



УДК 633.854.78:632.937
DOI 10.25230/conf11-2021-166-171

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА
МИКРОБИОПРЕПАРАТА 11-1 *BACILLUS* SP. – АНТАГОНИСТА ВОЗБУДИТЕЛЯ
ФОМОЗА ПОДСОЛНЕЧНИКА**

Ефимцева Е.А.
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК
zhmenkasemechek816@gmail.com

Для разработки технологического регламента производства микробиопрепарата в препаративной форме «смачивающийся порошок» изучены культуральные и физиологические признаки штамма-продуцента 11-1 *Bacillus* sp. – антагониста возбудителя фомоза подсолнечника. Культуральные свойства штамма-продуцента изучены на трёх агаризированных средах: картофельно-сахарозном агаре (КСА), Чапека для бактерий и Тайлона-3 и значительно колебались в зависимости от питательной среды. Максимальный диаметр колоний на десятые сутки инкубации сформировался на среде Тайлона-3 – 66×59 мм. Установлены оптимальные условия культивирования штамма на жидких питательных средах: температура – 30–35 °С, рН среды от 6 до 10. В качестве оптимального источника углеродного питания установлена меласса. Наиболее благоприятным источником азотного питания определен пептон. Оптимальной сложной жидкой питательной средой для культивирования бактериального штамма 11-1 *Bacillus* sp. установлена среда Тайлона-3.

Ключевые слова: подсолнечник, фомоз, микробиопрепарат, штамм-продуцент 11-1 *Bacillus* sp.

Введение. Во всем мире подсолнечник значительно страдает от различных болезней, в частности от фомоза, вызываемого грибом *Phoma macdonaldii* Voerema [1], телеоморфные стадии *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi [2] и *Plenodomus lindquistii* Gruyter, Aveskamp&Verkley [3]. За последние 10–15 лет фомоз подсолнечника в России быстро распространился и перешел в разряд экономически значимых болезней культуры [4].

В лаборатории биометода Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта» (ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК) в течение многих лет ведутся исследования по разработке микробиологических средств защиты масличных культур от болезней [5]. При разработке микробиологического метода снижения вредоносности фомоза подсолнечника проведен ступенчатый скрининг штаммов-антагонистов из коллекции лаборатории к возбудителю болезни подсолнечника, в результате которого выделены наиболее перспективные штаммы: грибной – М-24 *Penicillium* sp. и бактериальный – 11-1 *Bacillus* sp. [6–9].

Данная статья посвящена изучению культуральных и физиологических признаков штамма-продуцента 11-1 *Bacillus* sp., подбору оптимальных сложных жидких питательных сред для поверхностного культивирования антагониста с целью разработки технологического регламента производства микробиопрепарата в препаративной форме «смачивающийся порошок» (СП).

Материалы и методы. Изучение культуральных свойств выполняли по общепринятым методикам, выращивая перспективный штамм-антагонист 11-1 *Bacillus* sp. на трех агаризированных питательных средах – картофельно-сахарозном агаре (КСА), Чапека для бактерий и Тайлона-3 [10–12].



Физиологические признаки активного штамма изучали на жидкой питательной среде Чапека для бактерий. Поверхностное культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера (250,0 мл) с объемом питательной среды 100,0 мл, высевая одинаковый агаровый блок со штаммом-антагонистом, заменяя источники углеродного и азотного питания. Источниками углеродного питания служили глюкоза, сахароза, глицерин и меласса, азотного – пептон, азотнокислый натрий, дрожжевой и кукурузный экстракты.

Оптимальную температуру культивирования штамма изучали на жидкой питательной среде Тайлона-3 при температурах 20,0; 25,0; 30,0 и 35,0 °С.

Подбор оптимальной кислотности среды проводили, выращивая штамм на жидкой среде Тайлона-3 при оптимальной температуре с добавлением лимонной кислоты или щёлочи. рН среды устанавливали в значениях 3,0; 6,0; 8,0 и 10,0.

Определение оптимальных сложных жидких питательных сред проводили при стационарном культивировании бактериального штамма. Испытывали среды Тайлона-3, Чапека для бактерий, мясопептонный бульон (МПБ) и пептон-дрожжевую среду [13; 14].

Рост бактериального штамма определяли по разработанной нами шкале:

0 баллов – нет роста, или только обрастание посевного блока;

1 балл – рост бактерий отдельными колониями;

2 балла – бактериальная плёнка поверхностная, сплошная;

3 балла – бактериальная плёнка сплошная, с массовым глубинным ростом.

Результаты и обсуждения. Культуральные признаки штамма 11-1 *Bacillus* sp. изучены на агаризированных средах КСА, Чапека для бактерий и Тайлона-3 при температуре 30 °С на десятые сутки культивирования (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1. Культуральные признаки колоний штамма 11-1 *Bacillus* sp. при выращивании на агаризированных средах, на десятые сутки

Краснодар, ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, 2020 г.

| Характеристика признаков | Питательная среда | | |
|--|-----------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | КСА | Чапека для бактерий | Тайлона-3 |
| 1. Форма колоний | ризоидная | круглая | круглая, с фестончатым краем |
| 2. Диаметр колоний, мм | 57×20 | 11×12 | 66×59 |
| 3. Край колоний | лопастной | волнистый | лопастной |
| 4. Поверхность колоний | матовая шероховатая | матовая, сухая, шероховатая | гладкая, по краю складчатая |
| 5. Профиль колоний | срастающийся с агаром | срастающийся с агаром | выпуклый |
| 6. Оптические свойства поверхности колоний | непрозрачная | непрозрачная | непрозрачная |
| 7. Структура колонии | струйчатая | крупнозернистая | мелкозернистая |
| 8. Консистенция | сухая | плотная волокнистая | слизистая |

На КСА у штамма 11-1 *Bacillus* sp. формируются колонии ризоидной формы с лопастным краем. Колонии матовые, шероховатые, срастающиеся с агаром, непрозрачные. Структура колоний струйчатая, консистенция сухая. Диаметр колоний на десятые сутки инкубации 57×20 мм.

На среде Чапека для бактерий колонии бактериального штамма круглой формы с волнистым краем. Колонии, сухие, шероховатые, срастающиеся с агаром, непрозрачные. Структура колоний крупнозернистая, консистенция плотная, волокнистая. Диаметр колоний на десятые сутки инкубации 11×12 мм.

На среде Тайлона-3 формируются колонии круглой, с фестончатым краем формы, с лопастным краем. Колонии гладкие, складчатые, выпуклые, непрозрачные. Структура колоний мелкозернистая, консистенция слизистая. Диаметр колоний на десятые сутки инкубации 66×59 мм.



Рисунок 1 – Рост штамма 11-1 *Bacillus* sp. на агаризованных средах, при температуре 30 °С (ориг.).

Таким образом, культуральные признаки штамма 11-1 *Bacillus* sp. значительно колебались в зависимости от питательной среды, на которой культивировали бактерию. Максимальный диаметр колоний на десятые сутки инкубации сформировался на среде Тайлона-3 – 66×59 мм.

Физиологические признаки штамма 11-1 *Bacillus* sp. Для разработки элементов технологии производства микробиопрепарата в препаративной форме «смачивающийся порошок» определяли влияние температуры, pH среды, источников углерода и азота на рост штамма-продуцента на жидкой питательной среде в условиях стационарного культивирования. Рост бактериального штамма определяли по разработанной нами шкале (рис. 2).



Рисунок 2 – Шкала оценки роста штамма 11-1 *Bacillus* sp. на жидких средах (ориг.)

Определена оптимальная температура для культивирования штамма 11-1 *Bacillus* sp. (табл. 2).

Таблица 2. Влияние температуры на рост штамма 11-1 *Bacillus* sp. в условиях стационарного культивирования на жидкой среде Тайлона-3

Краснодар, ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, 2020 г.

| Штамм | Рост бактерии, балл*/Вес сухой бактериальной массы, г ** | | | |
|--------------------------|--|---------------|---------------|---------------|
| | температура, °С | | | |
| | 20 | 25 | 30 | 35 |
| 11-1 <i>Bacillus</i> sp. | 2/0,12 ± 0,07 | 2/0,14 ± 0,02 | 3/0,19 ± 0,03 | 3/0,26 ± 0,03 |

Примечание. * - Рост бактерии на жидкой среде, балл.

** - Вес сухой бактериальной массы в расчете на 100 мл питательной среды.



Обильный рост колоний штамма 11-1 *Bacillus* sp. (3 балла) и максимальный вес сухой бактериальной массы (0,19–0,26 г на 100 мл питательной среды) отмечен в диапазоне температуры 30–35 °С.

Оптимальную кислотность среды определяли, выращивая штамм 11-1 *Bacillus* sp. на жидкой питательной среде Тайлона-3, в диапазоне рН от 3,0 до 10,0, при температуре 30 °С (табл. 3).

Таблица 3. Влияние рН среды на рост штамма 11-1 *Bacillus* sp. в условиях стационарного культивирования на жидкой среде Тайлона-3, при температуре 30 °С

Краснодар, ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, 2020 г.

| Штамм | Рост бактерии, балл*/Вес сухой бактериальной массы, г ** | | | |
|--------------------------|--|------------|---------------|------------|
| | рН среды | | | |
| | 3,0 | 6,0 | 8,0 | 10,0 |
| 11-1 <i>Bacillus</i> sp. | 2/0,10 ± 0,02 | 3/0,16 ± 0 | 3/0,14 ± 0,02 | 3/0,15 ± 0 |

Примечание. * - Рост бактерии на жидкой среде, балл.

** - Вес сухой бактериальной массы в расчете на 100 мл питательной среды.

Отмечен практически одинаковый вес сухой бактериальной массы (0,14–0,16 г на 100 мл питательной среды) в диапазоне рН от 6,0 до 10,0.

Оптимальные источники питания определяли, выращивая штамм 11-1 *Bacillus* sp. на жидкой питательной среде Чапека для бактерий при температуре 30 °С. Источниками углеродного питания служили глюкоза, сахароза, меласса и глицерин (табл. 4).

Таблица 4. Влияние источников углерода на рост штамма 11-1 *Bacillus* sp. в условиях стационарного культивирования на жидкой среде Чапека для бактерий, при температуре 30 °С.

Краснодар, ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, 2020 г.

| Штамм | Рост бактерии, балл*/Вес сухой бактериальной массы, г** | | | |
|--------------------------|---|---------------|------------|---------------|
| | источник углерода | | | |
| | глицерин | глюкоза | сахароза | меласса |
| 11-1 <i>Bacillus</i> sp. | 1/0,04 ± 0,02 | 1/0,04 ± 0,05 | 1/0,01 ± 0 | 3/0,14 ± 0,02 |

Примечание.* - Рост бактерии на жидкой среде, балл.

** - Вес сухой бактериальной массы в расчете на 100 мл питательной среды.

Максимальный рост (3 балла) и вес сухого остатка бактериальной массы отмечены при использовании в качестве единственного источника углерода мелассы (0,14 г на 100 мл питательной среды).

Источниками азота служили азотнокислый натрий, пептон, дрожжевой и кукурузный экстракты (табл. 5).

Таблица 5. Влияние источников азота на рост штамма 11-1 *Bacillus* sp. в условиях стационарного культивирования на жидкой среде Чапека для бактерий, при температуре 30 °С.

г. Краснодар, ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, 2020 г.

| Штамм | Рост бактерии, балл*/Вес сухой бактериальной массы, г ** | | | |
|--------------------------|--|--------------------|---------------------|---------------------|
| | Источник азота | | | |
| | пептон | дрожжевой экстракт | кукурузный экстракт | азотнокислый натрий |
| 11-1 <i>Bacillus</i> sp. | 2/0,11 ± 0,02 | 1/0,04 ± 0,03 | 1/0,08 ± 0,03 | 1/0,04 ± 0 |

Примечание. * - Рост бактерии на жидкой среде, балл.

** - Вес сухой бактериальной массы в расчете на 100 мл питательной среды.



Максимальный рост (2 балла) и вес сухой бактериальной массы (0,11 г на 100 мл питательной среды) отмечены при использовании в качестве единственного источника азота пептона.

Установлена оптимальная жидкая питательная среда сложного состава для стационарного культивирования штамма 11-1 *Bacillus* sp. Испытывали среды Тайлона-3, Чапека для бактерий, мясо-пептонный бульон (МПБ) и пептон-дрожжевую среду, содержащие углеводы и, в разном соотношении, соединения азота, фосфора, калия и магния, а также микроэлементы (табл. 6).

Таблица 6. Влияние жидких питательных сред и срока стационарного культивирования на рост штамма-продуцента микробиопрепарата 11-1 *Bacillus* sp., при температуре 30 °С
Краснодар, ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, 2020 г.

| Штамм | Рост бактерии*, через 10 суток | | | |
|--------------------------|---|---------------------|----------|--------------------------|
| | питательная среда | | | |
| | Тайлона-3 | Чапека для бактерий | МПБ | пептон - дрожжевая среда |
| 11-1 <i>Bacillus</i> sp. | 3 | 2 | 2 | 2 |
| | Вес сухой бактериальной массы, г **, через 10 суток | | | |
| | 0,19 ± 0,01 | 0,05 ± 0,05 | 0,05 ± 0 | 0,08 ± 0,02 |

Примечание. * - Рост бактерии на жидкой среде, балл.

** - Вес сухой бактериальной массы в расчете на 100 мл питательной среды.

Оптимальной сложной жидкой питательной средой для культивирования перспективного бактериального штамма 11-1 *Bacillus* sp. установлена среда Тайлона-3. При максимальной бактериальной пленке (3 балла) вес сухой бактериальной массы составил 0,19 г против 0,05–0,08 г на 100 мл питательной среды на других средах.

Заключение. Для разработки элементов технологического регламента производства микробиопрепарата в препаративной форме «смачивающийся порошок» при выращивании штамма-продуцента 11-1 *Bacillus* sp. на жидких питательных средах установлены оптимальные условия культивирования штамма: температура – 30–35 °С, рН среды от 6,0 до 10,0. В качестве источников углеродного питания определена меласса. Оптимальным источником азотного питания установлен пептон. Оптимальной сложной жидкой питательной средой для культивирования бактериального штамма 11-1 *Bacillus* sp. установлена среда Тайлона-3.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ и администрации Краснодарского края р_Наставник № 19-416-235003 под руководством доктора биологических наук Маслиенко Л.В.

Литература

1. Boerema G.H., De Gruyter J., Noordeloos M.E. and Hammers M.E.C. *Phoma* identification manual. Differentiation of specific and intraspecific taxa in culture. CAB International, United Kingdom. – 2004. – P. 470.
2. Frezzi M.J. *Leptosphaeria lindquistii* n. sp., forma sexual de *Phoma oleracea* var. *helianthituberosi* Sacc., hongo causal de la manchanegra del tallo' del girasol (*Helianthus annuus* L.), en Argentina // Patologia Vegetal. – 1968. – №5. – P. 73–80.
3. Index Fungorum Databases: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=564757> (Дата обращения: 19.01.2021).
4. Арасланова Н.М., Саукова С.Л., Антонова Т.С. К вопросу о вредоносности *Phoma macdonaldii* Boerema на подсолнечнике // Масличные культуры. НТБ ВНИИМК.В – 2018. – Вып. 3 (175). – С. 117–123.



5. Маслиенко Л.В. Обоснование и разработка микробиологического метода борьбы с болезнями подсолнечника: автореф. дис. док-ра биол. наук. – Краснодар, 2005. – 48 с.
6. Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х., Даценко Л.А., Ефимцева Е.А., Пуногина Д.А., Гайдукова С.Л., Казакова В.В., Ковалева С.Р. Первичный скрининг грибных штаммов антагонистов из коллекции лаборатории биометода ВНИИМК к возбудителю фомоза подсолнечника (часть 1) // Масличные культуры. – 2020. – №2 (182). – С. 103–111.
7. Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х., Даценко Л.А., Ефимцева Е.А., Пуногина Д.А., Гайдукова С.Л., Казакова В.В., Ковалева С.Р. Первичный скрининг бактериальных штаммов антагонистов из коллекции лаборатории биометода ВНИИМК к возбудителю фомоза подсолнечника (часть 2) // Масличные культуры. – 2020. – №3 (183). – С. 107–113.
8. Maslienko L., Voronkova A., Datsenko L., Efimtseva E., Punogina D. Secondary screening of strains of antagonists to a Phoma pathogen on sunflower // BIO Web of Conferences. XI International Scientific and Practical Conference “Biological Plant Protection is the Basis of Agroecosystems Stabilization. – 2020. – V. 21.
9. Маслиенко Л.В., Ефимцева Е.А., Даценко Л.А., Воронкова А.Х. Модификация метода искусственного заражения семян подсолнечника возбудителем фомоза в лабораторных условиях для определения защитного действия штаммов-продуцентов микробиопрепаратов. Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2020. – №5 (86).
10. Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н., Азова Л.Г., Нетрусов А.И. [и др.]. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова; 2-е изд. – М.: Изд-во МГУ, 1983. – 221 с.
11. Скворцова И.Н. Идентификация почвенных бактерий рода *Bacillus*. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. – 26 с.
12. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Наука, 2004. – 525 с.
13. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. – М.: Медицина, 1967. – 463 с.
14. Тихонович И.А., Оследкин Ю.С. Каталог культур микроорганизмов. – СПб. – Пушкин, 2005. – 88 с.

**THE BIOLOGICAL PECULIARITIES OF PRODUCER STRAIN
OF MICROBIOPREPARATION 11-1 *BACILLUS* SP. – THE ANATAGONIST
OF SUNFLOWER PHOMA ROT PATHOGEN**

Efimtseva E.A.

We studied the cultural and physiological characteristics of the producer strain 11-1 *Bacillus* sp. – the antagonist of sunflower Phoma rot pathogen to develop the technological regulations for the production of a microbiological preparation in a «wetable powder» form. We studied the cultural characteristics of the producer strain on three agar media: potato sucrose agar (PSA), Czapek’s agar and Tylon-3; the characteristics varied significantly depending on the nutrient medium. The maximum diameter of colonies on the tenth day of incubation developed on the Tylon-3 medium – 66×99 mm. We established the optimal conditions for the cultivation of the strain on liquid nutrient media: temperature – 30–35 °C, medium pH from 6 to 10. We found that molasses is an optimal source of carbon nutrition, while peptone is the most favorable source of nitrogen nutrition. We established that the Tylon-3 medium is the optimal complex liquid nutrient medium for the cultivation of the bacterial strain 11-1 *Bacillus* sp.

Key words: sunflower, Phoma rot, microbiopreparation, producer strain 11-1 *Bacillus* sp.