

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ БИОПЕЛАГАТА БЕТАПРОТЕКТИН ПРОТИВ КАГАТНОЙ ГНИЛИ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Свиридов А.В., Просвиряков В.В., Кильчевская О.С.,
Гришолович Н.И., Коломиец Э.М.

Гродненский государственный аграрный университет, г. Гродно,
Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

Резюме. Установлено, что оптимальной температурой для роста и синтеза антимикробных метаболитов штаммом бактерий *B. subtilis* БИМ В-439 Д — основы биопрепарата Бетапротектин для защиты сахарной свеклы от кагатной гнили — является температура 34°C. Выявлено, что прогревание препарата до 35°C в течение двух часов перед употреблением приводит к усилению его антимикробной активности в условиях *in vitro* и способствует повышению биологической и хозяйственной эффективности в условиях *in vivo* на 2,3,3% и 3,7% соответственно.

Введение. Перспективным способом защиты сахарной свеклы от кагатной гнили, болезни корнеплодов в период зимнего хранения в кагатах или буртах, является биологический контроль возбудителей болезни с использованием бактерий-антагонистов [1, 2, 3]. С этой целью в настоящее время разрабатывается технология получения отечественного биоpestицида Бетапротектин и способа его использования. Основой препарата является штамм бактерий *Bacillus subtilis*.

Условия окружающей среды оказывают влияние на развитие микроорганизмов. Температура — один из важнейших факторов среды, влияющий на скорость ферментативных процессов. Известно, что с повышением температуры до определенного температурного оптимума, находящегося в интервале от 30 до 40°C, скорость реакций растет, а с дальнейшим повышением температуры происходит утрата каталитической активности вследствие денатурации белков. Для большинства бактерий температурный оптимум развития лежит в границах 30-37°C [4].

Задача наших исследований является поиск условий, способствующих усилению эффективности действия биопрепарата при его производственном применении.

Объекты исследования и методики. В работе использовались штамм бактерий *Bacillus subtilis* БИМ В-439 Д, выделенный в лаборатории средств биологического контроля Института микробиологии НАН Беларуси. Культура, проявившая высокую антифунгальную активность, была отобрана в качестве основы биоpestицида Бетапротектин, предназначенного для защиты корнеплодов сахарной свеклы при хранении от кагатной гнили.

Основными тест-культурами для оценки антагонистической активности исследуемой культуры бактерий служили фитопатогенные грибы *Fusarium gedolens* и *Penicillium expansum*, изолированные из пораженных кагатной гнилью корнеплодов сахарной свеклы и идентифицированные в Гродненском государственном аграрном университете.

Бактерии-антагонисты выращивали на модифицированной среде Мейнелла, оптимизированной для данного штамма, содержащей в качестве источника углерода мелассу — 30 г/л, азота — сульфат аммония — 1,5 г/л. Культивирование бактерий при наработке препарата осуществляли в колбах на качалке (200 об./мин) при температуре 28°C в течение 72 ч. Титр колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий устанавливали методом предельных разведений [5]. Для определения титра спор проводили термическую обработку разведенной бактериальной суспензии при 80°C в течение 10 мин с последующим высевом на МПА. Антагонистическую активность бактерий оценивали методом лунок [6] по диаметру зоны задержки роста тест-культуры фитопатогенов.

Для изучения влияния температуры на качественные показатели биопрепарата его подогрели до 35°C на водяной бане и помещали в термостат с такой же температурой. Затем проводили определение титра клеток, спор и антагонистической активности по отношению к *F. gedolens* в начале опыта, через один, два и три часа нахождения препарата в подогретом состоянии.

Для определения оптимальных условий применения биопрепарата Бетапротектин в производственных условиях были заложены опыты в УО СПК "Пуришки" Гродненского района. Испытания проводились на гибриде сахарной свеклы Марс. Норма расхода препарата составила 0,5 л/т, норма расхода рабочего состава — 3 л/т. Исследования, проведенные в условиях зимнего хранения 2006-2007 годов, позволяют сделать вывод о том, что эти нормы расхода препарата являются эффективными и экономически целесообразными.

Корнеплоды обрабатывали перед закладкой на хранение подогретым до 35°C и выдержанным при этой температуре в течение двух часов и неподогретым препаратом. Контролем служили необработанные корнеплоды. После 3-х месячного хранения делали оценку состояния корнеплодов во всех вариантах. Распространенность и развитие заболевания корнеплодов кагатной гнилью, а также эффективность действия биопрепарата рассчитывали по общепринятым в фитопатологии методам [7]. Полученные данные обрабатывали методом дисперсионного анализа [8].

Результаты исследований и их обсуждение. Влияние температуры на рост и антифунгальную активность штамма бактерий *B. subtilis* БИМ В-439 Д в условиях *in vitro* изучалось в интервале температур от 28° до 37°C (рис. 1).

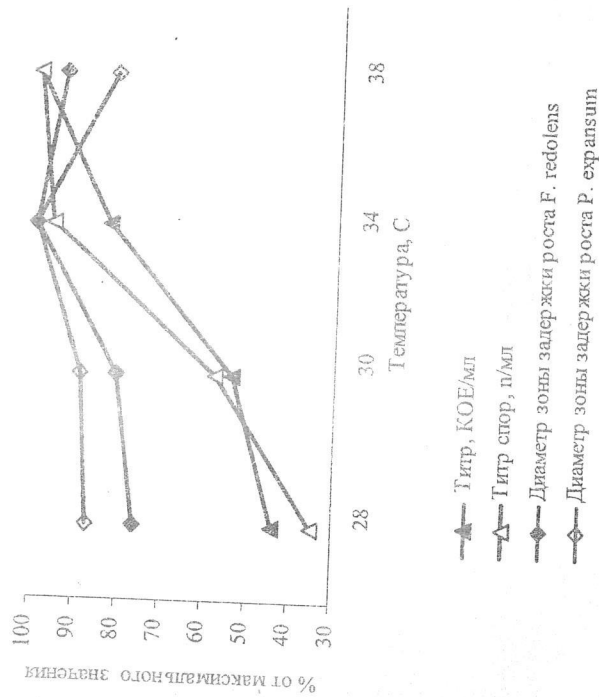


Рисунок 1 — Влияние температуры на рост и антифунгальную активность *B. subtilis* БИМ В-439 Д

Согласно полученным результатам, с увеличением температурного режима от 28° до 34°C титр клеток и спор, а также антифунгальная активность культуры возрастала, а с дальнейшим повышением температуры до 37°C титр клеток увеличивался, а антагонистическая активность несколько снижалась. Можно предположить, что наиболее благоприятной температурой для роста и синтеза антимикробных метаболитов данным штаммом бактерий является температура около 34°C.

Был разработан опытный образец биопрепарата с титром КОЕ и титром спор равным $1,4 \cdot 10^9$. Препарат хранили в холодильнике.

Результаты опытов с подогревом препарата до 35°C и влиянием продолжительности нахождения его в таком состоянии на титр клеток и спор, а также антифунгальную активность представлены в таблице 1.

Учитывая полученные в условиях *in vitro* результаты, и для их подтверждения провели испытания в условиях *in vivo* (табл. 2).

Таблица 2. Эффективность действия биопрепарата Бетапротектин против кагатной гнили сахарной свеклы в зависимости от подогрева его рабочего состава

Вариант	Распространенность кагатной гнили, %	Развитие кагатной гнили, %	Вредоносность, %	Биологическая эффективность, %	Хозяйственная эффективность, %
Препарат, подогретый до 35°C в течение 2 ч	70,0	22,8	6,9	36,0	6,7
Препарат без подогрева	81,7	31,1	10,6	12,7	3,0
Контроль — без обработки препаратами	95,0	35,6	13,1	-	-
НСР _{0,5}		1,77			

В результате проведенных исследований установлено, что при обработке корнеплодов сахарной свеклы перед закладкой на хранение подогретым до температуры 35°C в течение двух часов биопрепаратом, распространенность кагатной гнили снижалась на 25,0%, развитие заболевания — на 12,8% по сравнению с вариантом без обработки. Биологическая эффективность обработки подогретым препаратом составила 36,0%, а хозяйственная — 6,7%. Подогревание препарата перед употреблением до 35°C в течение двух часов способствует повышению биологической и хозяйственной эффективности его действия на 23,3% и 3,7% соответственно.

Изучается возможность подогрева рабочего состава биопрепарата перед применением до 35°C в сконструированном агрегате для обработки корнеплодов.

Заключение. Таким образом, выявлено, что оптимальной для роста и синтеза антимикробных метаболитов для штамма бактерий *B. subtilis* БИМ В-439 Д — основы биопрепарата Бетапротектин — является температура около 34°C. В опытах, проведенных в условиях *in vitro* и *in vivo*, было установлено, что прогревание препарата в течение двух

Таблица 1. Влияние продолжительности подогрева препарата Бетапротектин до температуры 35°C на его качественные показатели

Время, ч	Опыт 1		Опыт 2	
	Титр КОЕ/мл	Титр спор п/мл	Диаметр зоны задержки роста <i>F. redolens</i> , мм	Титр спор п/мл
0	$0,9 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^9$	23,5	$1,1 \cdot 10^9$
1	$1,3 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^9$	26,8	$1,4 \cdot 10^9$
2	$1,2 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^9$	37,5	$1,6 \cdot 10^9$
3	$1,3 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^9$	37,8	$1,3 \cdot 10^9$
НСР _{0,5}	$0,3 \cdot 10^9$	$0,2 \cdot 10^9$	2,6	$0,3 \cdot 10^9$

Согласно полученным данным, при подогреве биопрепарата до 35°C в нем увеличивается число клеток и спор до их исходного количества, а также возрастает антифунгальная активность, достигая максимального значения через два часа нахождения препарата в таком подогретом состоянии (рис. 2). Увеличение продолжительности времени прогрева препарата больше не увеличивают изучаемые показатели.

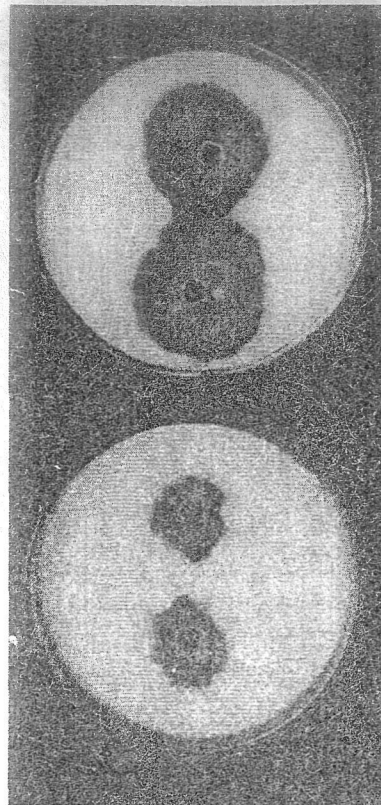


Рисунок 2 — Зоны задержки роста *F. redolens* под действием бактериоантагониста *B. subtilis* БИМ В-439 Д (метод лунок) при использовании неподогретого препарата (чашка Петри слева) и после подогрева препарата до 35°C в течение 2-х ч (чашка Петри справа)