

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

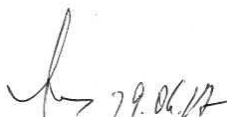
## **БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИММОБИЛИЗИРОВАН- НЫХ ФОРМ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы  
направления 06.04.01 «Биология»,  
биологический факультет, кафедра микробиологии  
и физиологии растений  
Хапцев Заур Юрьевич

Научный руководитель  
Зав. кафедрой, доктор  
биологических наук, профессор

Зав. кафедрой, доктор  
биологических наук, профессор



С. А. Степанов  
(подпись, дата)



С. А. Степанов  
(подпись, дата)

Саратов 2017

## Введение

Общемировой опыт земледелия показывает, что урожайности сельскохозяйственных культур находится в прямой зависимости от количества используемых удобрений. Однако резкое повышение их цен и общее ухудшение экологии вынуждают искать эффективные и экологически безопасные способы увеличения урожайности, обеспечивающие сохранение структуры почвы и баланса почвенных органических соединений, макро- и микроэлементов, способствующие саморегуляции почвенных экосистем, и при этом более дешевые. Существует множество регуляторов роста растений, которые за счет биологически активных соединений определяют рост и формирование различных органов, время и характер цветения, сроки созревания. Многие микроорганизмы из почвы или прикорневой зоны растений известны как агрономически полезные и могут служить основой для создания бактериальных препаратов.

Микробиологические препараты могут значительно снизить дозы минеральных удобрений, повысить коэффициент их использования. Актуальность подобной проблемы не исчезает даже при достаточном потреблении и доступности агрохимикатов. Более того, оптимальное использование химических средств возможно лишь при их рациональном сочетании с комплексом биологических препаратов и технологий.

Одним из направлений повышения эффективности применения биопрепаратов является совершенствование их препаративной формы, основываясь, в том числе, на экологии и физиологии микроорганизмов, входящих в биопрепарат. Кроме того, перспективным является и создание комбинированных биоминеральных препаратов.

**Целью работы** являлось изучение возможности получения иммобилизованных форм бактериальных препаратов для сельского хозяйства, повышения их эффективности и пролонгирования сроков хранения.

Для достижения указанной цели были поставлены **следующие задачи**:

- подобрать оптимальный носитель для иммобилизации биопрепаратов;

- разработать технологию получения сухих препаративных форм бактериальных препаратов *Agrobacterium radiobacter* 204, *Rhizobium leguminosarum* биовар trifolii, *Flaviobacterium fulvum* L 30, *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393 на основе глауконита;

- разработать технологию получения микрокасулированных препаративных форм бактериальных препаратов *Agrobacterium radiobacter* 204, *Rhizobium leguminosarum* биовар trifolii, *Flaviobacterium fulvum* L 30, *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393 на основе альгината кальция и глауконита;

- исследовать в лабораторных условиях жизнеспособность бактерий *Agrobacterium radiobacter* 204, *Rhizobium leguminosarum* биовар trifolii, *Flaviobacterium fulvum* L 30, *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393 иммобилизованных на глауконите и микрокапсулах на основе альгината кальция и глауконита;

**Научная новизна.** В результате проведенных исследований подобран оптимальный носитель для иммобилизации биопрепаратов, разработаны технологии получения сухих препаративных и микрокасулированных форм бактериальных препаратов *Agrobacterium radiobacter* 204, *Rhizobium leguminosarum* биовар trifolii, *Flaviobacterium fulvum* L 30, *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393 на основе глауконита.

**Практическая значимость.** Полученные данные о могут быть использованы на практике в производстве новых видов биоминеральных удобрений.

**Апробация.** Результаты исследований были освещены на международной научно-практической конференции «Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии» (Саратов, 2017 г.).

#### **Публикации.**

1. Хапцев З.Ю. Глауконит-перспективный носитель для создания сухих препаративных форм биоудобрений./ Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии. Материалы международной научно-практической

конференции; ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ/ под ред. А.В. Банниковой, О.С. Ларионовой.-Саратов: ИЦ «Наука», 2017.-С217-222.

2. Хапцев З.Ю. Создание иммобилизованных форм биопрепаратов для повышения плодородия почв на основе глауконита./ З.Ю. Хапцев, С.А. Степанов// Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: Материалы Международной научно-практической конференции / под редакцией А.В. Молчанова, В.В. Строгова. – Саратов: Издательский центр «Наука», 2017. – С.138-146.

**Структура и объем.** Работа состоит из введения, четырех глав (Обзор литературы; Материал и методы исследования; Необходимость получения иммобилизованных форм биопрепаратов для сельского хозяйства и обоснование выбора носителя для иммобилизации; Иммобилизация микроорганизмов на глауконите), выводов, списка использованных источников. Магистерская работа изложена на 66 страницах, содержит 11 таблиц, 14 фотографий и 1 рисунок. Список литературы включает 100 источников.

### **Основное содержание работы**

Из всех компонентов, которые определяют продуктивность сложноорганизованной системы *почва-растение-микроорганизмы*, именно последние имеют наиболее важное значение и именно они являются наименее изученными. Использование современных молекулярно-генетических методов в идентификации и дифференциации почвенных микроорганизмов показало, что имеющиеся знания и выводы основаны на весьма ограниченном количестве известных и культивируемых видов.

К основным механизмам полезного действия микроорганизмов на растения относятся:

- фиксация атмосферного азота (улучшение азотного питания);
- оптимизация фосфорного питания растений;
- стимуляция роста и развития растений (более быстрое развитие растений и созревания урожая);

- подавление развития фитопатогенов (контроль за развитием болезней и снижение поражённости ими растений, улучшение хранения продукции)
- улучшение питания растений (повышение коэффициентов использования питательных элементов из удобрений и почвы)
- повышение устойчивости растений к стрессовым условиям (возможность повышения продуктивности растений на фоне водного дефицита, неблагоприятных температур, повышенной кислотности, засоления или загрязнения почвы).

Микробные препараты позволяют направленно регулировать состав и численность микробного комплекса на корнях в соответствии с потребностями и возможностями растений .

В настоящее время различные микробные препараты с успехом применяются при выращивании зерновых, бобовых, овощных и плодово-ягодных культур , многолетних трав, хлопчатника

Препараты, в состав которых входят микроорганизмы и применяемые в сельском хозяйстве, можно разделить на следующие группы: микробиологические удобрения, биологические средства защиты растений (биопестициды), биопрепараты для биоутилизации пожнивных остатков различного генезиса и химических веществ

**Пути повышения эффективности биопрепаратов.** В настоящее время перспективны исследования и разработка биопрепаратов полифункционального действия, переход к биоинженерии сложных полифункциональных систем. Кроме того, в производстве препаратов важным завершающим этапом является приготовление препаративной формы (формуляция действующего начала).

**Материал и методы исследования.** В качестве объектов исследования использовались производственные штаммы бактериальных препаратов *Agrobacterium radiobacter* 204, *Rhizobium leguminosarum* биовар *trifolii*, *Flaviobacterium fulvum* L 30, *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393.

При выполнении работы использовались стандартные методики по культивированию микроорганизмов, их иммобилизации на неорганическом носителе (глауконите), иммобилизации в альгинатные капсулы. Для определения жизнеспособности микроорганизмов в сконструированных препаратах применяли стандартные методики. При определении адсорбционной емкости носителей использовали спектрофотометрический метод.

### **Необходимость получения иммобилизованных форм биопрепаратов для сельского хозяйства и обоснование выбора носителя для иммобилизации**

В настоящее время применение биологических препаратов в сельском хозяйстве предусматривает применение значительных количеств бактерий. Это связано с тем, что на рост клеток препарата после внесения в экосистему оказывают влияние те же факторы, которые оказывают влияние на рост аборигенной микрофлоры. Это в первую очередь:

- доступность субстрата, включая обеспеченность кислородом;
- влажность;
- осмотическое давление;
- перепады температур;
- концентрация ионов водорода;
- способность клеток к прикреплению (сорбции) на поверхности субстрата.

Все перечисленные выше параметры оказывают существенное влияние на физиологию развития вносимых агентов биопрепаратов являются не самыми оптимальными для них. Одновременно с этим, вносимые извне микроорганизмы подвергаются фунгистазису и бактериостазису - влиянию биологических факторов почвы, отрицательно сказывающихся на прорастании и росте вновь внесённых клеток. Существенную роль среди биологических факторов почвы играют взаимодействия многообразного аборигенного сообщества микрофлоры с вновь внесёнными клетками. Как правило, в почве

уже находятся микроорганизмы, которые с наибольшим эффектом занимают новые экологические ниши.

Формирование аборигенного сообщества происходит в условиях природного естественного отбора, при этом немаловажную роль играет иммобилизация микроорганизмов на частичках почвы. Для увеличения эффективности действия агентов биопрепаратов необходимо повысить уровень их приживаемости, конкурентоспособности и устойчивости к фунгистазису и бактериостазису в почвенной экосистеме. Добиться этого можно изменением препаративной формы, создав условия, в которых микроорганизмы были бы максимально приближены к условиям, возникающим в почвенной экосистеме. Кроме того, описана способность фитопатгенных микроорганизмов образовывать биопленки. Поэтому логичным является внесение биопрепаратов в почву в иммобилизованном состоянии. В связи с тем, что одной из важнейших характеристик неорганических носителей является адсорбционная емкость, нами были проведены исследования по определению адсорбционной емкости следующих носителей: бентонит, глауконит-концентрат, глауконит-концентрат, обработанный СВЧ, глауконит порошок с размерами частиц 60 мкм, глауконит порошок с размерами частиц 60 мкм, обработанный СВЧ.

Измерение адсорбционной емкости носителей производили при помощи ионов меди. Через 5 часов наибольшей адсорбционной способностью обладал порошок глауконита. При этом, обработка СВЧ повышало адсорбционную способность примерно на 16,5%.

Что касается бентонита, также используемого в качестве носителя для адсорбционной иммобилизации микроорганизмов, то его адсорбционная способность была примерно такая, как и у глауконита. Вместе с тем, учитывая тот факт, что имеются сообщения о более высокой эффективности глауконита как удобрения по сравнению с бентонитом, а также то, что в Саратовской области имеются глауконитовые месторождения нами и был сделан выбор в пользу глауконита.

### **Иммобилизация микроорганизмов на глауконите.**

Получение сухих препаративных форм биопрепаратов в виде порошка осуществлялась путем культивирования микроорганизмов на соответствующих жидких питательных средах с дальнейшей иммобилизацией на глауконите и высушиванием в естественных условиях и при помощи роторно-вакуумного испарителя. Полученные образцы хранили при температуре 22-24 °С.

По результатам проведенных экспериментов было установлено, что наиболее оптимальными соотношениями в системе “биомасса: носитель (глауконит)” являются 1:2 и 1:4. Кроме того, оказалось, что порошковая форма биопрепаратов, полученная при высушивании в течение 24 часов при 22-24°С содержала больше живых микроорганизмов, чем порошок, полученный путем выпаривания на роторно-вакуумном испарителе в течение 40 мин при 40°С.

Учитывая тот факт, что одним из оптимальных соотношений в системе “биомасса: носитель (глауконит)” являются 1:4 нами были изготовлены глауконитовые гранулы на грануляторе. Процесс изготовления происходил в течение 10-15 мин., температура при изготовлении не более 40°С. Высушивание гранул проводили в течение 24 часов при 22-24°С.

Для создания микрокапсул был использован альгинат натрия – линейный гетерополисахарид морских водорослей, образующий вязкие растворы в концентрации 0,5-2% в присутствии ионов кальция. Так как гель образуется в мягких условиях он хорошо подходит для иммобилизации живых микроорганизмов.

Альгинатные микрокапсулы имеют ряд преимуществ – легко формируют оболочку вокруг бактериальной клетки, нетоксичны для организма, дешевы, обладают хорошими технологическими характеристиками (температура гелеобразования), легко высвобождают микроорганизмы.



Использование сорбента глауконита в составе капсул обусловлено тем, на его поверхности микроорганизмы образуют микроколонии, которые окружены гелем, что, очевидно повышает их устойчивость и активность.

Микрокапсулированную форму препарата, содержащего *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393 получали в соответствии с методикой. Соотношение “носитель (глауконит): биомасса” составляла 1:1 и 1:2. После этого помещали капсулы в стерильный 15% раствор глицерина и хранили в холодильнике. Спустя 4 месяца количество живых клеток *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393 в соотношении глауконит:биомасса 1:1 составляет не менее  $10^9$  КОЕ на мл. В то время, как жидкий препарат “Псевдобактерин-2” хранится в холодильнике не более 30 дней.

Микрокапсулированные формы препаратов, содержащих *Agrobacterium radiobacter* 204, *Rhizobium leguminosarum* биовар trifolii, *Flaviobacterium fulvum* L 30 получали в соответствии с методикой. Соотношение “носитель (глауконит): биомасса” составляла 1:1 и 1:2. Наиболее оптимальным является соотношение глауконит: биомасса 1:1. Количество жизнеспособных микроорганизмов составляет не менее  $10^9$  КОЕ на мл.

## Заключение

1. Из изученных потенциальных носителей для иммобилизации микроорганизмов наиболее оптимальным оказался глауконит порошок с размером частиц 60 мкм.

2. Изученные способы иммобилизации *Agrobacterium radiobacter* 204, *Rhizobium leguminosarum* биовар *trifolii*, *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393, *Flaviobacterium fulvum* L 30 на частицах глауконита для получения сухих препаративных форм биопрепарата показали, что оптимальными соотношениями при изготовлении сухих порошкообразных форм “биомасса:глауконит” являются 1:2 и 1:4, а при изготовлении сухих гранул на грануляторе 1:4.

3. При иммобилизации *Agrobacterium radiobacter* 204, *Rhizobium leguminosarum* биовар *trifolii*, *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393, *Flaviobacterium fulvum* L 30 в кальций-альгинатных капсулах с глауконитом оптимальными соотношениям “глауконит: биомасса” при изготовлении альгинатных капсул с глауконитом является 1:1.

4. Жизнеспособность бактериальных клеток *Agrobacterium radiobacter* 204, *Rhizobium leguminosarum* биовар *trifolii*, *Flaviobacterium fulvum* L 30, *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393, иммобилизованных на глауконите и микрокапсул на основе альгината кальция и глауконита, составила не менее 4 мес., в то время как исходные биопрепараты хранятся не более 1 мес.

