

AGRO bilim.kz



Министерство сельского хозяйства
Республики Казахстан

NASEC

НАЦИОНАЛЬНЫЙ АГРАРНЫЙ
НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР

АФ ТОО «Казахский научно-исследовательский институт
перерабатывающей и пищевой промышленности»

Лекционный материал вебинара на тему:

**Биологическое обеззараживание сахарной свеклы при
хранении**

Лектор: Қабылда Анар Идашқызы

Астана, 2023 год

ТЕМА ВЕБИНАРА: Биологическое обеззараживание сахарной свеклы при хранении

Қабылда Анар Идашқызы

кандидат сельскохозяйственных наук

**Астанинский филиал ТОО «Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности»,
руководитель проекта**

20.11.2023г.

11.00

Доклад вебинара

Цель – изучение биологической обеззараживания сахарной свеклы при хранении.

Актуальность. Одной из причин потерь урожая сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.*) и её сахаристости при хранении является деятельность микроорганизмов, вызывающих гниение корнеплодов. Всестороннее изучение симптомов гнилей корнеплодов сахарной свеклы показывает, что это многофакторное заболевание, в проявлении которого участвуют множество видов почвенной микрофлоры. Почти всегда поражение корнеплодов в кагатах вызывается не одним грибом или бактерией, а их комплексом, поэтому потери сахара и степень загнивания возрастают.

Кагатная гниль, прежде всего, поражает ослабленные корнеплоды: привяленные, подмороженные, раненые, а также пострадавшие от болезней листья и корни во время вегетации.

Потери урожая сахарной свеклы от этих болезней во многих регионах мира составляют в среднем от 5 до 20%. На отдельных сахарных заводах потери составляли до 30%. При количестве смеси гнилой массы 8-10% и больше заводы часто совсем не получают кристаллического сахара. При поражении маточной свеклы в период хранения существенно на 15-60% снижается выход годных к посадке корнеплодов и их продуктивность. Было установлено, что гнили корнеплодов в условиях юго-востока Казахстана являются одними из наиболее вредоносных болезней сахарной свеклы. Снижение урожайности корнеплодов в зависимости от сорта и насыщенности севооборота составляет в среднем 40-60%, а сахаристости - в среднем на 30-40%.

Итак, болезни сахарной свеклы являются фактором значительного снижения урожая и ухудшения его качества.

Комплекс защитных мероприятий включает обработку растений свеклы от вредителей и болезней в период вегетации, предохранение от механических повреждений при уборке, транспортировке и погрузке, защиту от подмораживания и подвяливания, тщательную браковку перед укладкой в кагаты, периодическое проведение мониторинга хранящихся корнеплодов, удаление очагов гнили.

Большое внимание уделяется организации защитных мероприятий, направленных на подавление жизнедеятельности патогенной микрофлоры в кагатах. С этой целью традиционно применяются химические средства, однако использование этих препаратов приводит к загрязнению корнеплодов остаточными количествами пестицидов, а также к снижению их товарных качеств, что инициирует поиск альтернативных способов защиты.

Однако в настоящее время в Казахстане нет зарегистрированных биопрепаратов для защиты сахарной свеклы от болезней при хранении, а применение импортных препаратов, не адаптированных к видовому составу возбудителей кагатной гнили, характерному для местных климатических условий, не всегда эффективно.

В этой связи выбранная тема исследования учеными КазНИИППП является перспективной и актуальной.

Научная новизна

Поиск антагонистов возбудителей заболеваний сахарной свеклы, хранящейся в кагатах на сахарных заводах Казахстана, научно обоснован. Полученные данные расширяют представление о биологических и технологических свойствах культур микроорганизмов, позволяют оптимизировать методические подходы при конструировании микробных композиций комплексных препаратов. Научная новизна заключается в том, что впервые на территории Республики Казахстан, при КазНИИППП в лаборатории микробиологии и биотехнологии разработан отечественный микробиологический препарат для обеззараживания сахарной свеклы от кагатной гнили.

Практическая значимость

Разработан комплексный биопрепарат против спектра возбудителей болезней хранящейся свеклы и разработаны рекомендации по длительному хранению. Отличием от зарубежных аналогов является то, что разработан препарат на основе микроорганизмов, выделенных на территории Республики, и он отработан на все инфекционные агенты, влияющие на хранение свеклы и вызывающие кагатную гниль.

Цель и задачи

1. Изучение мировых технологий хранения сахарной свеклы и последствий болезней при хранении с проведением патентного поиска.
2. Микробиологический анализ хранящейся свеклы на выявление возбудителей инфекций.
3. Поиск и скрининг культур микроорганизмов, перспективных в качестве средств защиты от заболеваний.
4. Изучение морфологических, биохимических, физиологических особенностей штаммов культур микроорганизмов. Генотипирование.
5. Разработка биопрепарата против возбудителей болезней хранящейся свеклы и рекомендации по безопасному длительному хранению.

Выбор направления исследований. Информационный анализ

За последнее десятилетие во многих странах значительно усилилось поражение корнеплодов сахарной свеклы гнилями, что, вероятно, как отмечают В.В. Гамуев, В.О. Гамуев (2004), обусловлено глобальными климатическими изменениями. Эта проблема усугубляется массовой экспансией сортов и гибридов западноевропейской селекции, которые обладают потенциально высокой продуктивностью, но не адаптированы к нашим условиям. В 2017 году Россия заняла первое место в мире по выращиванию сахарной свеклы. Второе место заняла Франция – 34,4 млн тонн, немного отстала Германия с производством 34 млн тонн. По его данным, на сегодня потребность Казахстана в сырье для выпуска сахара составляет 500 тыс. тонн, из этого объема Казахстан за счет сахарной свеклы, производимой внутри страны, обеспечивает себя лишь на 5 процентов. Оставшиеся 95 процентов – это завозной сахарный тростник [9].

Договором о Евразийском экономическом союзе от 29 мая 2014 года (далее – Договор) для реализации мер согласованной агропромышленной политики государств-членов ЕАЭС предусмотрено проведение регулярных консультаций представителей государств-членов Союза, в том числе по чувствительным сельскохозяйственным товарам и разработка рекомендаций (п. 2 статья 95 Договора). Сахар включен в перечень чувствительных сельскохозяйственных товаров, утвержденный Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 12 февраля 2016 г. № 66. Сахар одновременно является как товаром повседневного спроса населения, так и стратегическим продуктом, из которого формируются продовольственные запасы стран. Свекловичный жом – основной побочный продукт сахарной промышленности, используемый в составе рациона коров и молодняка крупного рогатого скота. Основными целями обзора сахарной отрасли государств – членов Союза за 2012 – 2016 гг. являются определение текущего уровня развития сахарной отрасли на фоне мировой конъюнктуры, выявление факторов, сдерживающих ее рост, перспективных направлений развития и кооперационного сотрудничества стран Союза посредством использования интеграционных преимуществ. В обзоре проанализированы показатели по всей производственной цепочке от получения сырья (сахарной свеклы и сахарного тростника) до переработки его в сахар белый, ресурсное обеспечение – семенами, удобрениями, средствами защиты растений, нормативно-правовое регулирование отрасли, оказываемые меры государственной поддержки, 5 показатели торговли, ценовая ситуация на рынке сахара, а также меры таможенно-тарифного и нетарифного регулирования. На основании проведенного анализа сформулированы общие выводы, ключевые задачи для будущего развития индустрии сахара, предложения по импортозамещению и развитию кооперационных связей стран ЕАЭС. Обзор подготовлен на основании официальной статистической информации государств-членов Союза и третьих стран, Статистического подразделения ФАО ООН, Организации экономического сотрудничества и развития, Министерства сельского хозяйства США, Евразийской сахарной

ассоциации и др. Материалы обзора могут быть использованы в качестве информационной базы при проведении консультаций и выработке рекомендаций по эффективному развитию сахарной отрасли. Мировое производство сахара белого базируется на двух видах сырья – сахарном тростнике и сахарной свекле. Объем урожая тростника и сахарной свеклы является определяющим фактором мировой конъюнктуры на рынке сахара наряду с уровнем мирового потребления и сохраняющихся переходящих запасов. Посевные площади, занятые под сахарным тростником, в течение 2012-2016 гг. расширились на 4,6 % до 27,3 млн. га, что при увеличении средней урожайности на 5,1 % позволило обеспечить рост производства тростника на 9,9 % до 1 879,2 млн. тонн. Производство сахарной свеклы в мире в течение 2012-2016 гг. уменьшилось – на 1,6 % до 265,0 млн. тонн. Снижение валовых сборов происходило в условиях сокращения посевных площадей на 8,2 % и роста урожайности культуры – на 6,9 %. География выращивания сахарного тростника в мире в основном сосредоточена в странах Южной Америки, Юго-Восточной Азии, Южной Азии, сахарной свеклы – на Европейском континенте, Юго-Западной Азии. Крупнейшими странами, выращивающими сахарный тростник, являются Бразилия и Индия, удельный вес которых в общемировом сборе составил по итогам 2012-2014 г. составил 59 %. Производство сахарной свеклы в мире более диверсифицировано по странам. Странами-лидерами являются страны Европейского союза, Россия, США, Турция – около 70% мирового производства этой культуры. Основные производители сахарного тростника и сахарной свеклы в мире в среднем в 2012-2014 гг. сахарный тростник сахарная свекла. Важнейшим производителем сахарной свеклы является Европейский союз. Посевные площади под этой культурой превышают 1,6 млн. га. Значительное сокращение посевных площадей (на 22 %) отмечено в 2015 году, когда их размер составил 1 430 тыс. га. Наибольшие посевные площади под данной культурой расположены в Германии, Франции и Польше, 40% 19% 7% 5% 3% 3% 23% Бразилия Индия Китай Таиланд Пакистан Мексика Другие 45% 15% 11% 6% 6% 17% Европейский союз Россия США Турция Украина Другие 8 причем наблюдается тенденция концентрации посевов сахарной свеклы преимущественно в этих странах. Наиболее интенсивно развивается отрасль свеклосеяния в таких государствах как Франция, Испания и Бельгия, о чем свидетельствуют полученные урожаи культуры с 1 га – более 850, а во Франции – более 900 ц/га. Высокие удельные валовые сборы корнеплодов наряду с наибольшей посевной площадью возделывания позволяют получать во Франции колоссальные объемы сахарной свеклы – более 30 % общесоюзного сбора ежегодно. Последующими этапами переработки сахарного тростника и свеклы является получение сахара-сырца и альтернативного топлива – биоэтанола. Бразилия – один из основных производителей этого топлива в мире. В период 2012-2015 маркетинговых годов доля сахарозы, 9 выделенной из сахарного тростника на производство сахара-сырца, снизилась с 49,5 % до 40,5 %. Такие страны как Бразилия и

Таиланд, имея ярко выраженную специализацию производства, являются крупнейшими экспортерами сахара-сырца в мире.

Корень свеклы содержит 75% воды, около 20% сахара и 5% целлюлозы. Точное содержание сахара может варьироваться от 12% до 21% сахара, в зависимости от сорта и условий выращивания. Сахар является основной ценностью сахарной свеклы в качестве товарной культуры. Целлюлозы, нерастворимые в воде, и в основном состоят из целлюлозы, гемицеллюлоз, лигнина и пектина, используются в корме для животных. Побочные продукты сахарной свеклы, такие как целлюлозы и патоку, добавить еще 10% к стоимости урожая.

Сахарная свекла растет исключительно в умеренной зоне, в отличие от сахарного тростника, который растет исключительно в тропических и субтропических зонах. Средний вес сахарной свеклы колеблется в пределах от 0,5 до 1 кг (1,1 и 2,2 фунтов). Сахарная свекла листва имеет богатый, блестящий зеленый цвет и растет на высоту около 35 см (14 дюйма). Листья многочисленные и широкие и растут в хохолке макушке свеклы, которая, как правило, на одном уровне с или чуть выше поверхности земли.

Большой проблемой на посевах свеклы в последние годы стали корневые и прикорневые гнили, приводящие к значительным потерям урожая и сводящие на нет все усилия аграриев.

Корневые гнили вызывают несколько видов фитопатогенных грибов (родов *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Phoma*), обитающих в почве и сохраняющихся в почве и растительных остатках. Наиболее распространенными и вредоносными являются фузариозная, гельминтоспориозная, церкоспореллезная и офиоболезная корневые и прикорневые гнили. На одних и тех же посевах можно обнаружить несколько видов возбудителей заболеваний.

Распространение корневых гнилей бывает неравномерным. Болезнь может являться причиной уменьшения всходов, ухудшения их качества, и в годы сильного развития корневых гнилей потери могут составлять 15-40%. Различные виды заболевания вызывают сходные симптомы поражения.

Болезнь проявляется чаще при насыщении севооборота сахарной свеклой, что особенно актуально для профилирующих предприятий, которые регулярно выращивают сахарную свеклу. Правильное чередование культур в севообороте является основным профилактическим средством против гнилей корней и других болезней. Возвращать свеклу на прежнее поле можно не ранее как через 3-4 года.

Чрезмерное внесение в почву минеральных азотных удобрений также стимулирует образование корневых гнилей свеклы. Как уже указывалось, кагатную гниль вызывают сапротрофные грибы и бактерии, поэтому в возникновении и развитии болезни основную роль играют условия выращивания, уборки, транспортировки и хранения корнеплодов. К неблагоприятным для хранения свеклы факторам относятся:

1. Ослабление растений в период вегетации в результате воздействия болезней: мозаики, церкоспороза, ложной мучнистой росы, ржавчины, а также вследствие механических повреждений листьев и повреждения их насекомыми.
2. Ослабление корнеплодов при уборке и хранении в результате привяливания, механических повреждений, подмораживания и т. п.
3. Развитие микроорганизмов - возбудителей кагатной гнили.
4. Неблагоприятные внешние условия (высокие или низкие температуры, высокая влажность).

Возникновению и развитию кагатной гнили способствует ослабление растений, а также корней, предназначенных для хранения. Так, свекла с плантаций, сильно пораженных церкоспорозом и другими болезнями, поражается кагатной гнилью при хранении сильнее, чем здоровая. Об этом свидетельствуют опыты ученых Белоцерковской и Несвижской опытно-селекционной станции сахарной свеклы.

Кагатная гниль сахарной свеклы – болезнь, которую вызывают различные почвенные грибы и пектолитические бактерии. Главную роль в заражении и развитии болезни играют грибы. Состав патоконплекса зависит от региона свеклосеяния и наличия патогенов в почве.

Симптомы заболевания. Болезнь сопровождается отмиранием и разложением тканей корнеплодов. Загнившие участки, а также целые корнеплоды покрываются плесенью различного цвета: красной, серой, белой, черной, голубой, розовой и так далее. Загнившая ткань приобретает сероватую, бурю или черную окраску. Ткани корнеплодов теряют прочность, легко разрушаются, быстро подсыхают при сухой гнили или ослизняются при образовании мокрой гнили[13].

Чаще всего образуется красная и бурая гнили (грибы рода *Rhizoctonia*), фузариозная гниль (грибы рода *Fusarium*), немногим реже – сухой склероциоз, парша, туберкулёз корня, хвостовая гниль, душлистость, гниль сердечка. Гниль в хранилищах может вызывать один вид микроорганизмов, но обычно присутствует комплекс патогенных и сапротрофных видов. Поражённые кагатной гнилью корнеплоды плохо хранятся[14].

Тип гнили зависит от возбудителя, вызвавшего ее, и условий хранения. Возбудителей насчитывается более 150 видов из различных родов. Состав патогенного комплекса возбудителей заболевания зависит от множества различных факторов, в том числе и от срока хранения.

Морфология. Основные возбудители заболевания – виды родов *Botrytis*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*. В частности, идентифицируются: *Botrytis cinerea Pers.*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium gibbosum*, *Penicillium viridicatum*, *Rhizoctonia solani*, *Phoma betae*.

Botrytis cinerea Pers – образует на корнеплодах серый пушистый налет из конидиеносцев и конидий с мелкими темными склероциями.

Fusarium solani, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium gibbosum* – вызывают фузариозную гниль, характеризующуюся розоватым или белым налетом, формирующимся внутри (в полостях) или на поверхности загнившего корнеплода. Налет состоит из мицелия, конидиеносцев, конидий. Последние многоклеточные, серповидные, бесцветные.

Penicillium viridicatum – образует зелено-сизый налет, формируются конидиеносцы с кистевидно разветвленными верхушечными ветвями, несущими цепочки мелких, округлых, бесцветных спор, диаметром 2–4 мкм.

Rhizoctonia solani – обнаруживается под микроскопом на срезах пораженной ткани в виде утолщенных коленчато-изогнутых гиф светло-коричневой окраски.

Phoma betae – формирует у корнеплодов сухую черную гниль. Патоген вызывает корнеед и фомоз листьев свеклы.

Кагатная гниль поражает корнеплоды при хранении маточной и фабричной свеклы.

Иногда заболевание проявляется в период вегетации и продолжает развитие при хранении в кагатах или буртах. Здесь инфекция от зараженных корнеплодов передается к здоровым, особенно при механических травмах последних. Во второй половине зимнего хранения, на ослабленных грибами и потерей тургора корнеплодах развивается бактериальная гниль.

В возникновении заболевания главную роль играет физиологическое состояние, закладываемой на хранение свеклы. Ослабление корнеплодов и снижение их устойчивости к воздействию патогенов является результатом болезней, перенесенных в течение вегетационного периода, подвяливания, подмораживания, механических повреждений. Различные части корня имеют неодинаковую устойчивость к гнили. Наиболее устойчивой является его головка, самой поражаемой – хвостовая часть. В средней части присутствуют три зоны с различной степенью устойчивости.

Неправильные условия хранения корнеплодов: нарушение температурного режима (высокая или низкая температура), низкая влажность в буртах, ведущая к привяливанию корней, способствуют развитию гнили. Установлено, что оптимальной температурой для хранения корнеплодов свеклы является диапазон от +1°C до минус 2 °C. Активность грибов усиливается с повышением кислотности среды. Развитие бактерий провоцирует щелочная среда.

Географическое распространение. Кагатная гниль – распространена во всех регионах выращивания сахарной свеклы. Интенсивнее всего развивается в южных районах свеклосеяния (Средней Азии).

Кагатная гниль – вредоносное заболевание, которое вызывает качественные и количественные потери сахарной свеклы в период хранения. Гнилая масса, содержащая продукты разложения белков, углеводов, пектиновых веществ, при попадании на сахарные заводы вместе со здоровыми корнеплодами нарушает технологию производства. Пораженную свеклу

нельзя использовать как корм для скота, поскольку это приводит к различным заболеваниям желудочно-кишечного тракта.

Комплекс защитных мероприятий включает обработку растений свеклы от вредителей и болезней в период вегетации, предохранение от механических повреждений при уборке, транспортировке и погрузке, защиту от подмораживания и подвяливания, тщательную браковку перед укладкой в кагаты, периодическое проведение мониторинга хранящихся корнеплодов, удаление очагов гнили.

Большое внимание уделяется организации защитных мероприятий, направленных на подавление жизнедеятельности патогенной микрофлоры в кагатах. С этой целью традиционно применяются химические средства, однако использование этих препаратов приводит к загрязнению корнеплодов остаточными количествами пестицидов, а также к снижению их товарных качеств, что инициирует поиск альтернативных способов защиты.

Использование метода биологического контроля фитопатогенов в качестве альтернативы химическому позволяет обеспечить эффективную защиту корнеплодов и получить экологически безопасную продукцию. Однако в настоящее время в РК нет зарегистрированных биопестицидов для защиты сахарной свеклы от болезней при хранении, а применение импортных препаратов (планриз, бактофит, фитоспорин М), не адаптированных к видовому составу возбудителей кагатной гнили, характерному для климатических условий РК, не всегда эффективно.

Использование метода биологического контроля фитопатогенов, в качестве альтернативы химическому методу, позволяет обеспечить эффективную защиту корнеплодов и получить экологически безопасную продукцию на основе культур микроорганизмов. Их основой является антагонизм.

В литературе известны данные об эффективности применения против возбудителей гнилей овощей бактерий и дрожжей-антагонистов, таких как *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas cepatica*, *Pseudomonas syringae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Debaryomyces hansenii*. В патенте США 4764271 описан штамм *Bacillus subtilis*, бесклеточная культуральная жидкость которого благодаря антибиотической активности ингибирует развитие коричневой плесени на фруктах. Украинскими учеными также разработан препарат против возбудителей болезней овощных культур на основе бацилл. Выделены бактерии рода *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, отличающиеся способностью к подавлению роста грибов-фитопатогенов при низких температурах, характерных для условий содержания овощной продукции в хранилищах.

На территории Российской Федерации для снижения развития и распространения гнилостных процессов на различных сортах сахарной свеклы в условиях кагатов, против возбудителей кольцевой гнили картофеля, мягких гнилей картофеля и капусты применяются препараты Фитоспорин, Фитоспорин М, Бактофит, Бацилихин, основу которых составляют бактерии

33 *Bacillus subtilis*.

Российскими учеными против кагатной гнили сахарной свеклы также рекомендован препарат «Планриз». Его основой является штамм *Ps. fluorescens* AP-33. Белорусскими исследователями показана целесообразность использования бактерий-антагонистов рода *Bacillus* для биологической защиты сахарной свёклы в процессе хранения. В качестве основных критериев отбора штаммов-продуцентов предлагаются следующие: высокая антагонистическая активность к видовому составу возбудителей кагатной гнили, характерному для климатических условий Беларуси; способность к росту на относительно дешевых и простых по составу питательных средах; высокая скорость роста и активное спорообразование; способность развиваться в диапазоне температур от плюс 4°C до 10°C, соответствующих условиям хранения корнеплодов в кагатах или буртах в осенне-зимний период; устойчивость к щелочной реакции среды (рН 8 и более), что обеспечивает возможность совместной обработки корнеплодов химическим (известью) и биологическим препаратами.

Разработка технологий получения микробных препаратов на основе бактерий-антагонистов основывается на знании физиологических особенностей штаммов и изучении условий интенсификации ростовых процессов, к которым относятся компоненты питательной среды и их количественное соотношение, а также условия выращивания. Оптимальное соотношение всех параметров культивирования в значительной мере предопределяет способность микроорганизмов к синтезу биологически активных веществ с антимикробными свойствами.

В свете вышеуказанного, исследования по разработке отечественных технологий получения и применения биопрепаратов для защиты сахарной свеклы от кагатной гнили приобретают особую актуальность.

Научная новизна и практическая значимость научного исследования заключается в том, что впервые с учетом особенностей видового состава и патогенных свойств возбудителей, распространенных в условиях Республики Казахстан, разработан отечественный микробиологический биопрепарат для обеззараживания сахарной свеклы от кагатной гнили – биопрепарат «ИзАрКаИм». Применение биопрепарата обеспечивает снижение потерь при хранении.

В работе были использованы штаммы бактерий, выделенные с сахарной свеклы гибрида Аксу, п. Алмалыбак, Карасайский район (опытное поле КазНИИЗиР) и свеклы с кагатов Коксуйского сахарного завода (Алматинская область). В качестве тест-культур –микроскопические грибы, бактерии, дрожжи, эндобактерии, выделенные из сахарной свеклы.

Метод получения накопительных культур

Накопительными называют культуры, в которых преобладают представители близких видов или даже одного вида микроорганизмов. Из накопительных культур выделяют чистые культуры. Для получения накопительных культур создают условия, которые обеспечивают

преимущественное развитие интересующих исследователя микроорганизмов. Для этого, прежде всего, используют специфические избирательные среды, которые наиболее полно удовлетворяют физиологические потребности в источниках питания определенных групп микроорганизмов. Важные факторы, влияющие на получение накопительной культуры: реакция среды (рН), температура, наличие или отсутствие кислорода, устойчивость к антибиотикам и некоторым другим соединениям. В результате повторных пересевов на одну и ту же селективную среду, и создания благоприятных условий для видов культура постепенно обогащается микроорганизмами с желаемыми свойствами и обедняется сопутствующими формами.

Выделение чистой культуры

Выделение чистой культуры включает три этапа: получение накопительной культуры; выделение чистой культуры; определение чистоты выделенной культуры.

Чистота выделенной культуры микроорганизмов должна быть тщательно проверена. При визуальном контроле просматривается рост микроорганизмов по штриху на поверхности скошенной среды. Если рост по штриху неоднороден, культура загрязнена.

Чистую культуру микроорганизмов обязательно нужно контролировать под микроскопом и проверять высевом на питательные среды.

Для выделения различных микроорганизмов будут использованы различные питательные среды (для бактериальных и грибковых культур микроорганизмов): МПА, сусло-агар, Эндо, Чапека.

Если в полученной колонии ассоциации микроорганизмов, что видно при микроскопии, необходимо провести мероприятия по выделению их отдельно в культуру.

Оценка биосовместимости культур микроорганизмов

Исследование биосовместимости МКБ и бацилл проводили методом совместного культивирования Глушановой Н.А. на плотной питательной среде МРС и МПА.

Каждый опыт ставят в двух повторностях, меняя положение культур (для исключения влияния последовательности наслаения капель на характер роста в зоне совместного культивирования). Контролем служила капля одной и той же культуры, наслаенные друг на друга по описанной выше методике.

Учет результатов проводили через 24 и 48 часов после начала инкубации. При задержке роста одной из исследуемых культур взаимоотношения между ними рассматриваются как антагонистические, а сами культуры относят в категорию бионесовместимых. Культуры считаются биосовместимыми в случае обнаружения полного «слияния» пятен, или усиления роста исследуемых штаммов в зоне совместного культивирования. Если одна из культур в зоне совместного культивирования «выходит наверх», подавляя рост второй культуры, независимо от последовательности нанесения, такой вариант расценивают как слабый антагонизм.

Наличие хорошо выраженной зоны угнетения (задержки рост) одной культуры по периферии пятна другой испытуемой культуры расценивают как признак сильного антагонизма. Опыт проводят в трехкратной повторности.

Для выявления биосовместимости культур лактобацилл в консорциуме был использован метод перпендикулярных штрихов на плотной питательной среде. Для этого на агаризованную среду МРС-4 в чашке Петри высевались штрихом двухсуточные бульонные культуры лактобацилл по диаметру чашки, инкубировали в течение 48 часов при 37°C. Затем, перпендикулярно к его штриху подсевали штрихами остальные исследуемые лактобациллы. Для посева использовались густые суспензии культур. Чашки выдерживали в термостате при 37°C в течение 48 часов.

Если культуры растут вблизи друг друга, то лактобациллы не проявляют антагонизм между собой.

Метод диффузии в агар

Метод является фармакопейным биологическим методом определения активности антибиотиков, основанном на способности молекул субстанций антибиотиков диффундировать в агаровых средах и образовывать зоны угнетения, в которых не развиваются используемые тест-микроорганизмы, чувствительные к испытуемому антибиотику. Принцип метода – логарифмическая зависимость степени угнетения роста тест-микроорганизма от концентрации антибиотика. При этом линейная зависимость наблюдается лишь в определенных пределах концентраций антибиотика. Биологические методы рекомендованы для количественного определения таких антибиотиков и их лекарственных форм, активность которых невозможно корректно оценить при помощи химических методов. Снижение активности антибиотиков приводит к изменениям, которые невозможно обнаружить химическими методами, поэтому микробиологические или биологические испытания рекомендованы в качестве стандартных методов при подозрении на уменьшение активности антибиотиков

Методы хранения

Хранение микроорганизмов будет осуществляться согласно общепринятым методам: субкультивирование на скошенных агаризованных средах, под минеральным маслом, методом криоконсервации.

В 2020 году вместе с коллективом сотрудников лаборатории «Микробиология и биотехнология» Астанинского филиала ТОО «Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности»: заведующей лабораторией, доктором биологических наук Арыновой Р.А., главным научным сотрудником, кандидатом сельхоз наук Кабылдой А.И., научным сотрудником, магистром биологии Иманбаевой М.К. была работа по изготовлению биологического препарата для обеззараживания сахарной свеклы при хранении в кагатах. Работа проводилась непосредственно под научным руководством доктора технических наук, академика НАН РК, профессора Алматинского технологического университета Изтаева А.И.

Определение патогенности или класса опасности бактерий-

антагонистов *Bacillus holotolerans* и *Enterobacter kobei* дает возможность безопасного дальнейшего использования материала для изготовления биологического препарата. Патогенность - это генетически детерминированная, потенциальная способность микроорганизма конкретного вида вызывать или не вызывать при попадании в организм человека инфекцию.

В 2020 году при исследовании патогенности штаммов *Bacillus* 7В (36Б) и *Enterobacter kobei* 8В (39Б) было проведено определение класса опасности.

Исследование активных штаммов по отношению к источникам углерода и азота

Оптимизация состава питательной среды и условий культивирования позволяет более полно реализовать потенциальные возможности бактерий-антагонистов и повысить их фито защитный потенциал [36]. При проведении работ по оптимизации питательной среды для культивирования микроорганизмов большое внимание уделяется выбору источников углерода и азота. Бактерии рода *Bacillus* способны утилизировать разнообразные углеводы, накапливая биомассу и продуцируя метаболиты, обладающие фито защитными свойствами. Однако не все источники углерода одинаково благоприятствуют активному росту бактерий и образованию антимикробных веществ. Легкоусвояемые углеводы способствуют быстрому росту культуры, но могут ингибировать биосинтез антибиотических веществ. Показано, что фруктоза и сахароза являются более предпочтительными источниками углерода для синтеза антибиотика бактериями *B. subtilis*, чем глюкоза [38,39].

Азотистые соединения также по-разному влияют на рост и антагонистическую активность аэробных спорообразующих бактерий. Различные виды бактерий рода *Bacillus* неодинаково относятся к источникам азота: для одних наиболее легко усвояемыми формами азота являются аммонийные соли и аминокислоты, в которых азот находится в восстановленной форме, другие с успехом могут использовать и окисленные формы азота, некоторые из них для биосинтеза антибиотика нуждаются именно в нитратном источнике азота.

Для получения результатов влияния соля NaCl на рост и размножение бактерии проводилась следующая экспериментальная работа.

Из чашки Петри с выросшими *Bacillus mojavensis* (72 часа в термостате) с добавлением дистиллированной воды собрали биомассу бактерии в одну стерильную колбу (рисунок 7)



Процесс сбора бактерии *Bacillus mojavensis* с поверхности твердой питательной среды МПА

Для чистоты эксперимента, перед началом самой работы были определены количество КОЕ в данной питательной среде путем взятия образца и посева на твердую питательную среду. Для определения NaCl на рост и размножения бактерии была взята 5 разных концентрации: 1,3,5,7%. Для приготовления данных концентрации на 100 мл жидкую питательную среду МПБ с бактериями было добавлено 1,3,5 и 7 г NaCl. В качестве контрольного образца была взята МПБ без бактерии.

Проанализировав результаты, можно сделать вывод, что оптимальным количеством соли NaCl для роста бактерии *Bacillus mojavensis* является 3%, где можно увидеть наибольшее количество КОЕ($5,30 \times 10^8$). Также, продержав бактерии при 37°C 72,120,168 часов, можно наблюдать максимальное количество бактерии на 72 часу($5,30 \times 10^8$).

Определение оптимального температуры для роста бактерии *Bacillus mojavensis*

Жизнь организмов определяется температурой больше, чем каким-либо фактором внешней среды, в связи с тем, что все организмы построены из химических компонентов и все процессы жизни происходят на основе химических реакций, подчиненных законом термодинамики. Температура действует не только на скорость химических реакций, но также является причиной структурной перестройки протеинов, фазовых перемещений жиров, изменения структуры воды. Температурная амплитуда биохимической активности относительно мала в связи с специфическими свойствами биомолекул. Витальная температурная зона, в пределах которой осуществляется активная жизнедеятельность микроорганизмов, за некоторым исключением, укладывается в рамки от 0° до $50-60^\circ\text{C}$. По

отношению к температурным условиям микроорганизмы разделяют на мезофильные, психрофильные и термофильные.

Таблица 6 - Динамика роста штамма *Bacillus Mojavensis* при оптимального температурного режима 24-25 °С

t- 24-25 °С	Час		
	72	120	168
<i>Bacillus Mojavensis</i>	$(6,30 \pm 0,33) \times 10^9$	$(2,15 \pm 1,0) \times 10^8$	$(1,65 \pm 0,72) \times 10^7$

Изучение влияния температуры на рост *Bacillus Mojavensis* показало, что они являются мезофиллами, интенсивный рост показала через 72 часа, где количество КОЕ $(6,30 \pm 0,33) \times 10^9$. Как видно с результатов через 120 и 168 часов, через в данное отрезок времени снижается естественный рост бактерии, что привело к снижению КОЕ.

Определение оптимального диапазона кислотности среды для *Bacillus Mojavensis*

Кислотность среды, в которой обитают микроорганизмы, оказывает на них большое влияние. Это один из наиболее важных факторов, определяющих рост и размножение микроорганизмов, так как он действует на организм непосредственно или косвенно через ионное состояние и доступность многих ионов и метаболитов, стабильность макромолекул. Значения реакции среды определяют состояние веществ в окружающей среде.

Изучение динамики роста культуры микроорганизмов *Bacillus Mojavensis* при разных значениях pH показало, что среда с pH 7 наиболее благоприятна для роста этого штамма *Bacillus Mojavensis*.

Изучение активности штамма бактерии *Bacillus Mojavensis*, как основу для создания биопрепарата

Из выбранных бактерий был отобран более активный штамм *Bacillus Mojavensis* 5В, так как он по литературным данным является непатогенным для человека. *Bacillus Mojavensis* (1В, 5В, 5В) имеют широкий спектр действия против патогенных грибов и бактерий, повышают урожайность растений.

Для определения активности штамма в лабораторных условиях, изучали как влияние *Bacillus Mojavensis* (5В) на мицелий патогенного гриба *Fusarium oxysporum* взятого непосредственно с сахарной свеклы, привезенных с опытного хозяйства.

Получение жидкой формы биопрепарата на основе *Bacillus Mojavensis*

Получение жидкой формы биопрепарата «ИзАрКаИм» производилась в лаборатории микробиологии и биотехнологии на ферментере вместимостью 1250 мл. Ферментер подготовили к работе в соответствии с «Технологической

инструкцией по подготовке и проведению режима культивирования микроорганизмов в биореакторах фирмы «IKA MVP 10 basic».

Получение биопрепарата проводили в ферментере при температуре $(24\pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 120 часов.



Процесс получения биопрепарата «ИзАрКайМ» на ферментере «IKA MVP 10 basic»

Контроль температуры и рН в процессе культивирования велись по показаниям приборов на дисплее пульта управления. Процесс культивирования проводили при постоянном перемешивании, скорость вращения мешалки составляет (50 ± 1) об/мин. Поддержание газообмена культуры осуществляли при помощи аэрации стерильным воздухом, расход воздуха составляет 0,5л/мин/1л среды (до 4 часов роста) и 1л/мин /1л среды (после 4 часов роста).

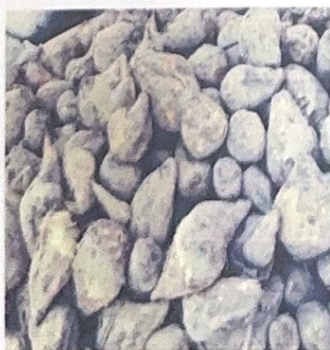
По окончании процесса культивирования, полученный биопрепарат разлиты в емкости вместимостью 50 мл и оставлены для хранения при $+4^{\circ}$.



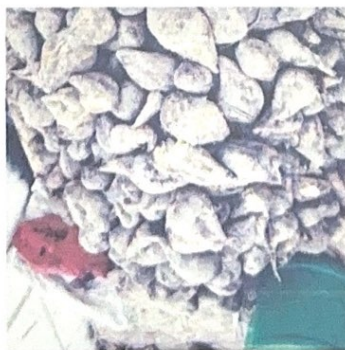
Процесс получения конечного результата

Расширенное лабораторное косвенно-производственное испытание

В лабораторий микробиологии и биотехнологии вместе с лабораторными испытаниями были проведены косвенно-производственное испытание, для определения влияния биопрепарата на сахарную свеклу в длительное время (6 месяцев). В работе были использованы сахарной свеклы гибрида Аксу, п. Алмалыбак, Карасайский район (опытное поле КазНИИЗиР) и свеклы с кагатов Коксуйского сахарного завода (Алматинская область) .



1 группа - опытная
с *Bacillus mojavensis*



2 группа – контроль 1
с биопрепаратом
Фитоспорин-М



3 группа – контроль 2
необработанная
биопрепаратом

Сахарная свекла, использованная для испытания

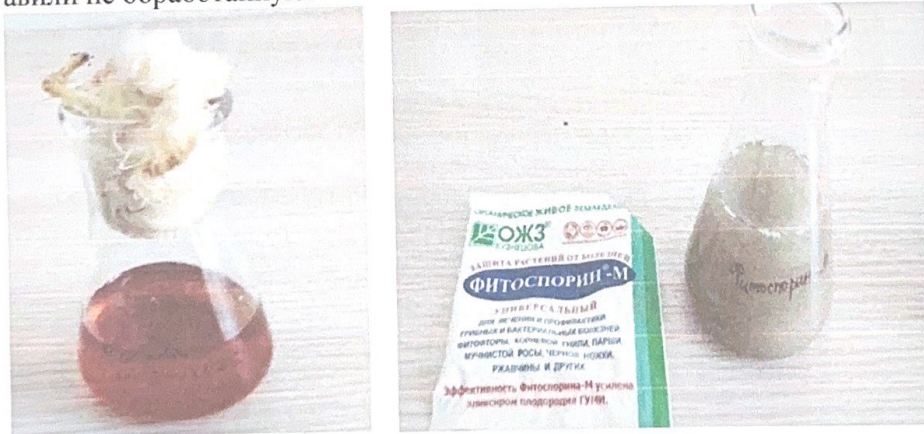
Для работы взяли по два испытательного образца сахарной свеклы. Всю свежеприготовленную партию сахарной свеклы взвесили и поделили на 3 группы: 1 группу опытную обработали с *Vacillus mojavensis*; 2 группу – контрольную 1 обработали биопрепаратом Фитоспорин-М; 3 группу использовали как контрольную 2 необработанную биопрепаратом, откуда были взяты пробы для лабораторного анализа:

1 группа - 1300 гр;

2 группа - 1350 гр;

3 группа - 1100 гр.

Пронумеровав группы на этикетках, начали обработку 1 опытной и 1 контрольной 1 групп. Для обработки 1 группы взяли заранее приготовленную жидкую питательную среду (МПБ) *Vacillus mojavensis*-10⁸. Для обработки 2 группы взяли 2 грамма сухого порошка биопрепарата «Фитоспорин-М» разбавили на 100 мл в воде (80⁰С) на 5 минут, затем остудили до 25⁰С, 3 группу оставили не обработанную.



Готовые суспензии для обработки

Сахарная свекла была обработана пульвизатором, опрыскивался со всех сторон.



Процесс обработки сахарной свеклы

Обработанные образцы были оставлены при 25⁰С на длительное время – на 6 месяцев. Непосредственно после обработки были сделаны фотографии для дальнейшего визуального анализа .



1 группа - опытная
с *Bacillus thuringiensis*

2 группа – контроль 1
с биопрепаратом
Фитоспорин-М

3 группа – контроль 2
необработанная
биопрепаратом

Образцы сахарной свеклы, подготовленные для эксперимента



1 группа - опытная
с *Bacillus mojavensis*

2 группа – контроль 1
с биопрепаратом
Фитоспорин-М

3 группа – контроль 2
необработанная
биопрепаратом

Фотографии сахарной свеклы сразу после обработки

После 2,4,6 месяцев хранения данные образцы были визуально осмотрены, сфотографированы для сравнения.



1 группа - опытная
с *Bacillus mojavensis*

2 группа – контроль 1
с биопрепаратом
Фитоспорин-М

3 группа – контроль 2
необработанная
биопрепаратом

Фотографии сахарной свеклы после 2 месяцев



Handwritten signature

1 группа - опытная
с *Bacillus mojavensis*

2 группа – контроль 1
с биопрепаратом
Фитоспорин-М

3 группа – контроль 2
необработанная
биопрепаратом

Фотографии сахарной свеклы после 4 месяцев

Проанализировав полученные результаты, можно сделать вывод, что биопрепарат «ИзАрКаИм» соответствует заявленным требованиям и дает возможность рекомендовать его в качестве биопрепарата, обеззараживающего кагатную гниль сахарной свеклы.

Получение сухой формы биопрепарата «ИзАрКаИм» в лабораторных условиях

Одним из путей повышения стабильности и эффективности действия биологических средств защиты растений является научно аргументированный подбор их компонентного состава, основанный на понимании механизмов действия вносимых добавок. Многие биопрепараты, созданные на основе микроорганизмов, высокочувствительны к различным факторам окружающей среды, таким как солнечный свет, высушивание, перепады температур, критические значения рН. Защитить клетки продуцента от их негативного влияния можно путем добавления в препарат определенных компонентов-протекторов. Доказано положительное влияние неорганических минеральных добавок на жизнеспособность и антагонистическую активность бактерий рода *Bacillus* и эффективность биопрепаратов на их основе.

Иммобилизация бактерий на минеральном носителе обеспечивает им дополнительную механическую защиту, предотвращает агрегирование спор и обуславливает стабильность биопрепаратов при хранении. Кроме того, многие микро- и макроэлементы, входящие в состав минеральных протекторов, становятся более доступными для растений при их совместном внесении в почву с биопрепаратами [43].

Большинство биопрепаратов на основе клеток бактерий рода *Bacillus* выпускаются в виде жидкости, текучей пасты или смачивающегося порошка. Жидкая форма удобна для применения, но, как правило, имеет небольшой срок годности, занимает много места при хранении и транспортировке. Кроме того, эта форма обладает существенным недостатком при внесении в грунт или на поверхность растения: клетки штамма – продуцента биопрепарата не защищены от воздействия внешних физических факторов и микроорганизмов, которые уже колонизировали субстрат до внесения биопрепарата. Паста обладает лучшей эффективностью, чем жидкая форма, за счет более высокой концентрации клеток на единицу объема, но также имеет небольшой срок хранения. Сухие формы биопрепаратов (порошок, смачивающийся порошок, таблетки) характеризуются большим сроком хранения и являются наиболее

перспективными ввиду удобства их применения и простоты транспортировки

В лаборатории микробиологии и биотехнологии для получения сухой формы биопрепарата (порошкообразный) была проделана следующая экспериментальная работа: как основа для биопрепарата жидкая среда-МПБ и для определения КОЕ бактерии был использован Мясо-пептонный агар(твердая среда)

Установлено, что с 350 мл КЖ после сушки вышло 14 грамма сухого вещества. Итого 21 грамма, из них 7 грамма минеральной добавки.



Процесс получения конечного результата, биопрепарата «ИзАрКаИм»

Проанализировав полученные данные, можно сделать вывод: в образцах с доломитовой мукой и CaCO_3 количество живых клеток не менее 2 млрд/г, что не уступает аналогичному биопрепарату «Фитоспорин-М».

Рекомендации фермерам

Для обеззараживания корнеплодов сахарной свеклы от кагатной гнили нами отобран штамм бактерии *B. mojavensis*. Б 5 с высокой антагонистической активностью в качестве основы биопрепарата «ИзАрКаИм». Выявлено, что метаболиты бактерии-антагониста влияют на нарушении прорастания спор и развития мицелия фитопатогенных грибов.

В процессе исследований отработана технология получения биопрепарата «ИзАрКаИм». Оптимизирована питательная среда для глубинного культивирования *B. mojavensis*. Б 5 в лаборатории: на 1000 мл воду добавляется пептон-2г, NaCl-1г, мясной экстракт-5г. pH 7,4 и условия

культивирования – наиболее благоприятный температурный режим для роста бактерий и синтеза антимикробных метаболитов достигается при 24°C. Установлено, что нейтральная реакция среды является оптимальной для роста и проявления максимальной антагонистической активности бактерий *B. tojavensis*. Б 5.

Перед использованием препарат рекомендуется подогреть до температуры +35°C и выдержать данную экспозицию в течение двух часов.

Биопрепарат «ИзАрКайм» не проявляет вирулентных, токсигенных и токсических свойств, не обладает раздражающим кожу и слизистые оболочки действием и может быть рекомендован для промышленного производства. Биопрепарат «ИзАрКайм» не фитотоксичен. При работе, транспортировке и хранении биопестицида следует соблюдать меры личной гигиены и требования техники безопасности. Специальных мероприятий по обезвреживанию биопрепарата не требуется.

Использованные пакеты утилизировать с бытовыми отходами.

