

УДК 632.937: 579.64:663.15

UDC 632.937:579.64:663.15

03.00.00 Биологические науки

03.00.00 Biological sciences

**СИСТЕМНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ И
ГРИБОВ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ И
УЛУЧШЕНИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО
СОСТАВА ПОЧВ**

**SYSTEMATIC USE OF DRUGS BASED ON
BACTERIA AND FUNGI IN PLANT
PROTECTION AND IMPROVEMENT OF THE
MICROBIOLOGICAL COMPOSITION OF SOIL**

Котляров Владимир Владиславович
д. с-х. н., профессор
РИНЦ SPIN-kod=5905-0474
*Кубанский государственный
аграрный университет, Краснодар, Россия*

Kotlyarov Vladimir Vladislavovich
Dr.Sci.Agr., professor
SPIN-code=5905-0474
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Сединина Наталья Викторовна
старший научный сотрудник
РИНЦ SPIN-kod=4792-1196
*НИИ Биотехнологии и
сертификации, Кубанский государственный
аграрный университет, Краснодар, Россия*

Sedinina Natalya Viktorovna
senior research worker
SPIN-code=4792-1196
*SRI Biotechnology and food manufacturing
certification of Kuban State Agrarian University,
Krasnodar, Russia*

Донченко Дмитрий Юрьевич
к. б. н., старший научный сотрудник
РИНЦ SPIN-kod=4352-6610
*Кубанский государственный аграрный универси-
тет, Краснодар*

Donchenko Dmitriy Yrievich
Cand.Biol.Sci., senior research worker
SPIN-code=4352-6610
Kuban State Agrarian University, Krasnodar

Котляров Денис Владимирович
к. б. н., докторант кафедры физиологии и биохимии растений
РИНЦ SPIN-kod=2928-5639
*Кубанский государственный аграрный универси-
тет, Краснодар*

Kotlyarov Denis Vladimirovich
Cand.Biol.Sci.
SPIN-code=2928-5639
*Kuban State Agrarian University,
Krasnodar*

В статье приведены результаты исследования микробиологического состава почв после обработки их микробиологическими препаратами для защиты растений. Препараты получены по технологии, разработанной ООО МИП «Кубанские агротехнологии». Установлен факт присутствия в почве бактерий *Azotobacter chroococcum* и гриба *Trichoderma viride*. Анализ наличия *Trichoderma viride* проведен с использованием растительных (стерневых) остатков. Доказано, что применение микробиологических препаратов для защиты растений эффективно для улучшения микробиологического состава почв. Обоснован пример одновременного применения для защиты растений бактерий *Azotobacter chroococcum* и гриба *Trichoderma viride*. Ряд положений статьи имеет научное обоснование с точки зрения «пищевой цепи» применяемых микроорганизмов. Продукты ферментативного гидролиза *Trichoderma viride* являются хорошим источником питания для *Azotobacter chroococcum*. *Azotobacter chroococcum* способствует переводу азота в доступное состояние для питания растений. Описанные микробиологические препараты рекомендованы для обработки семян, растений в

The article presents the results of a study of microbiological content of the soil after microbial protection of plants. Preparations were obtained by the technology developed by Ltd. "Kuban agrotechnology". We have established the presence of bacteria *Azotobacter chroococcum* and fungus *Trichoderma viride* in the soil. Investigation of *Trichoderma viride* was made with using plant residues. It is proved that the use of microbiological preparations for plant protection have positive effect to improve the microbiological composition of soil. We have substantiated the example of the summary application of *Azotobacter chroococcum* and *Trichoderma viride* for plant protection. A number of provisions of the article have a scientific basis of view for the "food chain" microorganisms. *Trichoderma viride* enzymatic hydrolysis products are good food source for *Azotobacter chroococcum*. *Azotobacter chroococcum* facilitates transfer of available nitrogen for plant nutrition. These microbiological preparations were recommended for seed treatment of plants during the growing season and crop residues after harvest. We used such culture media as Capek, Beijerinck and Ashby. Soil samples for research were selected by "Temizhbekskaya" Ltd in the Stavropol region. The

период вегетации и растительных остатков после уборки урожая. В работе использованы питательные среды Чапека, Бейеринка и Эшби. Образцы почв, взятые для исследования, были отобраны в ООО СПК «Темижбекское» Ставропольского края. Результаты исследования могут быть интересны агрономам, биотехнологам, микологам, микробиологам

Ключевые слова: ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ, МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ, ПОЧВА, ИССЛЕДОВАНИЕ, БАКОВОЕ СРЕДСТВО

study may be interested for agronomists, biotechnologists, mycologists, microbiologists

Keywords: PLANT PROTECTION, MICROBIOLOGICAL PREPARATION, SOIL, RESEARCH INVESTIGATION, TANK PREPARATION

Использование в защите растений пестицидов в течение последних лет привело к снижению числа полезных микроорганизмов в почве и заставляет задуматься о необходимости улучшения её микробиологического состава путём внесения биопрепаратов. Ухудшающаяся экологическая обстановка агробиоценоза требует уменьшения доли использования химических препаратов и увеличения доли микробиологических [1, 2, 5]. Скептически относящиеся к микробиологическим средствам защиты растений, и отдающие предпочтение химическим методам, агротехнологи отрицают целесообразность такого обогащения почв микроорганизмами, ссылаясь на то, что рН почв, недостаток влаги, изменения и колебания температуры, использование пестицидов и гербицидов в конечном итоге всё равно приведут к гибели почвенных микроорганизмов. Вместе с тем используемый нами комплекс биопрепаратов для защиты посевов от болезней и вредителей хотя и показал позитивное влияние на плодородие почвы – увеличение содержания гумуса на 0,16% (ООО «Аксайская земля» Ростовской области), воздействию на микробиологический состав почвы детально не проверялся, это и стало основной целью исследований.

Материал и методы исследований. В качестве объектов исследования в работе были использованы образцы почв с полей отобранных в ООО СПК «Темижбекское» (Ставропольский край). Вариант с внесением баковой смеси микроорганизмов при обработках посевов для защиты растений и вариант без их внесения.

Почвы были исследованы на наличие следующих микроорганизмов: бактерий *Azotobacter chroococcum* и гриба *Trichoderma viride*. Выбор данных микроорганизмов для исследования обусловлен тем, что эти микроорганизмы входят в состав баковой смеси, разработанной ООО МИП «Кубанские агротехнологии» при Кубанском госагроуниверситете, рекомендуемой для защиты растений (в т. ч. пшеницы), выращиваемой в условиях Юга России [1, 2, 6, 7]. ООО СПК «Темижбекское» применяет этот способ защиты растений в течение трех с половиной лет. Отбор почв был произведен в сентябре 2014 года.

Бактерии рода *Azotobacter* используются в качестве аналога азотных удобрений. Эти бактерии синтезируют и продуцируют биологически активные вещества, потребляемые растениями. Среди них биотин, гетероауксин, гиббереллин, никотиновая и пантотеновая кислоты [4]. Кроме того, выявлена их антагонистическая активность в отношении возбудителей заболеваний растений, встречающихся на семенах и в почве (грибов родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Helminthosporium*), благодаря способности выделять фунгицидные вещества группы анисомицина. *Azotobacter* требователен к условиям питания. При этом в почвах, богатых перегноем, а так же при ограниченном количестве растительных остатков размножение *Azotobacter* затруднено [4]. Хорошо развивается при температуре 25-28°C и pH 6,8-7,2.

Trichoderma viride, являясь антагонистом, в процессе развития выделяет в окружающую среду антибиотики (глиотоксин, виридин, триходермин, аллпметицин, сацукациллин, дермадин), обеззараживающие почву и подавляющие более 60 видов фитопатогенных бактерий и грибов, в том числе: *Fusarium*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Pythium*, *Botrytis*, *Phoma* [3, 5, 6]. Кроме того *T. viride* препятствует развитию возбудителей ржавчины и мучнистой росы, антракноза, вилта, макроспориоза. *T. viride* способна уничтожать даже зимующие и покоящиеся стадии патогенов, улучшает струк-

туру почвы, повышая её плодородие, стимулирует корневое питание. Она продуцирует фермент целловиридин, в результате работы которого происходит активное разложение высокомолекулярных полисахаридов до полисахаридов с меньшей молекулярной массой, при этом *T. viride* обеспечивает питание своим симбионтам, а так же в случае разложения полисахаридов до ди- и моносахаров, обеспечивает питание растениям. Благодаря тому, что скорость разложения почвенных питательных субстратов и компонентов, *T. viride* высока, гиперпаразитическая активность в отношении медленно растущей микрофлоры, проявляется быстро, на 3-4 сутки, и за счёт действия хемотаксиса и питания поврежденными тканями больного участка растения обеспечивается защита растений от гнили, корневых инфекций [5]. Оптимальные условия для её развития: pH 4,0-6,5 и температура 22-28°C.

Для получения накопительной культуры *A. chroococcum* использовали жидкую среду Бейеринка с маннитом и добавлением в неё микроэлементов по Федорову [3]. В подготовленную питательную среду вносили по 10 г образцов почвы. После чего поместили в термостат и инкубировали в течение 5 суток при температуре 25±3 °C.

Для получения культуры *Trichoderma viride* использовали бульон и агар Чапека.

Результаты исследований. После этого в образце, отобранного на поле, на котором применялась обработка посевов пшеницы баковой смесью микроорганизмов и её послеуборочных остатков, на поверхности среды Бейеринка появилась характерная слизистая пленка и пристеночное кольцо, образованное *A. chroococcum* (рис. 1). А в образце почвы, взятой с поля, где такая обработка не применялась, и микроорганизмы не вносились, ни пленки, ни пристеночного кольца, связанных с развитием бактерий не наблюдалось (рис. 2), хотя считается, что *A. chroococcum* является почвенной микрофлорой и встречается в ней.

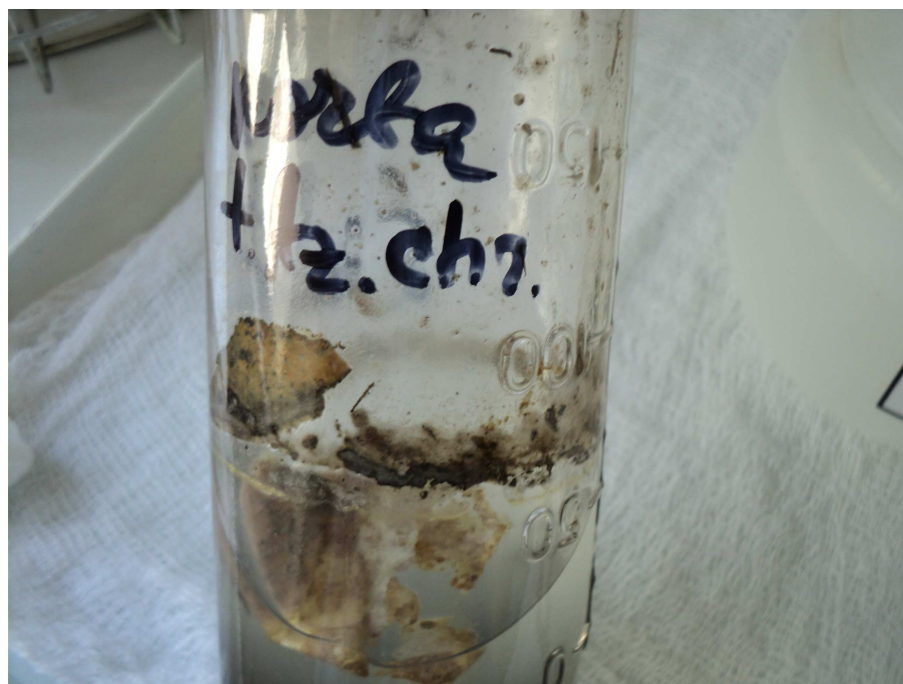


Рисунок 1. Рост *A. chroococcum* на среде Бейеринка, из образца почвы с применением обработки баковой смесью микроорганизмов (фото Н.В. Сединой, 2014)

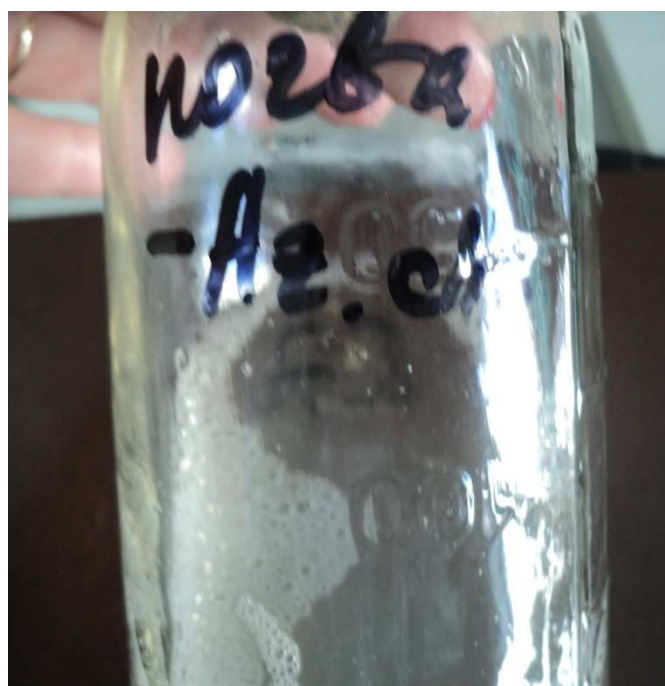


Рисунок 2. Отсутствие признаков роста *A. chroococcum* на среде Бейеринка, из образца почвы, где не применялась обработка баковой смесью микроорганизмов (фото Н.В. Сединой, 2014)

В дальнейшем, сделанный «слепой пересев» микробиологической петлей из обоих образцов почвы на агаризованную среду Эшби, так же по-

казал рост *A. chroococcum*, в образцах той почве, где применялась обработка баковой смесью, и отсутствие роста этих бактерий в почве, где такая обработка не применялась.

При проведении количественной оценки *A. chroococcum*, из ряда разведений (от 10^{-1} до 10^{-6}) из образцов, культивируемых на среде Бейеринка и посева их на среду Эшби (рис.3) был получен положительный результат в виде присутствия роста *A. chroococcum* в образце почвы, где обработка применялась, и отсутствия роста (даже в разведениях 10^{-2} , 10^{-3}) в образце почвы, где обработка не применялась, что подтверждает полученные ранее нами данные. Результаты исследования приведены в таблице 1.

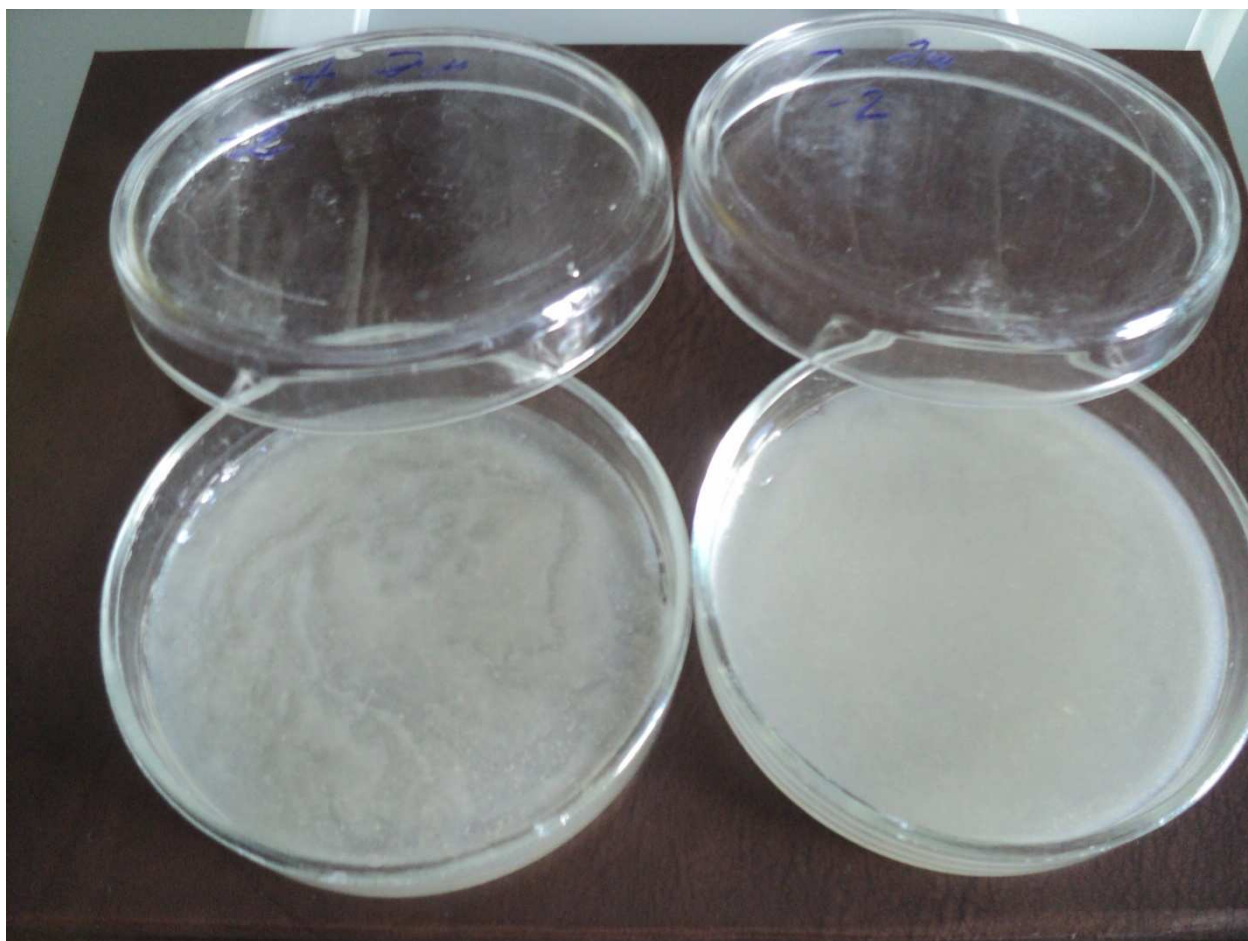


Рисунок 3. Рост *A. chroococcum* на среде Эшби (левая чаша Петри) и его отсутствие (правая чашка Петри) в образцах почв (фото Н. В. Сединой, 2014)

Микроскопия полученных клеток бактерий, показала наличие клеток бактерий в форме кокков, в основном соединенных попарно, одиночных в

меньшем количестве. При окраске по Граму большинство клеток было окружено слизистой капсулой (хотя обычно, капсула у *A. chroococcum* хорошо просматривается только при окраске тушью), внутри клеток просматривалась зернистость (рис. 4).

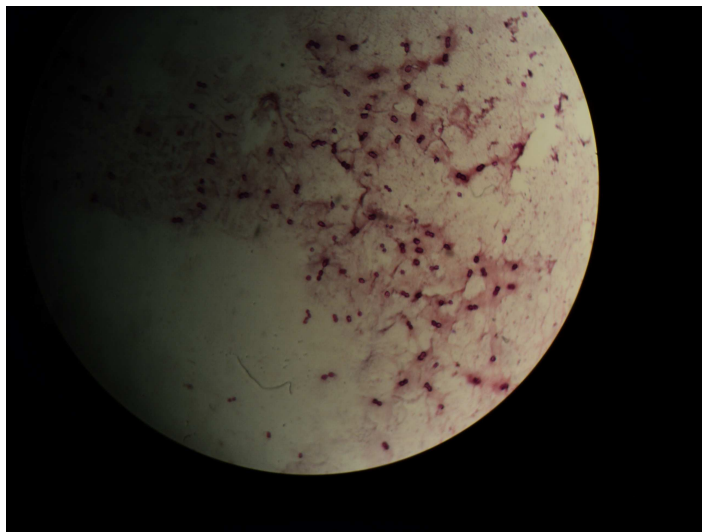


Рисунок 4. Микроскопия *A. chroococcum* (1000^x), выделенный из почвы, с применением микроорганизмов в защите растений (фото Н. В. Сединой, 2014)

Избирательность применяемых сред, а так же результаты микроскопии устанавливают принадлежность выделенной культуры к *A. chroococcum*.

Полученные данные подтверждают, что *A. chroococcum* требователен к условиям окружающей среды и мало распространён в почве (отсутствие его в образце почвы, где не применялась обработка баковой смесью). Но эти данные одновременно доказывают, что применение в защите растений (пшеницы) обработок микробиологическими препаратами позволяет обогатить их почвенной микрофлорой. При этом использование одного препарата на основе бактерий *A. chroococcum* нами считается недостаточным и приводит только к кратковременному 2-х недельному улучшению азотного питания в ризосферной зоне растений. Это объясняется тем, что *A. chroococcum* является культурой, которая плохо переносит изменение внешних условий среды, не образует споры, а из средств защиты своей клетки способна только к образованию капсулы. При этом единственным

способом поддержания её в почве является питание. Поэтому, нами рекомендуется, одновременно с *A. chroococcum* применять фосформобилизирующие микроорганизмы *Bacillus megaterium*, так же входящие в состав баковой смеси, рекомендуемой ООО МИП «Кубанские агротехнологии» для защиты растений, и являющиеся продуцентами доступного фосфора, в котором нуждается *A. chroococcum*. Их совместимость подтверждена проведенным нами исследованием и доказывается одновременным ростом этих бактерий на питательной среде без зоны антагонирования и задержки роста друг друга. Поэтому препараты на основе *A. chroococcum* целесообразно использовать и для обработок в период вегетации растений, и для стерневой (послеуборочной) обработки, т. к. эти бактерии хорошо разлагают продукты распада целлюлозы. Важно одновременно с *A. chroococcum* использовать грибы *T. viride* (при обработках в период вегетации) и/или *lignorum* (при стерневых послеуборочных обработках), обладающие способностью расщеплять целлюлозу и лигнин.

При исследовании тех же самых образцов почвы на наличие грибов рода *Trichoderma spp* были сделаны посевы из разведений от 10^{-1} до 10^{-6} на агаризованную среду Чапека. Однако данная часть исследования была затруднена по причине того, что для грибов рода *Trichoderma* не существует селективных сред. А на среде Чапека растёт вся грибная микрофлора, содержащаяся в почве. В результате в течение двух суток исследования обоих образцов был обнаружен рост гриба *Rhizopus* (рис. 5), из-за которого затруднялась идентификация грибов *Trichoderma*. Поэтому наличие или отсутствие в образцах почв грибов рода *Trichoderma* было решено устанавливать по растительным остаткам, взятым из этих образцов почв после их промывания в течение двух часов в проточной водопроводной воде.

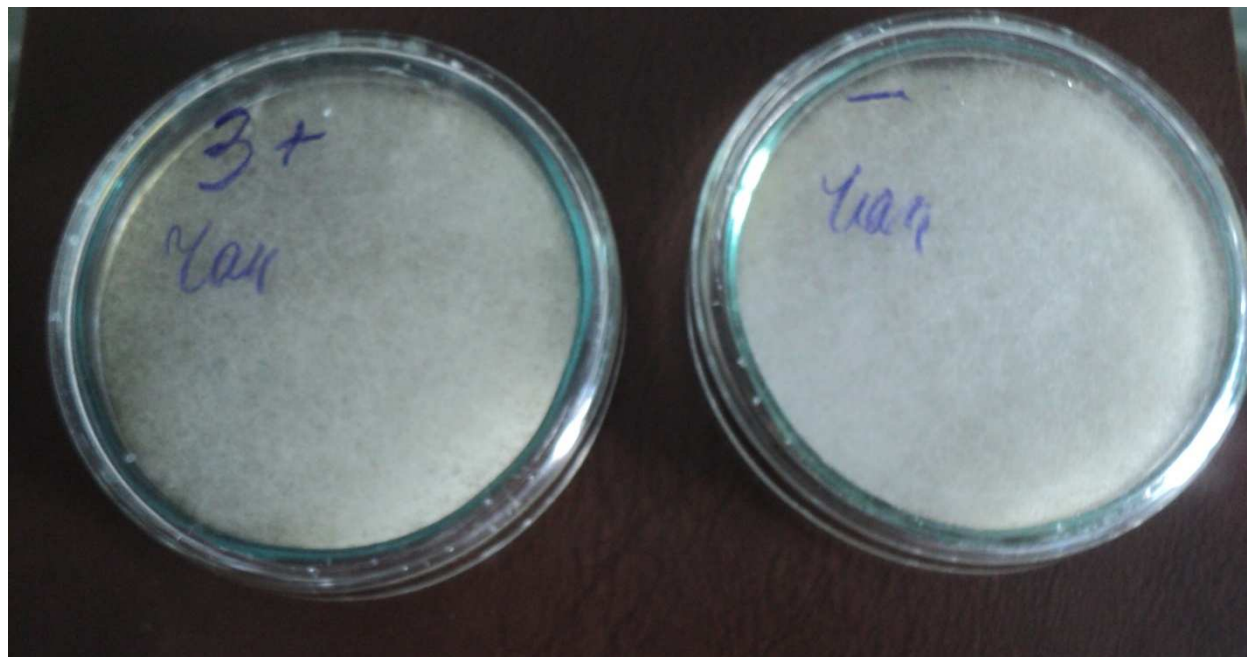


Рисунок 5. Развитие *Rhizopus* в исследуемых образцах почв
(фото Н.В. Сединой, 2014)

Затем растительные остатки были помещены на питательную среду Чапека. В образцах растительных остатков, взятых из почвы, на которой применялась обработка баковой смесью микроорганизмов, были обнаружены грибы рода *Trichoderma*. Что подтверждалось микроскопией (рис.6). Видовая принадлежность их нами не устанавливалась. В образцах растительных остатков, взятых из почвы без внесения микроорганизмов в виде баковой смеси грибы рода *Trichoderma* обнаружены не были (табл. 1).

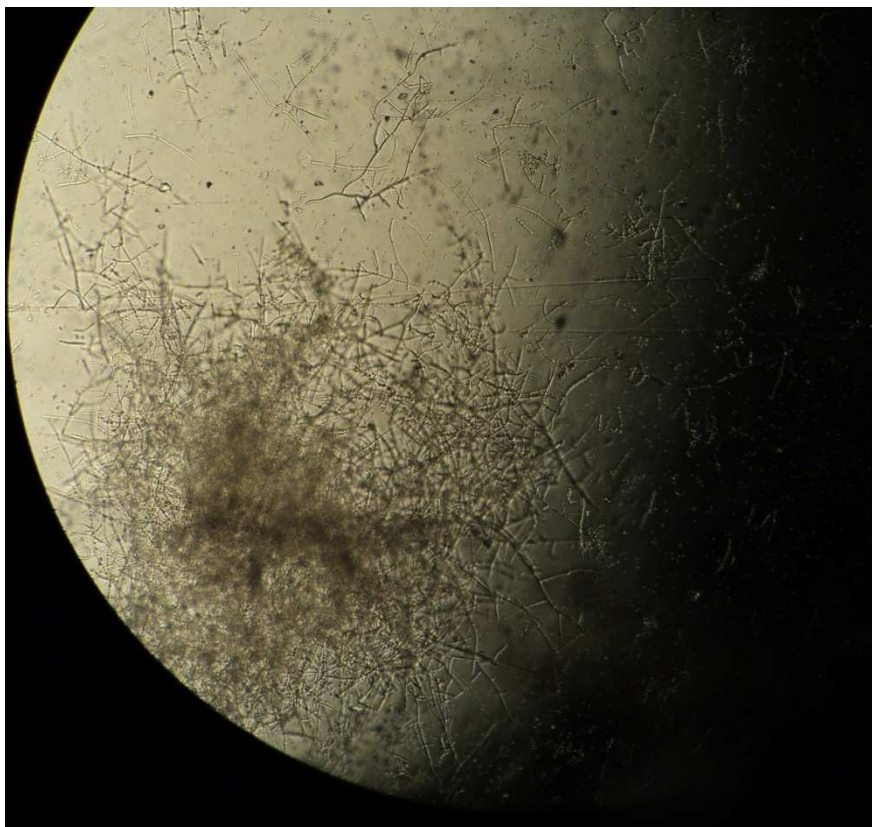


Рисунок 6. Грибы *Trichoderma spp* (200^x), обнаруженные на растительных остатках, взятых из почвы с обработкой микроорганизмами в баковой смеси (фото Н.В. Седининой, 2014)

Полученные в результате исследований данные в отношении грибов рода *Trichoderma spp* подтверждают наличие этого гриба в образцах с применением обработок микробиологическими препаратами, что в дальнейшем подтверждает факт обогащения почвы этими грибами.

Таблица 1 - Результаты микробиологической оценки почв ООО ОПХ «Темижбекское»

Наименование культуры микроорганизмов	Количество (или присутствие) микроорганизмов, (КОЕ/1г)	
	Образец почвы с внесением баковой смеси микроорганизмов при обработках пшеницы	Образец почвы без внесения в баковой смеси микроорганизмов
<i>A. chroococcum</i>	3×10^4	<10
<i>Trichoderma spp</i>	обнаружены	не обнаружены

Таким образом, итоговый результат применения в течение трёх с половиной лет микробиологической защиты растений, и проведённого нами исследования (таблице 1), на примере *A. chroococcum* и *Trichoderma spp*

показал, что применение биологической защиты растений от болезней дополнительно способствует созданию почвенной микрофлоры. Кроме того, микроорганизмы, вносимые в почву, в дальнейшем способствуют накоплению биомассы и накоплению гумуса улучшению уровня рН.

Литература:

1. Особенности малотоннажного производства микробиологических препаратов для защиты растений и его оптимизация / Котляров В.В., Сединина Н.В. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2014. – №06(100). – IDA [article ID]: 1001406050. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2014/06/pdf/50.pdf>

2. Котляров В.В., Сединина Н. В., Котляров Д. В., Донченко Д. Ю. Экологизация и биологизация сельского хозяйства на примере технологии производства и применения бакового средства для защиты растений от болезней и насекомых-вредителей // Материалы 2-ой международной научно-практической конференции «Наука в современном информационном обществе» Москва. 2013. С. 142-144.

3. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов / Е. З. Тепер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева; Под ред. В. К. Шильниковой. – 5-е изд., перераб и доп. – М. : Дрофа, 2004. – 256 с.

4. Мосичев, С.М. Общая технология микробиологических производств / С. М. Мосичев, А. А. Складнев, В. Б. Котов М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. – 264с.

5. Биологическая защита растений / М. В. Штерншис, Ф. С. –У. Джалилов, И.В. Андреева, О.Г. Томилова; Под ред. М.В. Штерншис. – М.: КолосС, 2004. – 264с.

6. Применение физиологически активных веществ в агротехнологиях /В.В. Котляров, Ю.П. Федулов, К. А. Доценко, Д.В. Котляров, Е.К. Яблонская. – Краснодар: КубГАУ, 2013 – 169с.

7. Котляров В.В. Физиология иммунитета растений: Учебное пособие. /В.В.Котляров – Краснодар, 2006.- 102 с.

References:

1. Osobennosti malotonnazhnogo proizvodstva mikrobiologicheskikh preparatov dlja zashhity rastenij i ego optimizacija / Kotljarov V.V., Sedinina N.V. // Politematicheskij setevoy jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Nauchnyj zhurnal KubGAU) [Jelektronnyj resurs]. – Krasnodar: Kub-GAU, 2014. – №06(100). – IDA [article ID]: 1001406050. – Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2014/06/pdf/50.pdf>

2. Kotljarov V.V., Sedinina N. V., Kotljarov D. V., Donchenko D. Ju. Jekologizacija i biologizacija sel'skogo hozjajstva na primere tehnologii proizvodstva i primenenija bakovogo sredstva dlja zashhity rastenij ot boleznej i nasekomyh-vreditelej // Mate-rialy 2-oj mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii «Nauka v sovremennom informacionnom obshhestve» Moskva. 2013. S. 142-144.

3. Praktikum po mikrobiologii: Uchebnoe posobie dlja vuzov / E. Z. Teper, V. K. Shil'nikova, G. I. Pereverzeva; Pod red. V. K. Shil'nikovoj. – 5-e izd., pererab i dop. – М. : Drofa, 2004. – 256 s.

4. Mosichev, S.M. Obshhaja tehnologija mikrobiologicheskikh proizvodstv / S. M. Mosichev, A. A. Skladnev, V. B. Kotov M.: Legkaja i pishhevaja prom-st', 1982. – 264s.
5. Biologicheskaja zashhita rastenij / M. V. Shternshis, F. S. –U. Dzhililov, I.V. Andreeva, O.G. Tomilova; Pod red. M.V. Shternshis. – M.: KolosS, 2004. – 264s.
6. Primenenie fiziologicheski aktivnyh veshhestv v agrotehnologijah /V.V. Kotljarov, Ju.P. Fedulov, K. A. Docenko, D.V. Kotljarov, E.K. Jablonskaja. – Krasnodar: KubGAU, 2013 – 169s.
7. Kotljarov V.V. Fiziologija immuniteta rastenij: Uchebnoe posobie. /V.V.Kotljarov – Krasnodar, 2006.- 102 s.