

УДК 579.64:631.533

DOI: 10.5281/zenodo.7898471

EDN DRAHTF

Могилевская И. В.

**ЭФФЕКТИВНЫЕ СТЕРИЛИЗУЮЩИЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ  
МИКРОБНОГО РОСТА НА ЭКСПЛАНТАХ *ROBINIA PSEUDOACACIA L.*  
*IN VITRO***

ФГБУН «Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук»

**Реферат.** Наличие зараженности эксплантов после их стерилизации распространенными дезинфицирующими агентами – гипохлоритом натрия («Белизна»), раствором перекиси водорода ( $H_2O_2$ ), нитратом серебра ( $AgNO_3$ ) делает актуальным изучение возможности применения биоцидов широкого действия для подавления роста микроорганизмов. Лабораторными методами были выделены пять чистых штаммов с модельных объектов робинии псевдоакация (*Robinia pseudoacacia L.*). Цель исследований – определение эффективности биоцидов химического происхождения *in vitro* против некоторых видов микроорганизмов на *R. pseudoacacia*. Исследования выполнены в 2021–2022 гг. в лаборатории биотехнологий ФГБУН «Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук». Объекты исследований: чистые штаммы культур, выделенные с зараженных эксплантов *R. pseudoacacia*. Изучено влияние препаратов на рост выделенных чистых штаммов, используемых в стандартных протоколах для стерилизации *R. pseudoacacia*, и впервые предложенных для подавления роста: «Дезовер», 5 %, «Proxel GXL», 2 % и 5 %, «Дезавид». Для всех используемых препаратов определена средняя зона задержки роста штаммов на пластинках питательного агара. Для проверки эффективности подавления микробного роста использовали метод диффузии из лунок в агар. Среди предложенных препаратов эффективно подавляли все выделенные микроорганизмы «Дезовер», 5 %, «Дезавид» (концентрация ПГМГ – 0,14 %) и «Proxel GXL». Наибольшую эффективность среди исследуемых препаратов показал «Proxel GXL» в концентрации 2 % и 5 %, превышая на 42 % и 90 % соответственно препарат «Лизоформин» (1 % и 5 %). Средние зоны задержки для данных препаратов составили более 25 мм, что подтверждает высокую чувствительность к ним выделенных в ходе исследования микроорганизмов. Штаммы оказались не чувствительны: на 100 % к 0,1 %  $AgNO_3$ , на 60 % к 10 %  $H_2O_2$  и NaOCl («Белизна»). Исследования являются основой для разработки протокола стерилизации эксплантов *R. pseudoacacia in vitro*.

**Ключевые слова:** робиния псевдоакация (*Robinia pseudoacacia L.*), стерилизация, биоциды, микроорганизмы, *in vitro*.

**Для цитирования:** Могилевская И. В. Эффективные стерилизующие препараты для подавления микробного роста на эксплантах *Robinia pseudoacacia L. in vitro* // Таврический вестник аграрной науки. 2023. № 1(33). С. 80–92. DOI: 10.5281/zenodo.7898471. EDN: DRAHTF.

**For citation:** Mogilevskaia I. V. Effective sterilizing preparations for suppressing microbial growth on *Robinia pseudoacacia L. explants in vitro* // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2023. No. 1(33). P. 80–92. DOI: 10.5281/zenodo.7898471. EDN: DRAHTF.

### Введение

Дезинфектанты – соединения, способные тормозить или полностью подавлять рост микробных клеток. В основном, после удаления этих веществ идет возобновление микробного роста. Сегодня производители предлагают широкий спектр стерилизующих агентов химического происхождения, которые возможно применять в разных областях народного хозяйства. Вместе с химическими препаратами, современные исследователи применяют стерилизующие агенты и антимикробные препараты биологической природы [1, 2].

Для достижения необходимого эффекта важно правильно определить концентрацию подавляющего микробный рост препарата. Время его воздействия зависит от природы, состава микробиоты обрабатываемого материала, температуры и концентрации раствора. При низких температурах для достижения нужного эффекта требуется больше времени. Уровень устойчивости микроорганизмов к используемым препаратам зависит от условий, в которых находятся микробные клетки. Под длительным воздействием определенного дезинфектанта микроорганизмы постепенно приобретают резистентность к нему [3]. Она может сохраняться или даже увеличиваться до тех пор, пока они будут находиться или соприкасаться с дезинфицирующей средой [4].

Многие авторы указывают на проблему контаминации при введении в культуру тканей различных видов растений и неэффективность стандартных протоколов стерилизации. Часто внутреннее заражение исходных эксплантов бывает намного сильнее, чем поверхностное. Особенно богаты внутренней инфекцией экспланты из тканей древесных растений, которые вследствие особенностей сосудистой системы склонны к накоплению внутренней инфекции. Производимые микроорганизмами фитотоксины замедляют и останавливают морфогенез эксплантов *in vitro* [5].

В последнее время эндофитные бактерии привлекают внимание исследователей благодаря их синергетическому воздействию на растения-хозяева, такого как стимулирование роста растений, производство метаболитов и адаптация растений к стрессовым средам [6]. Часто эндофитные бактерии являются и организмами-контаминантами. Наиболее часто встречающимися родами бактериальных эндофитов являются *Pantoea*, *Curtobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodospseudomonas*, *Pseudomonas* и *Microbacterium* [7, 8].

В некоторых случаях заражение латентной бактериальной инфекцией визуально не влияет на рост растений *in vitro*, но при пассаже растения подвергаются стрессу, и в этом случае происходит усиление роста эндофитной культуры [9–11]. Увеличение числа микроорганизмов на кончиках побегов ставит под угрозу способность эксплантов к регенерации или даже приводит к гибели растения [12, 13]. Ранее для подавления или элиминации эндофитных возбудителей использовали антибиотики широкого спектра действия, например, ампициллин, гентамицин, амоксиклав и др. [14, 15]. Однако побочные эффекты фитотоксичности на рост эксплантов или отсутствие реакции генотипов на обработку, связанную с продолжением использования антибиотиков, могут привести к появлению резистентности [14]. Бактерии могут латентно присутствовать в растительной ткани, и загрязнение может вновь появиться через несколько месяцев после удаления действующих на микроорганизмы веществ [6].

*Robinia pseudoacacia* L. – быстрорастущий лесобразующий вид рода *Robinia*, семейства Fabaceae. Этот перспективный вид для аридных и урбанизированных территорий широко используется в лесозащитных насаждениях юга России [16–18].

Для стерилизации семян *R. pseudoacacia in vitro* [16] был использован раствор средства «Лизоформин 3000». Этот препарат по параметрам острой токсичности в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 при введении в желудок относится к 3 классу умеренно опасных веществ, при нанесении на кожу – к 4 классу малоопасных веществ, при введении в брюшную полость относится к 6 классу относительно безвредных веществ, при ингаляционном воздействии в виде паров – к 4 классу малоопасных веществ; оказывает слабое местно-раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки глаз, не обладает сенсibiliзирующим действием [19]. Используется также для стерилизации оборудования, поверхностей.

Среди антисептических средств широкого действия распространены препараты, где в качестве действующего вещества (ДВ) используется полигексаметиленгуанидин гидрохлорида (далее ПГМГ), например, «Дезовер» и «Дезавид». Они обладают широким спектром действия, есть сведения о применении «Дезавида» для стерилизации эксплантов древесных растений [20]. В состав средств для дезинфекции «Дезовер» и «Дезавид» входит ПГМГ в концентрациях 20 % и 0,14 % соответственно. ПГМГ относится к биоцидам широкого спектра антимикробной активности в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, вирусов, грибов, в том числе плесневых, дрожжевых и дрожжеподобных, грибов рода *Candida*. Это эффективный фунгицид и антисептик [21]. ПГМГ относится к 3 классу умеренно опасных веществ при введении в желудок, к 4 классу малоопасных веществ при нанесении на кожу по ГОСТ 12.1.007-76.

Примером препарата широкого действия также можно назвать “Proxel GXL”, который представляет собой раствор бензизотиазолинона (ДВ) в этиленгликоле. Степень опасности химической продукции в целом (сведения о классификации опасности в соответствии с законодательством РФ (ГОСТ 12.1.007-76)) отсутствует. Обладает антимикробным и фунгицидным, а также противогрибковым и биостатическим действием. Имеет неспецифическое действие по отношению к микроорганизмам, так как не накапливается резистентность у бактерий [22].

**Цель исследований** – определить действие биоцидов на микрофлору, выделенную из образцов *Robinia pseudoacacia* лаборатории ФНЦ агроэкологии РАН и подобрать оптимальный препарат для использования его на этапе стерилизации.

#### **Материалы и методы исследований**

Исследования проводили в 2021–2022 гг. в лаборатории биотехнологий ФГБУН «Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук». Модельными объектами являлись визуально контаминированные образцы эксплантов *R. pseudoacacia*. На этапе предварительной стерилизации до введения в культуру *in vitro* в качестве основных агентов использовали распространенные для этих целей вещества: 10 % раствор «Белизны» (ООО ПК «Русбытхим», Россия; действующее вещество: гипохлорит натрия – NaOCl; здесь и далее % об.), 1 % и 5 % раствор «Лизоформин-3000» (ООО «Гигиена Плюс», Россия; действующие вещества: глиоксаль, 7,5 %, глутаровый альдегид, 9,5 %, дидецилдиметиламмоний хлорид, 9,6 %), 10 % раствор перекиси водорода – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,1 % раствор нитрата серебра (I) – AgNO<sub>3</sub> [5, 23]. В ходе первого этапа в лаборатории биотехнологий ФНЦ агроэкологии РАН были исследованы режимы стерилизации семян *R. pseudoacacia* перечисленными препаратами [16]. На следующем этапе «Лизоформин 3000», «Белизну», 10 % раствор перекиси водорода использовали для проверки их действия на пяти чистых штаммах микроорганизмов: 1.1, 1.2, 1.4, 1.5, 1.7, выделенных с эксплантов *R. pseudoacacia*.

Для достижения поставленной в исследовании цели, кроме используемых ранее, были предложены такие препараты как «Дезовер» (ООО «Компания Вереск»), «Дезавид» (ООО «Адекватные технологии», Россия), «Proxel GXL» (Ataman Chemicals, Турция).

Для приготовления бактериальных взвесей исследуемых штаммов использовали стерильный физиологический раствор (0,89 % NaCl). Для контроля стерильности обработанных биоцидами проб производили их высев на пластинки питательного агара (среда для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), производство ВНИИМС, г. Углич) в чашках Петри. Все питательные среды и физиологический раствор, дистиллированную воду для приготовления растворов антисептиков предварительно стерилизовали автоклавированием при 121 °С в паровом стерилизаторе ГКа-25 ПЗ (-05); посуду – в сухожаровом шкафу Витязь ГП-40-3 при температуре 160 °С в течение 2 ч. Культивирование осуществляли в суховоздушном термостате ТС-1/80 СПУ при температуре 28–30 °С. Растворы антисептиков необходимых концентраций готовили в асептических условиях в ламинарном боксе на стерильной дистиллированной воде. Для выделения культур микроорганизмов использовали жидкую и плотную картофельно-сахарозную среду (КСА) и жидкую среду Чапека (производство HiMedia Laboratories Pvt Ltd, India).

Каждый из образцов помещали в стерильную пробирку, добавляли по 10 мл стерильного физиологического раствора, встряхивали периодически в течение 10–15 мин. После этого отбирали из пробирок образовавшиеся суспензии стерильной пипеткой по 1,0 мл, добавляли в пробирки с жидкой картофельно-сахарозной средой (КСА) или бульоном Чапека (9,0 мл) в трех повторностях и оставляли в термостате при температуре 28–30 °С до семи суток для накопления культур микроорганизмов.

Для выделения чистых культур делали высев на чашки Петри со средой КМАФАнМ. Для этого каплю микробной суспензии из пробирки с накопительной культурой размазывали аккуратно по поверхности плотной среды штрихами с помощью бактериологической петли по всей поверхности чашки. Далее чашки с посевами выдерживали в термостате до семи суток, так как скорость роста различных микроорганизмов неодинакова. Выросшие изолированные колонии на плотном питательном агаре были отсеяны с помощью бактериологической петли в асептических условиях в пробирки на поверхность скошенного агара [24].

Для определения зон задержки подготовленные стерильные чашки Петри со средой КМАФАнМ заражали выделенными чистыми культурами микроорганизмов. Для этого использовали пробирки с одно- или двухсуточными культурами микроорганизмов (в зависимости от их индивидуальной скорости роста на плотной среде) с концентрацией  $5 \times 10^8$  мк/мл. Подготовленные бактериальные взвеси разных штаммов микроорганизмов вносили в количестве 1 мл на чашки Петри со средой КМАФАнМ для получения после «газона» микробной культуры, после равномерного распределения лишнюю взвесь удаляли дозатором. Далее в чашке Петри проделывали четыре лунки размером 5 мм металлическим пробойником с диаметром 6 мм, куда помещали одинаковое количество исследуемого биоцида (по три капли соответствующей концентрации) или по одной лунке в случае обнаружения большой зоны задержки роста в двух–трехкратной повторности. Результат фиксировали через 24–48 часов в зависимости от скорости роста микроорганизмов [25].

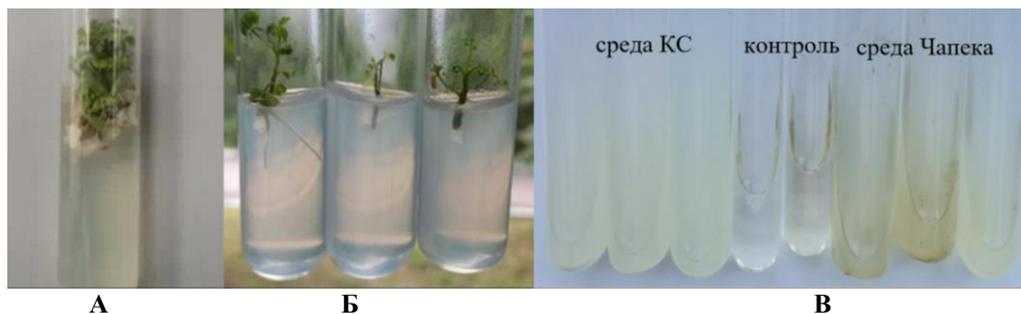
Учет результатов производили по величине зоны задержки роста микробов вокруг лунки по аналогии с действием бумажных дисков, включая их диаметр. Если зона задержки роста составляет 15–25 мм, то микробы чувствительны к веществу,

до 15 мм – малочувствительны; отсутствие такой зоны указывает на устойчивость бактериальной культуры к данному веществу (чувствительность отсутствует) [24].

Все результаты статистически обработаны при помощи пакета программы Microsoft Excel и представлены в виде средней арифметической с учетом ошибки среднего. Размер зон задержки роста определяли с помощью программы ImageJ (США), различия достоверны при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Проведены визуальная оценка зараженных образцов и смывы с них в жидкие среды на картофельно-сахарозную среду и в бульон Чапека. На рисунке 1 представлены образцы эксплантов и среды с ростом микроорганизмов через семь суток.



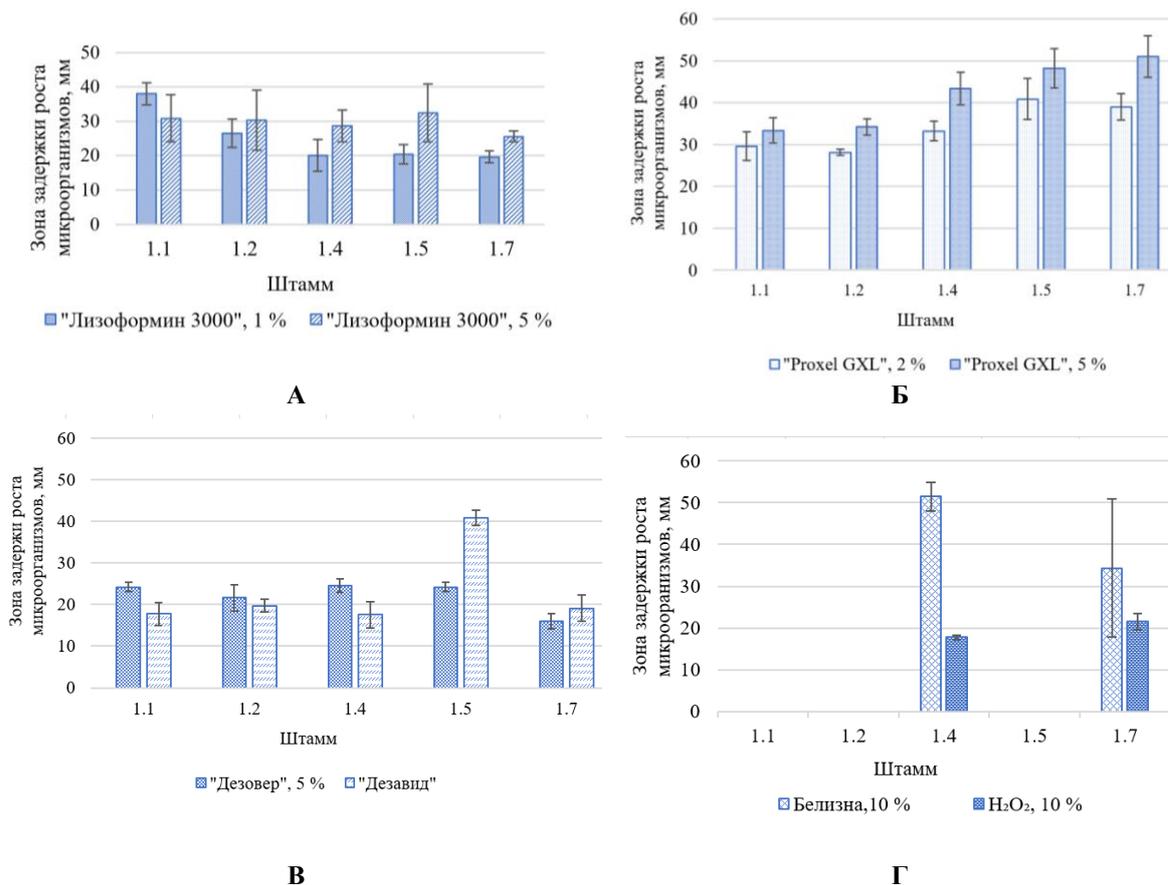
**Рисунок 1 – Исходные образцы эксплантов *in vitro* через 48 суток (А) и 14 суток (Б) и рост микроорганизмов на питательных средах КС и Чапека через семь суток (В)**

Зараженные суспензии с микробным ростом были посеяны на плотные питательные среды, с которых далее выделены чистые культуры микроорганизмов. В ходе серии экспериментов определены средние зоны задержки роста для штаммов, выделенных с эксплантов. С учетом этого показателя подобраны эффективные препараты, подавляющие рост исследуемых микроорганизмов. Зависимости действия исследуемых препаратов на выделенные штаммы от концентрации представлены на рисунке 2.

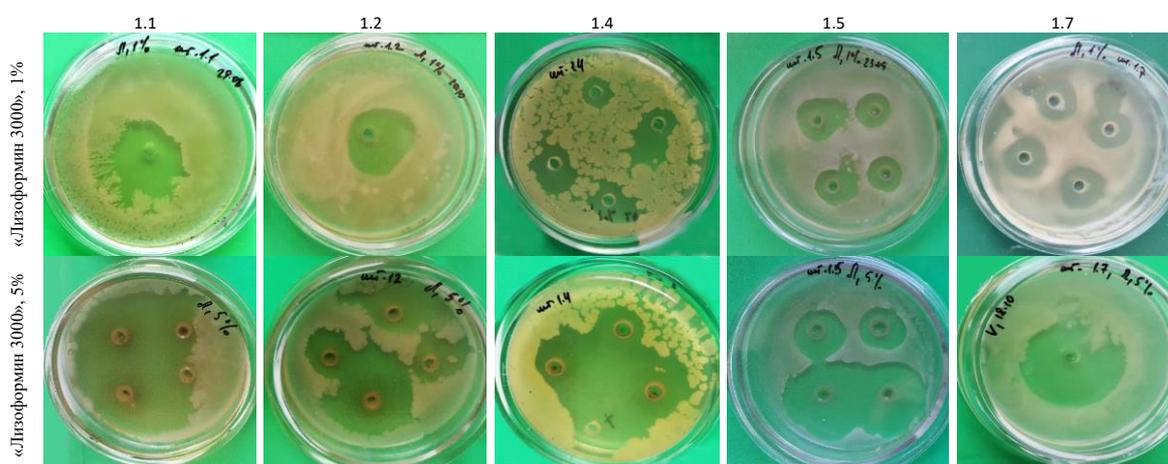
Анализ данных показал, что препараты «Лизоформин 3000» (1 % и 5 %), «Proxel GXL» (2 % и 5 %), «Дезовер», 5 %, «Дезавид» (в неразведенном виде) оказывали отрицательное действие на рост всех выделенных с эксплантов *R. pseudoacacia* штаммов микроорганизмов. При использовании препарата «Лизоформин 3000» в концентрации 1 % и 5 % (рисунок 2, А) наблюдали зоны задержки 19,6–38,0 мм, в концентрации 5 % размер зон для них составил 25,5–30,87 мм. Препарат в концентрации 1 % наиболее эффективен для штамма 1.1 (зона задержки роста 38,0 мм), а в концентрации 5 % – для штамма 1.5 (зона задержки роста 32,5 мм) (рисунок 3).

Препарат «Proxel GXL» (5 %) оказался эффективным для всех выделенных микроорганизмов, средняя зона задержки роста (42,03 мм) у данного препарата выше на 42% по сравнению с препаратом «Лизоформин 3000» (5%) (29,56 мм) (рисунок 4)

Наименьшее действие препарата в концентрации 2 % наблюдали для штамма 1.2 (28,14 мм), в концентрации 5 % – для штамма 1.1 (33,37 мм). Максимум действия отмечен для штамма 1.5 (в концентрации 2 %) и 1.7 (в концентрации 5 %), зоны задержки роста 40,85 мм и 50,99 мм соответственно (рисунок 2, Б). По величине средней зоны задержки все штаммы оказались высоко чувствительны к препарату «Proxel GXL» (концентрация 5 %).



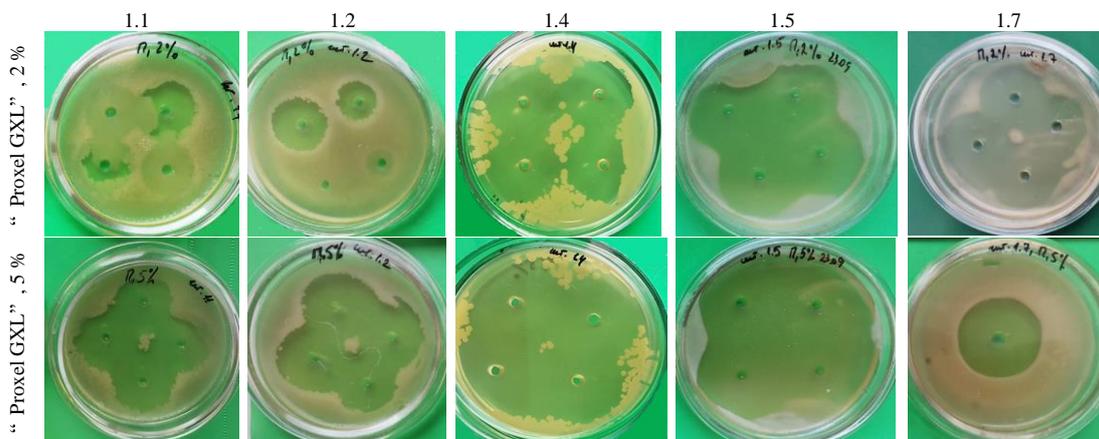
**Рисунок 2 – Действие препаратов «Лизоформин 3000» (А), «Proxel GXL» (Б), «Дезовер» и «Дезавид» (В), «Белизна» и перекись водорода (Г) на выделенные с эксплантов *R. pseudoacacia* штаммы микроорганизмов**



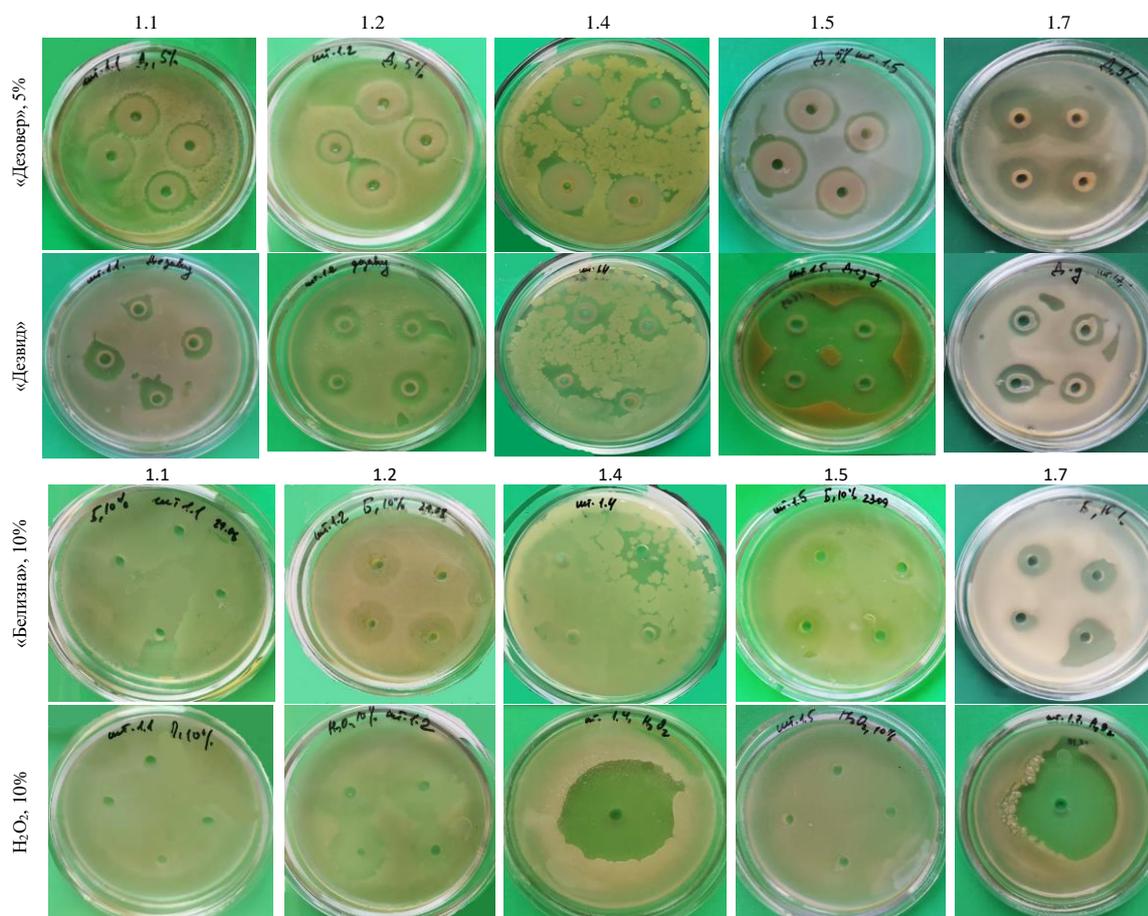
**Рисунок 3 – Действие препарата «Лизоформин 3000» на выделенные штаммы в концентрации 1 % (вверху) и 5 % (внизу)**

Препараты «Дезовер», 5% и «Дезавид» со сниженной почти в семь раз (0,14 %) концентрацией ПГМГ оказывали меньший эффект (в два раза) по сравнению с препаратом «Proxel GXL». Наибольшую чувствительность к действию препарата «Дезовер», 5 % наблюдали у штамма 1.1 (зона задержки роста 24,35 мм),

а к препарату «Дезавид» – у штамма 1.5, для которого его можно назвать максимально эффективным (зона задержки роста 40,86 мм) (рисунок 5).



**Рисунок 4 – Действие препарата «Proxel GXL» на выделенные штаммы в концентрации 1 % (вверху) и 5 % (внизу)**



**Рисунок 5 – Действие препаратов «Белизна» (10 %), раствора перекиси водорода (10 %), «Дезовер» (5 %) и «Дезавид» на выделенные штаммы**

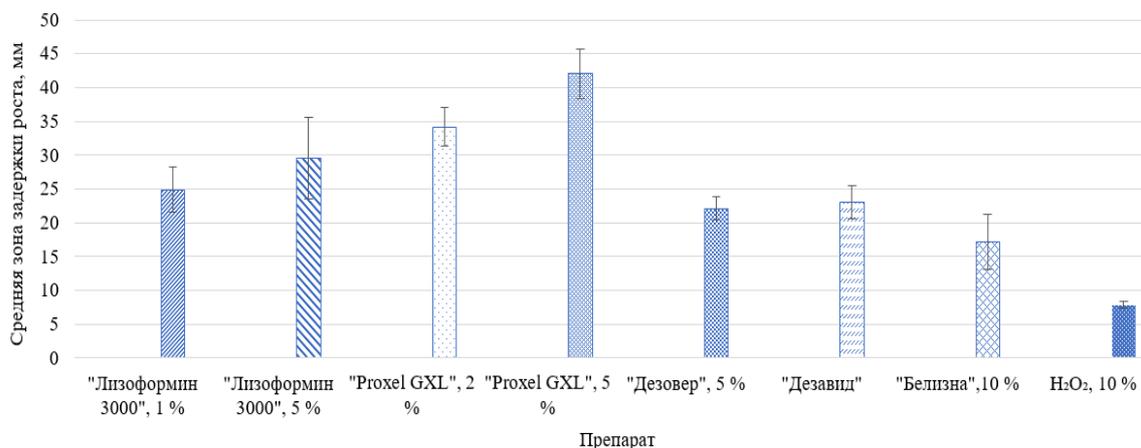
Для штаммов 1.1, 1.2, 1.4, выделенных с эксплантов *R. pseudoacacia*, препарат «Дезовер», 5% оказался более эффективен, чем препарат «Дезавид» по средней зоне задержки роста. На штаммы 1.5 и 1.7 «Дезавид» действует лучше, чем «Дезовер», что можно объяснить индивидуальной чувствительностью штаммов 1.5

и 1.7 к действию второго компонента препарата «Дезавид» (0,02 % алкилбензиламмоний хлорид).

Препараты «Белизна» и раствор  $H_2O_2$  в концентрации 10 % при использовании метода диффузии лунок в агар не оказали действия на три (60 %) штамма из пяти (рисунок 2, Г). Чувствительность к данным препаратам проявили штаммы 1.4 и 1.7. По результатам исследований перекись водорода (10 %) является оптимальным стерилизующим агентом только для штамма 1.4 (зона задержки 51,46 мм). Стерилизующий агент «Белизна» на 118 % менее эффективен, чем перекись водорода (рисунок 5). При применении данных препаратов 60 % штаммов оказались не восприимчивы к 10 % раствору  $H_2O_2$  и NaOCl («Белизна»).

При обработке раствором  $AgNO_3$  (0,1 %) штаммов микроорганизмов методом диффузии из лунок в агар все культуры (100 %) оказались не чувствительны к примененному препарату, хотя об эффективном его использовании упоминают российские и зарубежные исследователи [26, 19]. Это может быть обусловлено недостаточной концентрацией препарата или устойчивостью к нему микроорганизмов.

Анализируя данные серии экспериментов по средним зонам задержки исследуемых препаратов (рисунок 6), можно констатировать, что все штаммы более чувствительны к препарату «Proxel GXL» в концентрации 2 % и 5 % и «Лизоформин 3000» в концентрации 1 % и 5 %. Меньшую чувствительность наблюдали к действию препарата «Белизна» (действующее вещество NaOCl) при его широком использовании для стерилизации эксплантов [16, 19, 27, 28].



**Рисунок 6 – Сводный график действия исследуемых препаратов на выделенные штаммы с эксплантов *R. pseudoacacia***

Сравнение средних зон задержки показало, что повышение концентрации «Лизоформин 3000» в 5 раз с 1 % до 5 % увеличило зоны задержки на 18,7 %. При применении препарата «Proxel GXL» повышение концентрации в 2,5 раза с 2 % до 5 % дало увеличение зон задержки роста на 23 %, что говорит о большей чувствительности к нему выделенных штаммов. Препарат «Proxel GXL» в концентрации 5 % эффективнее препаратов «Лизоформин 3000», 5 % и «Дезовер», 5 % на 42 % (12,47 мм) и 90 % (19,9 мм) соответственно.

Результаты определения эффективности препаратов по отношению к штаммам представлены в таблице.

Таблица – Чувствительность штаммов микроорганизмов с *R. pseudoacacia* к исследуемым препаратам

Штамм	Наиболее эффективный препарат	Препарат с зоной задержки >25 мм (высокая чувствительность штаммов)	Препараты с зоной задержки 15–25 мм (средняя чувствительность штаммов)	Препараты, провоцирующие резистентность штаммов (зона задержки отсутствует)
1.1	Л1	Л1, Л5, Р2, Р5	Д5, Дд	Б10, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (10 %), AgNO <sub>3</sub> (0,1 %)
1.2	Р5	Р5 Л1, Л5, Р2,	Д5, Дд	Б10, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (10 %), AgNO <sub>3</sub> (0,1 %)
1.4	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (10 %)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (10 %) Л5, Р2, Р5, Б10, Дд	Л1, Д5,	AgNO <sub>3</sub> (0,1 %)
1.5	Р5	Л1, Л5, Р5, Р2	Д5, Дд	Б10, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (10 %), AgNO <sub>3</sub> (0,1 %)
1.7	Р5	Р5, Б10, Р2, Л5	Л1, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 %), Д5, Дд	AgNO <sub>3</sub> (0,1 %)

**Примечание.** Л1 – «Лизоформин 3000», 1 %; Л5 – «Лизоформин 3000», 5 %; Б10 – «Белизна-эконом», 10 %; Н10 – раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 %; Р2 – «Proxel GXL», 2 %; Р5 – «Proxel GXL», 5 %; Д5 – «Дезовер», 5 %; Дд – «Дезавид».

Анализ данных показал, что препараты «Proxel GXL», «Лизоформин», «Дезовер» и «Дезавид» эффективны в отношении всех исследуемых микроорганизмов. К другим препаратам, используемым в исследовании, микроорганизмы оказались не чувствительны («Белизна», растворы H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и AgNO<sub>3</sub>). Таким образом, высокая эффективность действующего вещества бензизотиазолинона в препарате «Proxel GXL» в отношении различных видов микроорганизмов *in vitro* подтверждается в работах исследователей [6, 9].

#### Выводы

Впервые проведено лабораторное исследование чувствительности микроорганизмов, выделенных с зараженных эксплантов *R. pseudoacacia*, по отношению к препаратам «Дезовер», «Дезавид» и «Proxel GXL».

Определены зоны задержки микробного роста для них и используемых ранее в лаборатории биотехнологии стерилизующих агентов «Белизна» 10 %, растворов H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 % и AgNO<sub>3</sub> (0,1 %). Исследования показали, что все культуры микроорганизмов очень чувствительны к препаратам «Лизоформин» (концентрации 1 % и 5 %), «Дезовер», 5 %, «Дезавид», «Proxel GXL» (концентрации 2 % и 5 %). Наибольшую чувствительность (максимальные зоны задержки – более 25 мм) к препарату «Proxel GXL», 5 % проявили 100 % исследуемых микроорганизмов. При этом эффективное действие на все штаммы микроорганизмов оказывали «Лизоформин 3000», «Дезовер» и «Дезавид» (зоны задержки роста более 15 мм). К растворам перекиси водорода и гипохлорита натрия («Белизна») в 10 % концентрации чувствительность была определена только у двух штаммов – 1.5 и 1.7 (40 %). К раствору AgNO<sub>3</sub> (0,1 %) остались устойчивы все штаммы.

Таким образом, для 100 % подавления роста микроорганизмов, выделенных с эксплантов *R. pseudoacacia*, можно рекомендовать препараты «Лизоформин 3000» в концентрации 1 % и 5 %, «Proxel GXL» (2 % и 5 %), «Дезовер», 5 % и «Дезавид» (концентрация ПГМГ 0,14 %).

*Работа выполнена в рамках государственного задания НИР ФНЦ агроэкологии РАН № 122020100427-1 «Разработать научные основы сохранения и воспроизводства ценных генотипов древесных и кустарниковых растений в культуре in vitro».*

#### Литература

1. Ahmed N., Mohamed H. F., Xu C., Lin X., Huang L. A novel surface sterilization method using *Artemisia dracuncululus* extract for tissue culturing of endangered species *Sargassum fusiforme* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2022. Vol. 149. No. 1. P. 135–145. DOI: 10.1007/s11240-022-02239-y.

2. Пась А. Н. Эффективность микробных препаратов при интродукции *Tulipa × hybrida hort* в условиях предгорного Крыма // Таврический вестник аграрной науки. 2020. № 1(21). С. 56–63. DOI: 10.33952/2542-0720-2020-1-21-56-63. EDN: GYOFPR.
3. Якуба Г. В., Астапчук И. Л., Насонов А. И. Действие фунгицидов *in vitro* на грибы рода *Fusarium* Link, вызывающие гниль сердцевины плодов яблони // Таврический вестник аграрной науки. 2020. № 2(22). С. 188–197. DOI: 10.33952/2542-0720-2020-2-22-188-197. EDN: EUVWZA.
4. Кобзев Е. Н., Чугунов В. А., Родин В. Б., Дегушева Е. В., Слукин П. В., Фёдорова Л. С., Акимкин В. Г. Формирование устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам и пути решения проблемы // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014. № 6. С. 48–54. EDN: TENSMD.
5. Аникина И. Н. Адамжанова Ж. А., Комарова А. Н., Кусаинов А. А. Преодоление микроорганизмов-контаминантов в культуре растительных тканей *in vitro* // Биологические науки Казахстана. 2020. № 4. С. 9–20.
6. Romadanova N. V., Tolegen A. B., Kushnarenko S. V., Zoldybayeva E. V., Bettoni J. C. Effect of plant preservative mixture TM on endophytic bacteria eradication from *in vitro*-grown apple shoots // Plants. 2022. Vol. 11. No. 19. Art. No. 2624. DOI: 10.3390/plants11192624.
7. Quambusch M., Brummer J., Haller K., Winkelmann T., Bartsch M. Dynamics of endophytic bacteria in plant *in vitro* culture: quantification of three bacterial strains in *Prunus avium* in different plant organs and *in vitro* culture phases // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2016. Vol. 126. No. 2. P. 305–317. DOI 10.1007/s11240-016-0999-0.
8. Kaluzna M., Mikicinski A., Sobiczewski, P., Zawadzka M., Zenkleter E., Orlikowska T. Detection, isolation, and preliminary characterization of bacteria contaminating plant tissue cultures // Acta Agrobotanica. 2013. Vol. 66. No. 4. P. 81–92. DOI: 10.5586/aa.2013.054.
9. Kushnarenko S., Aralbayeva M., Rymkhanova N., Reed B.M. Initiation pretreatment with Plant Preservative Mixture™ increases the percentage of aseptic walnut shoots // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2022. Vol. 58. P. 964–971. DOI: 10.1007/s11627-022-10279-4.
10. Köpnick C., Grube M., Stock J., Senula A., Mock H.P., Nagel H. Changes of soluble sugars and ATP content during DMSO droplet freezing and PVS3 droplet vitrification of potato shoot tips // *Cryobiology*. 2018. Vol. 85. P. 79–86. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2018.09.005.
11. Bajerski F., Nagel M., Overmann J. Microbial occurrence in liquid nitrogen storage tanks: a challenge for cryobanking? // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021. Vol. 105. No. 20. P. 7635–7650. DOI: 10.1007/s00253-021-11531-4.
12. Volk G. M., Bonnart R., de Oliveira A. C. A., Henk A. D. Minimizing the deleterious effects of endophytes in plant shoot tip cryopreservation // *Applications in Plant Sciences*. 2022. Vol. 10. No. 5. Art. No. e11489 DOI: 10.1002/aps3.11489.
13. Senula A., Keller E. R. J. Cryopreservation of mint – routine application in a genebank, experience and problems // *ISHS Acta Horticulturae 908: I International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species*. No. 908. 2009. P. 467–475. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.908.60.
14. Leone G. F., Andrade P. A. M., de Almeida Carolina V., de Almeida Cristina V., Andreote F. D., de Almeida M. Use of antibiotics to control endophytic bacterial growth migration onto culture medium in *Eucalyptus cloeziana* F. Muell.: a micropropagation approach // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2019. Vol. 55. No. 4. P. 421–432. DOI: 10.1007/s11627-019-09986-2.
15. Liang C., Rendun W., Han Y., Wan T., Cai Y. Optimizing suitable antibiotics for bacterium control in micropropagation of cherry rootstock using a modified leaf disk diffusion method and E test // *Plants*. 2019. Vol. 8. No. 3. P. 66. DOI: 10.3390/plants8030066.
16. Терещенко Т. В., Жолобова О. О. Эффективные способы стерилизации семян *Robinia pseudoacacia* L. для введения в культуру *in vitro* // *Научно-агрономический журнал*. 2022. № 2(117). С. 62–67. DOI: 10.34736/FNC.2022.117.2.008.62-67. EDN: DEUPZP.
17. Калмыкова Е. В., Кузьмин П. А., Мельник К. А., Сапронова Д. В. Комплексная оценка сеянцев *Robinia pseudoacacia* L. в орошаемом питомнике для использования в лесоразведении и озеленении на территории Нижнего Поволжья // *Аграрный научный журнал*. 2022. No 11. С. 38–42. DOI: 10.28983/asj.y2022i11. С. 38–42.
18. Власов А. И., Бебия С. М., Кружилин С. Н., Прикня Д. О. О масштабной интродукции полиплоидных форм *Robinia pseudoacacia* L. в степной зоне как перспективном направлении научных исследований // *Экономика и экология территориальных образований*. 2022. Т. 6. № 2. С. 57–64. DOI: 10.23947/2413-1474-2022-6-2-57-64. EDN: UHDMBA.
19. Афиногенова А. Г., Афиногенов Г. Е., Богданова Т. Я. Инструкция № 06/07 по применению средства «Лизоформин 3000» для целей дезинфекции, очистки и стерилизации производства фирмы «Лизоформ Др. Ханс Роземанн ГмбХ» (Германия), расфасованного на ООО «Гигиена плюс», Россия. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [http://dezshare.ru/documents/223/Lisoformin\\_3000\\_06-07\\_2007.pdf](http://dezshare.ru/documents/223/Lisoformin_3000_06-07_2007.pdf) (дата обращения 5.12.2022).

20. Патент РФ № 2720916 С1 «Способ стерилизации зеленых растительных эксплантов перед вводом в культуру *in vitro*» // Авторы: Ребров А. Н., Трофимова М. С. Патентообладатель: ФГБНУ «Федеральный ростовский аграрный научный центр». 14.05.2020. Бюлл. № 14. 6 с.
21. Патент РФ № 2542528 С2 «Фунгицидный состав» // Авторы: Земченкова Г. К., Давлетов Р. Д., Колбин А. М. Патентообладатель: ГБУ Республики Башкортостан «Научно-исследовательский технологический институт гербицидов и регуляторов роста растений с опытно-экспериментальным производством Академии наук Республики Башкортостан» 20.02.2015. Бюлл. № 5. 14 с.
22. Паспорт безопасности химической продукции К6F99AA. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://h20195.www2.hp.com/v2/GetDocument.aspx?docname=c07399053> (дата обращения: 1.11.2022).
23. Ugur R. Development of *in vitro* sterilization protocol for DO-1 (*Prunus domestica*) rootstock // Applied Ecology and Environmental Research. 2020. Vol. 18. No. 2. P. 2339–2349. DOI: 10.15666/aer/1802\_23392349.
24. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии // Под ред. Кисленко Н. Н. М.: КолосС, 2005. 232 с.
25. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Государственная фармакопея РФ. Т. XIII. М.: ФЭМБ, 2015. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/> (дата обращения: 1.11.2022).
26. Чудецкий А. И., Родин С. А., Зарубина Л. В., Кузнецова И. Б., Тяк Г. В. Микрклональное размножение и особенности адаптации к условиям *ex vitro* лесных ягодных растений рода *Vaccinium* // Техника и технология пищевых производств. 2022. Т. 52. № 3. С. 570–581. DOI: 10.21603/2074-9414-2022-3-2386. EDN: UANYXI.
27. Шахов В. В., Ташматова Л. В., Мацнева О. В., Хромова Т. М. Эффективность стерилизующих агентов при введении сортов вишни в культуру *in vitro* // Современное садоводство. 2018. №. 4 (28). С. 32–37. DOI: 10.24411/2312-6701-2018-10405 EDN: YRPFGR.
28. Stanislavljević A., Bošnjak D., Štolfa I., Vuković R., Kujundžić T., Drenjančević M. Sterilization of different explant types in micropropagation of CAB-6P and Gisela 6 cherry rootstock // Poljoprivreda. 2017. Vol. 23. No. 2. P. 31–37. DOI: 10.18047/poljo.23.2.5.

## References

1. Ahmed N., Mohamed H. F., Xu C., Lin X., Huang L. A novel surface sterilization method using *Artemisia dracuncululus* extract for tissue culturing of endangered species *Sargassum fusiforme* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2022. Vol. 149. No. 1. P. 135–145. DOI: 10.1007/s11240-022-02239-y.
2. Pas' A. N. Effectiveness of microbial preparations in introduction *Tulipa × hybrida* Hort. in the foothill zone of the Crimea // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2020. No. 1(21). P. 56–63. DOI: 10.33952/2542-0720-2020-1-21-56-63. EDN GYOFPR.
3. Yakuba G. V., Astapchuk I. L., Nasonov A. I. *In vitro* action of fungicides on fungi of the genus *Fusarium* Link, causing core rot apple-fruit // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2020. No. 2(22). P. 188–197. DOI: 10.33952/2542-0720-2020-2-22-188-197. EDN: EUVWZA.
4. Kobzev E. N., Chugunov V. A., Rodin V.B., Detusheva E. V., Slukin P. V., Fedorova L. S., Akimkin V. G. Formation of microbial resistance to disinfectants and ways of solving of the problem// Epidemiology and infectious diseases. 2014. No. 6. P. 48–54. EDN: TENSMD.
5. Anikina I. N. Adamzhanova J. A., Komarova A. N., Kusainov A. A. Overcoming of microorganisms-contaminants in the culture of plant tissues *in vitro* // Biological Sciences of Kazakhstan. 2020. No. 4. P. 9–20.
6. Romadanova N. V., Tolegen A. B., Kushnarenko S. V., Zoldybayeva E. V., Bettoni J. C. Effect of plant preservative mixture TM on endophytic bacteria eradication from *in vitro*-grown apple shoots // Plants. 2022. Vol. 11. No. 19. Art. No. 2624. DOI: 10.3390/plants11192624.
7. Quambusch M., Brummer J., Haller K., Winkelmann T., Bartsch M. Dynamics of endophytic bacteria in plant *in vitro* culture: quantification of three bacterial strains in *Prunus avium* in different plant organs and *in vitro* culture phases // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2016. Vol. 126. No. 2. P. 305–317. DOI 10.1007/s11240-016-0999-0.
8. Kaluzna M., Mikicinski A., Sobiczewski, P., Zawadzka M., Zenkleter E., Orlikowska T. Detection, isolation, and preliminary characterization of bacteria contaminating plant tissue cultures // Acta Agrobotanica. 2013. Vol. 66. No. 4. P. 81–92. DOI: 10.5586/aa.2013.054.
9. Kushnarenko S., Aralbayeva M., Rymkhanova N., Reed B.M. Initiation pretreatment with Plant Preservative Mixture™ increases the percentage of aseptic walnut shoots // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2022. Vol. 58. P. 964–971. DOI: 10.1007/s11627-022-10279-4.
10. Köpnick C., Grube M., Stock J., Senula A., Mock H.P., Nagel H. Changes of soluble sugars and ATP content during DMSO droplet freezing and PVS3 droplet vitrification of potato shoot tips //

Cryobiology. 2018. Vol. 85. P. 79–86. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2018.09.005.

11. Bajerski F., Nagel M., Overmann J. Microbial occurrence in liquid nitrogen storage tanks: a challenge for cryobanking? // Applied Microbiology and Biotechnology. 2021. Vol. 105. No. 20. P. 7635–7650. DOI: 10.1007/s00253-021-11531-4.

12. Volk G. M., Bonnart R., de Oliveira A. C. A., Henk A. D. Minimizing the deleterious effects of endophytes in plant shoot tip cryopreservation // Applications in Plant Sciences. 2022. Vol. 10. No. 5. Art. No. e11489 DOI: 10.1002/aps3.11489.

13. Senula A., Keller E. R. J. Cryopreservation of mint – routine application in a genebank, experience and problems // ISHS Acta Horticulturae 908: I International Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species. 2009. P. 467–475. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.908.60.

14. Leone G. F., Andrade P. A. M., de Almeida Carolina V., de Almeida Cristina V., Andreote F. D., de Almeida M. Use of antibiotics to control endophytic bacterial growth migration onto culture medium in *Eucalyptus cloeziana* F. Muell.: a micropropagation approach // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 2019. Vol. 55. No. 4. P. 421–432. DOI: 10.1007/s11627-019-09986-2.

15. Liang C., Rendun W., Han Y., Wan T., Cai Y. Optimizing suitable antibiotics for bacterium control in micropropagation of cherry rootstock using a modified leaf disk diffusion method and E test // Plants. 2019. Vol. 8. No. 3. P. 66. DOI: 10.3390/plants8030066.

16. Tereshchenko T. V., Zholobova O. O. Effective methods of sterilization of *Robinia pseudoacacia* L. seeds for introduction into cultivation *in vitro* // Scientific Agronomy Journal. 2022. No. 2(117). P. 62–67. DOI: 10.34736/FNC.2022.117.2.008.62-67. EDN: DEUPZP.

17. Kalmykova E. V., Kuzmin P. A., Melnik K. A., Saponova D. V. Comprehensive evaluation of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings in an irrigated nursery for use in forestry and gardening in the lower Volga region // The Agrarian Scientific Journal. 2022. No. 11. P. 38–42 DOI: 10.28983/asj.y2022i11pp38-42.

18. Vlasov A. I., Bebia S. M., Kruzhilin S. N., Priknya D. O. On the large-scale introduction of polyploid forms of *Robinia pseudoacacia* L. in the steppe zone as a promising area of scientific research // Economy and ecology of territorial formations. 2022. Vol. 6. No. 2. P. 57–64. DOI: 10.23947/2413-1474-2022-6-2-57-64. EDN: UHDMBA.

19. Afinogenova A. G., Afinogenov G. E., Bogdanova T. Ya. Instruction No. 06/07 on the use of “Lysoformin 3000” for disinfection, cleaning and sterilization purposes manufactured by the company “Lysoform Dr. Hans Rosemann GmbH” (Germany), packaged at Hygiene Plus LLC, Russia. [Electronic resource]. Access point: [http://dezshare.ru/documents/223/Lisoformin\\_3000\\_06-07\\_2007.pdf](http://dezshare.ru/documents/223/Lisoformin_3000_06-07_2007.pdf) (reference’s date 05.12.2022).

20. Patent of the Russian Federation No. 2720916 C1 “Sterilization method of green plant explants before introduction into culture *in vitro*” // Authors: Rebrov A. N., Trofimova M. S. Patentee: Federal State Budgetary Scientific Institution “Federal Rostov Agrarian Scientific Center”. 14.05.2020. Bull. No. 14. 6 p.

21. Patent of the Russian Federation No. 2542528 C2 “Fungicidal composition” // Authors: Zemchenkova G. K., Davletov R. D., Kolbin A. M. Patentee: State Budgetary Institution of the Republic of Bashkortostan “Scientific Research Technological Institute of Herbicides and Plant Growth Regulators with experimental production of the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan”. 20.02.2015. Bull. No. 5. 14 p.

22. Safety data sheet of chemical products K6F99AA. [Electronic resource]. Access point: <https://h20195.www2.hp.com/v2/GetDocument.aspx?docname=c07399053> (reference’s date 01.11.2022).

23. Ugur R. Development of *in vitro* sterilization protocol for DO-1 (*Prunus domestica*) rootstock // Applied Ecology and Environmental Research. 2020. Vol. 18. No. 2. P. 2339–2349. DOI: 10.15666/aer/1802\_23392349.

24. Practicum on veterinary microbiology and immunology // Ed. by Kislenco N. N. Moscow: KolosS, 2005. 232 p.

25. Ministry of Health of the Russian Federation. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Vol. XIII. Moscow: FEMB, 2015. [Electronic resource]. Access point: <https://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/> (reference’s date 01.11.2022).

26. Chudetsky A. I., Rodin S. A., Zarubina L. V., Kuznetsova I. B., Tyak G. V. Clonal micropropagation and peculiarities of adaptation to *ex vitro* conditions of forest berry plants of the genus *Vaccinium* // Food Processing: Techniques and Technology. 2022. Vol. 52(3). P. 570–581. DOI: 10.21603/2074-9414-2022-3-2386. EDN: UANYXI.

27. Shakhov V. V., Tashmatova L. V., Matzneva O.V., Khromova T. M. The effectiveness of sterilizing agents in the introduction of cherry varieties to *in vitro* culture // Contemporary horticulture. 2018. No. 4 (28). P. 32–37. DOI: 10.24411/2312-6701-2018-10405. EDN: YRPFGP.

28. Stanislavljević A., Bošnjak D., Štolfa I., Vuković R., Kujundžić T., Drenjančević M. Sterilization of different explant types in micropropagation of CAB-6P and Gisela 6 cherry rootstock // Poljoprivreda. 2017. Vol. 23. No. 2. P. 31–37. DOI: 10.18047/poljo.23.2.5.

UDC 579.64:631.533

Mogilevskaya I. V.

**EFFECTIVE STERILIZING PREPARATIONS FOR SUPPRESSING MICROBIAL GROWTH ON *ROBINIA PSEUDOACACIA* L. EXPLANTS IN VITRO**

**Summary.** *Currently, the study of the possibility of using broad-spectrum biocides to suppress the microbial growth is relevant because of the presence of infection in explants after their sterilization with common disinfectants – sodium hypochlorite (“Belizna”), hydrogen peroxide solution (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>). The five pure microbial strains have been isolated by laboratory methods from the model plants *R. pseudoacacia* L. in vitro. The goal of the study was to determine the efficiency of chemical biocides against specific microorganism types in *R. pseudoacacia* in vitro. The research was carried out in 2021–2022 at the Laboratory of Biotechnologies of the FSBSI “Federal Scientific Center of Agroecology, Complex Melioration and Protective Afforestation of the Russian Academy of Sciences”. The objects of the study were pure strains isolated from the affected explants of *R. pseudoacacia* L. We studied the effect of preparations (those that are used in standard protocols for the sterilization of *R. pseudoacacia* and first-proposed for microbial growth suppression: “Dezover”, 5%; “Proxel GXL”, 2 % and 5 %; “Dezavid”) on the growth of the isolated pure strains. For all preparations used in the study, the mean growth inhibition zone of strains in the nutrient agar was determined. The diffusion method from the holes to the agar was used to test the efficiency of the microbial growth suppression. Among the studied preparations, “Dezover”, 5 %; “Dezavid” (polyhexamethylene guanidine concentration – 0.14 %) and “Proxel GXL” effectively suppressed all isolated microorganisms. “Proxel GXL” (2 % and 5 %) showed the highest efficiency among the studied preparations, exceeding “Lysoformin” (1% and 5%) by 42% and 90%, respectively. The average delay zones for these preparations were more than 25 mm. This confirms the high sensitivity of the microorganisms isolated during these preparations’ study. The strains were not sensitive to AgNO<sub>3</sub> (0.1 %), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 %) and NaOCl (“Belizna”, 10 %) by 100 % and 60 % (for the last two preparations), respectively. The research serves as the basis for the development of the protocol for the sterilization of explants *R. pseudoacacia* in vitro.*

**Keywords:** *Robinia pseudoacacia* L., sterilization, biocides, microorganisms, in vitro.

Могилевская Ирина Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологий по древесным и кустарниковым породам селекционно-семеноводческого центра, ФГБНУ «Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук»; 400062, Россия, г. Волгоград, проспект Университетский, 97; e-mail: info@vfanc.ru.

Mogilevskaya Irina Vladimirovna, Cand. Sc. (Biol.), leading researcher of the Biotechnology Laboratory for Tree and Shrub Species of the Breeding and Seed-Growing Center of the Federal State Budgetary Institution “Federal Scientific Center of Agroecology, Complex Melioration and Protective Afforestation of the Russian Academy of Sciences”; 97, Universitetskiy Prospekt, Volgograd, 400062, Russia; e-mail: info@vfanc.ru.

Дата поступления в редакцию – 16.12.2022.

Дата принятия к печати – 20.01.2023.