«Беларуская навука»
2015

В сборнике представлены обзорные и экспериментальные статьи в области микробного синтеза биологически активных соединений, в том числе с использованием генно-инженерных биокатализаторов. Рассмотрены вопросы создания новых импортозамещающих микробных технологий для медицины, сельского хозяйства, промышленности, охраны окружающей среды и некоторые аспекты их применения.

Сборник представляет интерес для микробиологов, биотехнологов, химиков, работников промышленности и агропромышленного комплекса, а также для студентов средних и высших учебных заведений соответствующих профилей.

Редакционная коллегия:

- член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук
Э. И. Коломиец (главный редактор),
академик НАН Беларуси, доктор биологических наук,
профессор *А. Г. Лобанок* (заместитель главного редактора),
член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук,
профессор *А. И. Зинченко*,
член-корреспондент НАН Беларуси, доктор сельскохозяйственных наук,
профессор *В. М. Галушко*,
член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор *И. Б. Ившина*,
доктор биологических наук, профессор *Р. В. Михайлова*,
доктор биологических наук, профессор *Н. П. Максимова*,
доктор биологических наук, профессор *М. А. Титок*,
доктор сельскохозяйственных наук, профессор *В. И. Беззубов*,
доктор сельскохозяйственных наук, профессор *М. А. Кадыров*,
доктор химических наук, профессор *П. А. Киселев*,
доктор химических наук, профессор *М. А. Кисель*,
доктор биологических наук *А. А. Леонтьевский*,
доктор биологических наук, профессор *И. А. Архипченко*,
доктор биологических наук *З. М. Алещенкова*,
доктор биологических наук *А. Н. Капич*,
доктор биологических наук *А. С. Самсонова*,
кандидат биологических наук *Н. А. Головнева*,
кандидат биологических наук *Г. И. Новик*,
кандидат биологических наук *Т. В. Романовская*,
кандидат биологических наук *Л. И. Стефанович*

Рецензенты:

- академик НАН Беларуси, доктор биологических наук, профессор *А. Г. Лобанок*,
член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор *И. Б. Ившина*,
член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, профессор *А. И. Зинченко*,
член-корреспондент НАН Беларуси, доктор сельскохозяйственных наук,
профессор *В. М. Голушко*,
доктор биологических наук, профессор *Р. В. Михайлова*,
доктор биологических наук, профессор *И. А. Архипченко*

Г. В. САФРОНОВА¹, И. М. ГАРАНОВИЧ², З. М. АЛЕЩЕНКОВА¹

ВЛИЯНИЕ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ДЕКОРАТИВНЫХ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

¹*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
microbio@mbio.bas-net.by*

²*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
bel.dendr@gmail.com*

Установлено, что микробные препараты «Гордебак» и «Бактопин» положительно влияют на рост и развитие саженцев декоративных древесных растений: препарат биологический «Гордебак» – спиреи японской и форзиции европейской, препарат микробный «Бактопин» – туи западной и можжевельника казацкого. Исследованы два технологических приема использования микробных препаратов: замачивание корневых систем укорененных черенков декоративных древесных растений перед посадкой на доращивание в 2–2,5%-ном растворе препаратов и полив высаженных в субстрат укорененных черенков. Показана эффективность обоих применяемых технологических приемов и возможность использования микробных препаратов не только по прямому назначению, но и для выращивания декоративных древесных растений: «Гордебак» – спиреи японской и форзиции европейской, «Бактопин» – туи западной и можжевельника казацкого.

Введение. В современном питомниководстве все большее внимание уделяется качеству посадочного материала, технологиям ускоренного выращивания саженцев. В связи с этим особое значение приобретают микробные препараты как экологически безопасные. Их действие обусловлено активизацией процессов усвоения элементов питания, повышением количества полезных микроорганизмов в почве и др.

Биопрепараты, применяемые в настоящее время в растениеводстве, различаются по составу и функциональной направленности. Монобактериальные препараты, как правило, создаются на основе одного микроорганизма, обладающего полезным свойством. Действие же полибактериальных микробных препаратов многогранно:

они улучшают минеральное питание растений за счет увеличения плотности популяций микроорганизмов агрономически ценных групп и активизации протекания процессов микробиологической трансформации биогенных элементов в почве и ризосфере растений;

повышают биологическую фиксацию азота и трансформируют нерастворимые почвенные фосфаты, так как в качестве основы микробных препаратов при их создании отбираются конкурентоспособные наиболее эффективные штаммы ризосферных микроорганизмов с высокой азотфиксирующей и фосфатмобилизующей активностью;

участвуют в образовании гумуса и восстанавливают структуру почвы, поскольку в состав микробных препаратов входят живые клетки микроорганизмов и их метаболиты, обеспечивающие склеивание почвенных частиц в агрегаты;

выделяют биологически активные вещества, стимулирующие рост растений, повышающие их стрессоустойчивость и иммунитет;

оказывают оздоравливающий эффект на почвы, сдерживая рост фитопатогенов и увеличивая в ней число микроорганизмов-антагонистов;

изменяют структуру урожая и качество продукции, обеспечивая получение дополнительного урожая экологически чистой продукции.

Цель исследования – изучение влияния препарата биологического «Гордебак» на рост и развитие спиреи японской и форзиции европейской, препарата микробного «Бактопин» – туи западной и можжевельника казацкого.

Материалы и методы.

Микробиологические объекты: созданные в Институте микробиологии НАН Беларуси препарат биологический «Гордебак» [1] и препарат микробный «Бактопин» [2].

Растительные объекты: спирея японская, форзиция европейская, туя западная, можжевельник казацкий.

Методы исследований. Нитрогеназную активность чистых культур и азотфиксирующую активность в ассоциации с растением определяли ацетиленовым методом на газовом хроматографе

Хром-4, модернизированном аппаратно-программным комплексом UniChrom 4.x-5 [3]. Фосфатмобилизующую активность – чашечным методом по зонам растворения фосфатов вокруг колоний этих микроорганизмов по руководству [4].

Продуцирование индолуксусной кислоты (ИУК) определяли колориметрическим методом [5].

Антагонистическую активность штамма *Enterobacter sp.* В-402Д изучали на агаризованной сусловой среде методом лунок [6].

ДНК штаммов выделяли СТАВ-методом с небольшими модификациями [7]. Для амплификации фрагмента гена *nifH* использовали пару праймеров F1 и R6, кодирующую фрагмент гена размером 450 п. о. [8]. ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 1х буфер для Таг-полимеразы («Праймтех»), 0,2 ммоль каждого из дНТФ («Праймтех»), по 2,5 ммоль $MgCl_2$, по 0,7 пмоль каждого праймера («Праймтех») и 0,5 ед. ДНК-полимеразы («Праймтех»).

Наработку препарата биологического «Гордебак» проводили в соответствии с ТУ ВУ 100289066. 046–2009, препарата микробного Бактопин – ТУ ВУ 100289066.108–2013. Качество микробных препаратов соответствовало Техническим условиям.

Технологические приемы использования микробных препаратов:

Гордебак. 1-й вариант – корневые системы укорененных черенков декоративных древесных растений перед посадкой на доращивание замачивали в 2%-ном растворе препарата в течение 12 ч; 2-й вариант – высаженные в субстрат укорененные черенки поливали 2%-ным раствором препарата.

Бактопин. Использовали 2,5%-ный раствор при той же экспозиции для обработки корневых систем декоративных растений хвойных пород и полива.

Фотографировали объекты цифровой камерой «Samsung».

Математическая обработка данных – общепринятая для биологических исследований [9]. Статистическую обработку проводили при помощи статистического пакета Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение. В последние годы во всем мире в технологии выращивания растений для восполнения азотно-

фосфорного баланса почв широко используются микробные препараты на основе азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих микроорганизмов. В Институте микробиологии НАН Беларуси при выполнении заданий ГНТП «Промышленные биотехнологии» в период с 2009 по 2015 г. созданы микробные препараты азотфиксирующе-фосфатмобилизирующего действия: препарат биологический «Гордебак» и препарат микробный «Бактопин».

Препарат биологический «Гордебак» предназначен для предпосевной обработки семян и вегетирующих растений ячменя с целью получения экологически чистого зерна и снижения доз минеральных удобрений; для обработки регенерантов березы и осины с целью ускорения адаптации и выращивания здорового посадочного материала микроклональных растений в условиях закрытого грунта. Препарат стимулирует энергию прорастания и всхожесть семян ячменя, рост и приживаемость микроклональных растений березы и осины, интенсифицирует процесс биологической фиксации азота и биологической трансформации фосфора, повышает урожайность ячменя и технологические свойства зерна [1].

Препарат биологический «Гордебак» создан на основе высокоактивных штаммов азотфиксирующих *Enterobacter sp.* В-402Д и фосфатмобилизирующих *Enterobacter sp.* В-409Д бактерий, обладающих комплексом полезных для растений свойств (табл. 1, 2). Гордебак выпускают двух марок: марка жидкий и марка торфяной. Высокая жизнеспособность энтеробактерий позволяет использовать Гордебак жидкий и торфяной по целевому назначению после их длительного хранения при пониженной температуре.

Микробный препарат «Бактопин» предназначен для предпосевной обработки семян, вегетирующих хвойных растений с целью стимуляции роста посадочного материала, повышения выхода стандартного посадочного материала и экономии минеральных удобрений. Препарат интенсифицирует процесс биологической фиксации азота и трансформации фосфора, стимулирует рост и развитие растений и улучшает их приживаемость [2].

Действующее начало препарата: азотфиксирующий *Rahnella aquatilis* БИМ В-704Д и фосфатмобилизирующий *Pseudomonas*

Таблица 1. Физиолого-биохимические свойства штаммов – основы микробных препаратов

Штамм	Нитрогеназная активность чистых культур, ммоль С ₂ Н ₄ /фл./сут	Азотфиксирующая активность в ассоциации с растением, ммоль С ₂ Н ₄ /раст./сут	Фосфатмобилизующая активность, диаметр зон растворения фосфатов кальция, мм	Продукцирование ИУК, мкг/мл
Препарат биологический «Гордебак»				
<i>Enterobacter sp.</i> В-402Д	2,3 ± 0,21	135,1 ± 3,50	10,5–12,4	19,0 ± 0,06
<i>Enterobacter sp.</i> В-409Д	–	–	16,7–18,3	15,8 ± 0,07
Препарат микробный «Бактопин»				
<i>R. aquatilis</i> БИМ В-704Д	438,0 ± 15,75	443,5 ± 21,37	10,1–10,3	157,0 ± 7,55
<i>P. putida</i> БИМ В-702Д	–	–	15,4–15,7	136,0 ± 6,71

Таблица 2. Антимикробное действие энтеробактерий-ростстимуляторов (препарат биологический «Гордебак»)

Штамм	Зоны ингибирования роста фитопатогенов, мм							
	<i>Fusarium sporotrichiella</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pseudomonas cerasi</i>	<i>Erwinia caratovora</i>
<i>Enterobacter sp.</i> В-402Д	28,3 ± 1,21	28,6 ± 1,12	12,5 ± 1,50	20,0 ± 0,75	23,0 ± 1,01	21,0 ± 2,01	24,0 ± 0,71	36,6 ± 1,23
<i>Enterobacter sp.</i> В-409Д	13,5 ± 1,34	16,0 ± 0,70	8,3 ± 0,32	16,6 ± 0,80	28,0 ± 1,22	27,3 ± 1,25	29,0 ± 1,02	22,3 ± 1,11

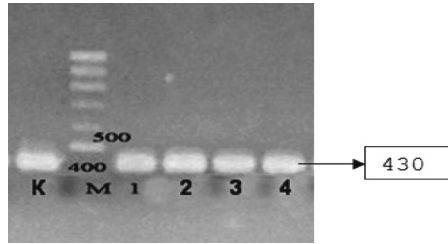


Рис. 1. Амплификация фрагмента гена *nifH* с использованием праймеров *nifH*-1F и *nifH*-1R на препарате ДНК выделенной из чистых культур: К (контроль) – *S. meliloti* 3583; М – маркер молекулярной массы ДНК (100 bp); 1 – *Pseudomonas sp.* 10; 2 – *R. aquatilis* БИМ В-704Д; 3 – *Klebsiella planticola* 5; 4 – *Enterobacter sp.* В-402Д. Стрелкой указан целевой ген

putida БИМ В-702Д бактериальные штаммы, а также арбускулярные микоризные грибы (АМГ) рода *Glomus*. Препарат микробный «Бактопин» выпускают двух марок: марка жидкий и марка торфяной.

Полезное для растений свойство компонента Гордебакка *Enterobacter sp.* В-402Д и компонента Бактопина *R. aquatilis* БИМ В-704Д – фиксация азота атмосферы. Для подтверждения азотфиксирующего потенциала *Enterobacter sp.* В-402Д и *R. aquatilis* БИМ В-704Д определяли наличие *nifH*-гена в геноме штаммов. В ходе амплификации фрагмента гена *nifH* с использованием пары праймеров F1 и R6 была выявлена одна специфическая зона амплификации размером ~430 п. о. (рис. 1), что подтверждает синтез нитрогеназы (фермента азотфиксации) данными штаммами.

С целью расширения сферы применения биопрепаратов «Гордебак» и «Бактопин» исследовали возможность их использования для обработки корневых систем и вегетирующих органов укорененных черенков декоративных древесных растений.

Общим в биотехнологии применения микробных препаратов является то, что внесение их на семена, распыление по вегетирующим растениям или непосредственно в почву необходимо проводить в пасмурную погоду, утром или вечером. Прямые солнечные лучи губительно действуют на микроорганизмы и могут снизить или полностью нивелировать их эффективность. Исследования показывают, что через 10 мин действия УФ-лучей, численность

неспоробразующих бактерий уменьшается на 80–90%. Это правило следует особенно четко соблюдать при использовании бактериальных препаратов. Помимо вышеуказанных факторов на развитие микроорганизмов влияет и температура, поэтому вносить микробные препараты в почву желательно в теплую погоду. Опрыскивание вегетирующих растений микробными препаратами должно быть мелкодисперсным, так как крупные капли легко скатываются с поверхности листьев.

Эффективность любых микробных препаратов увеличивается при одновременном использовании органических удобрений.

Материалы исследований по определению эффективности Гордебака и Бактопина на лиственных и хвойных декоративных растениях представлены в табл. 3–4 и на рис. 2–3.

Действие микробных препаратов эффективно как в варианте с замачиванием корневых систем укорененных черенков перед посадкой, так и в варианте с поливом высаженных в субстрат укорененных черенков. В опытных вариантах корневые системы длиннее. Обработанные растения имели также большую высоту. Так, при обработке спиреи японской препаратом биологическим «Гордебак» (замачивание) длина корней опытных растений превышала контроль на 28%, высота была на уровне контроля, при поливе – превышала контроль на 12 и 10% соответственно. Аналогичная тенденция наблюдалась и для форзиции европейской. Длина ее корневой системы при замачивании в препарате биологическом «Гордебак» составляла в контроле 26 см, в опыте – 28,2 см (+ 9% к контролю), высота – 14,2 и 17,6 см (+ 24% к контролю) соответственно. Полив лиственной декоративной породы Гордебаком давал прирост корневой системы 6,7 см (34%), высоты растений – 1,8 см (10%) соответственно.

Саженцы хвойных пород также положительно реагировали на обработку препаратом микробным «Бактопин». Однако при поливе как туи западной, так и можжевельника казацкого растения имели более длинную корневую систему и были выше, чем при замачивании. В опытном варианте у обоих видов развивалась более мощная и длинная корневая система и растения были выше, особенно в варианте с поливом. Так, длина их корней

Т а б л и ц а 3. Влияние препарата биологического «Горлебак» на развитие саженцев декоративных лиственных древесных растений

Вариант	Длина корневой системы, см		Высота, см		Примечание
	$\bar{X} \pm st$	t/Ст % от контроля	$\bar{X} \pm st$	t/Ст % от контроля	
Спирея японская (замачивание корней)					
Контроль	17,0 ± 0,7	100	18,2 ± 0,9	100	Корневая система более компактная, что лучше для пересадки
Опыт	21,7 ± 1,0	128	19,0 ± 0,9	104	
Форзиция европейская (замачивание корней)					
Контроль	26,0 ± 1,5	100	14,2 ± 0,6	100	Корневая система немного длиннее, но более разветвленная, мочковатая
Опыт	28,2 ± 1,6	109	17,6 ± 0,7	124	
Спирея японская (полив)					
Контроль	22,0 ± 0,9	100	26,9 ± 1,4	100	Корневая система сильно мочковатая, компактная
Опыт	24,7 ± 1,0	112	29,7 ± 1,6	110	
Форзиция европейская (полив)					
Контроль	20,0 ± 0,8	100	18,0 ± 0,8	100	Корневая система компактная, мочковатая
Опыт	26,7 ± 1,4	134	19,8 ± 0,9	110	

Т а б л и ц а 4. Влияние препарата микробного «Бактопин» на развитие саженцев хвойных пород

Вариант	Длина корневой системы, см		Высота, см		Примечание
	$\bar{X} \pm st$	tСт % от контроля	$\bar{X} \pm st$	tСт % от контроля	
Туя западная (замачивание корней)					
Контроль	17,0 ± 0,7	100	20,0 ± 0,9	100	Корневая система более длинная, сильно мочковатая, компактная
Опыт	17,5 ± 0,8	103	20,7 ± 1,0	104	
Можжевельник казацкий (замачивание корней)					
Контроль	17,0 ± 0,8	100	21,0 ± 1,1	100	Корневая система более длинная
Опыт	19,0 ± 0,9	112	25,5 ± 1,5	121	
Туя западная (полив)					
Контроль	17,0 ± 0,9	100	25,0 ± 1,4	100	Корневая система более мощная, мочковатая, развитие выше
Опыт	33,2 ± 1,8	195	37,5 ± 1,9	150	
Можжевельник казацкий (полив)					
Контроль	17,0 ± 0,9	100	25,0 ± 1,4	100	Корневая система более мощная, компактная, развитие выше
Опыт	23,2 ± 1,4	137	41,2 ± 2,3	165	

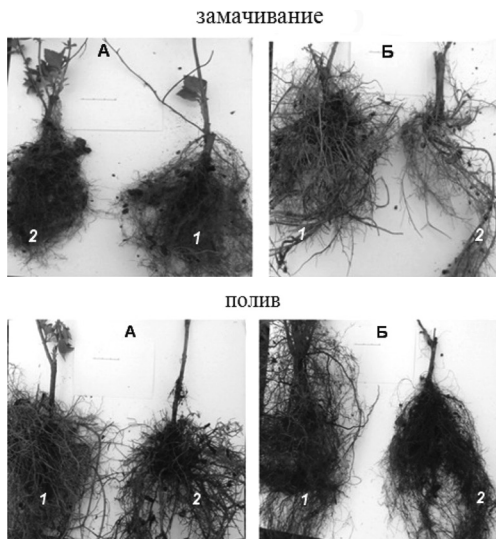


Рис. 2. Влияние препарата биологического «Гордебак» на развитие корневой системы спиреи японской (А) и форзиции европейской (Б): 1 – опыт, 2 – контроль

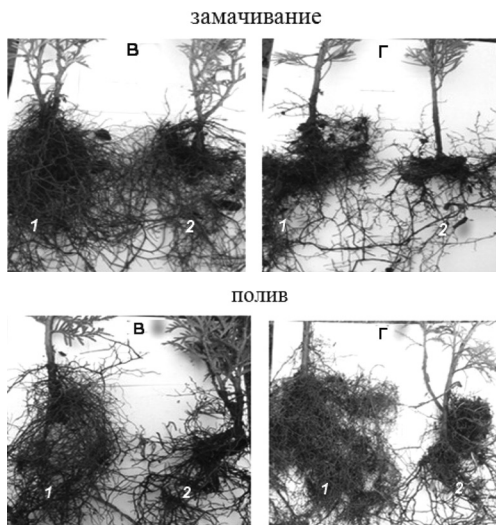


Рис. 3. Влияние препарата микробного «Бактопин» на развитие корневой системы туи западной (В) и можжевельника казацкого (Г): 1 – опыт, 2 – контроль

в опытном варианте в среднем была выше контроля на 11,2 см (66%), высота – на 14,4 см (57%). Замачивание саженцев перед посадкой в препарате микробном «Бактопин» давало прирост длины корней в среднем 1,25 см (7%), высоты растений – 2,6 см (12%).

В сравнительном плане препарат микробный «Бактопин» представляется более эффективным.

Оба препарата существенно влияли не только на длину корней и высоту саженцев, но и на качество корневой системы. Она развивалась более мощно, формировалась сильно мочковатой, что создает значительные преимущества для приживаемости, роста и развития растений и важно в дальнейшем при их пересадке.

Закключение. Приведенные данные показывают целесообразность применения препарата биологического «Гордебак» и препарата микробного «Бактопин» для стимуляции роста и развития декоративных древесных растений. Позитивный эффект от их применения в условиях *ex vitro*, вероятно, связан как с непосредственным действием микроорганизмов на растения (синтез ИУК и защита растений от фитопатогенов), так и с созданием благоприятных условий для роста саженцев в почвенных условиях (азотфиксация и фосфатмобилизация).

Литература

1. ТУ ВУ 100289066.046-2009. Препараты биологические Гордебак.
2. ТУ ВУ 100289066.108-2013. Препарат микробный Бактопин.
3. Умаров, М. М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях / М. М. Умаров // Почвоведение. – 1976. – № 11. – С. 119–123.
4. Некоторые новые методы количественного учета почвенных микроорганизмов и изучения их свойств: метод. рекоменд. / Всесоюз. науч.-исслед. ин-т с.-х. микробиол. – Л., 1987. – 53 с.
5. Libbert, E. Isolation and identification of the IAA-producing and degrading Bacteria from Pod Plants / E. Libbert // Physiologia Plantarum. – 1969. – Vol. 22. – P. 51–58.
6. Tenner, E. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М.: ООО «ДРОФА», 2004. – 256 с.

7. DNA isolation procedures / M. K. Nishiguchi [et al.] // Methods and Tools in Biosciences and Medicine. Techniques in molecular systematic and evolution / R. DeSalle (eds.) [et al.]. – Switzerland, 2002. – P. 279–280.

8. Система олигонуклеотидных праймеров для амплификации генов *nifH* различных таксономических групп прокариот / А. И. Марусина [и др.] // Микробиология. – 2001. – № 1. – С. 86–91.

9. Теория вероятностей и математическая статистика. Математические модели: учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / В. Д. Мятлев [и др.]. – М.: Изд. центр «Академия», 2009. – 320 с.

*H. V. SAFRONAVA*¹, *I. M. GARANOVICH*²,
*Z. M. ALESCHENKOVA*¹

EFFECT OF MICROBAL PREPARATIONS ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF DECORATIVE ARBOREAL CULTURES

¹*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences,
Minsk, Belarus, microbio@mbio.bas-net.by*

²*Central Botanical Garden, National Academy of Sciences,
Minsk, Belarus, bel.dendr@gmail.com*

It was found that tested microbial preparations promoted growth and development of decorative arboreal species: Gordebac stimulated *Spiraea japonica* L. and *Forsythia europaea*, while Bactopin favored *Thuja occidentalis* and *Juniperus sabina*. 2 application techniques were compared: steeping of rooted cuttings of decorative cultures in 2–2.5% working solution of biopreparations and watering of rooted grafts planted into nutrient substrate. Efficiency of both procedures was confirmed and dual-purpose application of tested biopreparations was demonstrated, including growth stimulation of decorative arboreal species – *Spiraea japonica* L. and *Forsythia europaea* by Gordebac and *Thuja occidentalis* and *Juniperus sabina* by Bactopin.

Поступила 05.05.2015 г.