

Т.М. Мельничук, М.К. Шерстобоев, Т.Ю. Пархоменко, І.О. Каменєва,
Н.В. Алексєєнко, О. В. Каліберденко

ЗАСТОСУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ-АНТАГОНІСТІВ ДЛЯ БІОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ ФІТОПАТОГЕНІВ ЗЕРНОВИХ РОСЛИН

мікроорганізми-антагоністи фітопатогенів, біологічний контроль, інтродукція, ризосфера, вирощування рослин.

Сучасні технології вирощування рослин передбачають інтенсивне використання різноманітних хімічних засобів захисту від фітопатогенів, що, в свою чергу, призводить до значного нагромадження залишків пестицидів на різних рівнях екосистем. Крім того, засоби хімізації містять певну кількість супутніх токсичних сполук, які при їх застосуванні можуть забруднювати середовище та продукцію сільського господарства, знижувати її якість та негативно впливати на біоту агроценозу. Це важкі метали, фториди, радіоактивні ізотопи урану, торію та інші [3].

Отже, існує нагальна необхідність відновлення природних екосистем, збереження їх біорізноманітності на рівні, що гарантує стабільність навколишнього середовища, і особливої актуальності набуває забезпечення термінових заходів, спрямованих на збереження природи від деградації та забруднення. Одним із таких першочергових заходів є „біологізація” агроекосистем. У цьому зв'язку стратегічним напрямком фундаментально-прикладних досліджень залишається розробка технологій виробництва та застосування нових мікробних препаратів [8, 10].

Використання мікробних препаратів на основі мікроорганізмів–антагоністів є одним з поширених і сучасних прийомів біологічного землеробства та забезпечує біологічний контроль розвитку хвороб рослин протягом всього періоду їх росту, а також в період зберігання сільськогосподарської продукції і насіння.

Біоконтроль розвитку фітопатогенів здійснюється завдяки здатності мікроорганізмів продукувати антибіотичні сполуки, розчиняти гіфи патогенних мікроміцетів, конкурувати за місце заселення і за поживні речовини, які необхідні для розвитку фітопатогенів [1].

У виробництві мікробіологічних препаратів для біоконтролю фітопатогенів сільськогосподарських рослин використовують різні види мікроорганізмів–антагоністів, однак частіше за інші використовують представники родів *Pseudomonas* Migula і *Bacillus* Conh [15, 14]. Використання бактерій роду *Bacillus*, як основи біопрепаратів, має деякі переваги в порівнянні з іншими мікроорганізмами, а саме: вони легко культивуються, зберігаються і використовуються у вигляді спор [9].

У Південній дослідній станції Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН (ПДС ІСГМ УААН) розроблено біопрепарат Біополіцид на основі мікроорганізму з комплексом агрономічно корисних властивостей *Paenibacillus polymyxa* (Prazmowski) Migula штам П, який застосовується при вирощуванні зернових, овочевих та бобових рослин. Також в ПДС ІСГМ УААН проводиться робота з пошуку нових природних активних штамів мікроорганізмів-антагоністів фітопатогенів і створено їх колекцію. На основі технологічної оцінки штамів відібрано найбільш перспективні штами з роду *Bacillus* для розробки біопрепаратів на їх основі – штами *Bacillus* sp. 01-1, 12501.

Мета нашої роботи полягає в розробці мікробних препаратів для біоконтролю фітопатогенів та елементів технології їх застосування у рослинництві. Для розробки ефективного біопрепарату та елементів технології його застосування проведено комплекс наукових досліджень. В нашій статті буде викладено деякі нові результати проведеної роботи.

Об'єктом досліджень були нові штами мікроорганізмів-антагоністів *Bacillus sp.* 01-1, 12501, біопрепарат Біополіцид на основі *P. polymyxa* П, насіння та рослини зернових (пшениця яра сорту Харківська 23 та озима –Красуня Одеська, кукурудза гібрид Луганський 287 МВ).

Дослідження динаміки росту і чисельності мікроорганізмів проводили загально-відомими методами [6].

Вивчали залежність антагоністичної активності штамів від складу поживного середовища, його об'єму (50, 100, 200 мл) та фази росту культури (кожні вісім годин після внесення мікробіологічного матеріалу у поживне середовище) методом штриха [11].

Відбір, підготовка до мікробіологічного аналізу та визначення чисельності мікроорганізмів у пробах ризосфери рослин проводили за загальноприйнятими методиками [12].

Фітотоксичність ґрунту ризосфери визначали за спеціальною методикою [7], нітрогеназну активність ризосфери – за методом Харді в модифікації М.М. Умарова [13].

Оцінку ступеню ураження рослин та поширення хвороби проводили за методами оцінки стійкості пшениці [5].

Вегетаційний дослід з ярою пшеницею проводили на субстраті - вермікуліт, використовували для сівби насіння, штучно інфіковане збудником кореневої гнилі пшениці *Fusarium culmorum* Sacc. Повторність дослідів 6-разова, ємність посудин – 500 мл. Поживний фон створювали за допомогою внесення повного середовища Прянішнікова [4].

Ділянкові дослідів з озимою пшеницею проводили на дослідних ділянках ПДС ІСГМ УААН, ґрунт – чорнозем південний, попередник – нут, повторність дослідів 4-разова. Польові дослідів з кукурудзою - на чорноземі звичайному (дослідне поле Луганського інституту селекції та технології) виконували у 3-разовій повторності, розміщення ділянок рендомізоване, загальна площа ділянки становила 20,0 м², облікова площа – 10,0 м².

Математичну обробку результатів проводили методом дисперсійного аналізу [2].

Показано високу антагоністичну активність штамів до фітопатогенних мікроміцетів *Fusarium oxysporum* Schl., *F. culmorum* Sacc, *F. sporotrichiella* Emend Snyder et Hansen, *F. avenaceum* Sacc, *F. moniliforme* Sheld, *F. graminearum* Swabe, *Alternaria alternata* Nees.

Так, пригнічення росту фітопатогенних мікроміцетів штамом *Bacillus sp.* 01-1 складало від 3 до 9 мм при культивуванні на середовищах різного складу, але адаптованих для спорових мікроорганізмів. Антифунгальна активність штаму реєструвалась на однаковому рівні при культивуванні штаму в різних обсягах середовища. Аналогічні результати отримано для штаму *Bacillus sp.* 12501.

Відомо, що при періодичному культивуванні цикл розвитку культур умовно поділяється на чотири фази, але в практичному плані найбільш важливим є період максимальної швидкості розмноження клітин (експоненційна фаза). Антагоністичну активність штамів спостерігали на кожній фазі росту та спороутворення клітин, але найбільш інтенсивною вона була в експоненційну фазу.

Таким чином, антифунгальна активність штамів *Bacillus sp.* 01-1 і 12501 не залежить від складу та об'єму середовища культивування мікроорганізму і досягає найбільшої активності в експоненційну фазу росту культури.

У вегетаційному досліді встановлено, що дія штамів *P. polytuxa* П та *Bacillus sp.* 01-1 і 12501 на ступінь ураження рослин кореневими гнилями не поступається хімічному протруювачу Раксил (табл. 1). Найбільш ефективним в цьому досліді виявився штам *P. polytuxa* П. Він пригнічував розвиток хвороби на 53%, тоді як Раксил тільки на 40% в порівнянні з контролем.

Таблиця 1. Вплив передпосівної бактеризації мікроорганізмами-антагоністами на розвиток хвороби штучно інфікованого (*F. culmorum*) насіння ярої пшениці сорту Харківська-23 (вегетаційний дослід, субстрат вермікуліт, 2006 р., ПДС ІСГМ)

Варіант досліді	Ступінь ураження рослин, бали (0-4)	Розвиток хвороби, %	
		середнє	% до контролю
Контроль (<i>Fusarium culmorum</i>)	1,00	20,8	100
Раксил	0,50	12,5	60,0
<i>P. polytuxa</i> П	0,17	9,7	46,6
<i>Bacillus sp.</i> 01 – 1	0,17	13,8	66,3
<i>Bacillus sp.</i> 12501	0,17	13,8	66,3
НІР ₀₅	0,44		

В польовому досліді з кукурудзою гібриду сорту Луганський 287 МВ показано зниження поширення пухирчастої сажки під впливом біопрепарату та досліджуваних штамів (табл. 2). Поширення хвороби у контрольному варіанті складало 3,3%, при використанні Біополіциду – 2,2%, при використанні штаму *Bacillus sp.* 12501 – 1,1%. Не зареєстровано хвороби у варіанті з використанням штаму *Bacillus sp.* 01-1.

Таблиця 2. Поширення пухирчастої сажки кукурудзи гібриду Луганський 287 МВ у фазі повної стиглості (польовий дослід, 2005 р., чорнозем звичайний).

Варіант	Поширення хвороби, %			
	I повтор-ність	II повтор-ність	III повтор-ність	середнє по варіанту
Контроль	3,3	3,3	3,3	3,3
Біополіцид	0	6,6	0	2,2
<i>Bacillus sp.</i> 12501	0	0	3,3	1,1
<i>Bacillus sp.</i> 01-1	0	0	0	0
НІР ₀₅	-	-	-	2,50

Отже, інокуляція посівного матеріалу кукурудзи гібриду Луганський 287 МВ штамом *Bacillus sp.* 01-1 забезпечила відсутність пухирчастої сажки. Урожайність зерна кукурудзи F₁ Луганський 287 МВ в цьому варіанті істотно перевищувала контроль на 7,5 ц/га (15%).

Досліджені штами здатні приживатися в ризосфері інокульованих рослин. Інтродукція штамів *P. polytuxa* П, *Bacillus sp.* 01-1 та 12501 в ризосферу злакових рослин приводить до зменшення кількості мікроміцетів та фітотоксичності ґрунту ризосфери.

Так, дослідження змін мікробного угруповання ризосфери пшениці сорту Красуня Одеська в фазі цвітіння у польовому ділянковому досліді під впливом штаму *Bacillus sp.* 12501 показало, що кількість амоніфікаторів зменшилась відносно контролю і складала 3,57 та 6,15 млн. КУО (колонієутворюючих одиниць)/г абсолютно сухого ґрунту відповідно. Також зростала чисельність спорових бактерій з 0,33 млн. КУО/г у контролі до 0,56 млн. КУО у варіанті з інокуляцією штамом *Bacillus sp.* 12501. Встановлено зростання чисельності азотфіксуючих мікроорганізмів під його впливом – 6,47 млн. КУО/г абсолютно сухого ґрунту, тоді як у контрольному варіанті їх чисельність складала 2,95 млн. КУО. Зареєстровано зростання нітрогеназної активності до 9,37 нМ C_2H_4 / 1 корінь/добу при використанні досліджуваного штаму, в контролі цей показник складав – 2,75 нМ. Кількість мікроміцетів у контролі становила 0,15 млн. КУО/г ґрунту, у варіанті зі штамом *Bacillus sp.* 12501 – 0,05 млн. КУО/г абсолютно сухого ґрунту.

Отже, зміни в мікробному угрупованні ризосфери озимої пшениці під впливом штаму *Bacillus sp.* 12501 вказують на його регуляторну активність в цьому мікробному ценозі.

Таким чином, за результатами проведених досліджень зроблено наступні висновки.

1. Досліджувані штами *Bacillus sp.* 12501 і 01-1 мають високу антагоністичну активність, яка не залежить від складу поживного середовища та об'єму культивування та набуває найбільшої активності в експоненційну фазу росту культури.

2. Доведено здатність штамів *Bacillus sp.* 12501 і 01-1 та препарату Біополіцид знижувати ступінь ураження інокульованих рослин ярої пшениці сорту Харківська 23 кореневими гнилями при штучному інфікуванні насіння фітопатогеном *F. culmorum* на 34% і 53% відповідно, в порівнянні з контролем. Обробка насіння хімічним протруювачем Раксил знижувала ураження рослин в цьому досліді на 40%.

3. Встановлено зниження поширення пухирчастої сажки у польовому досліді з кукурудзою гібриду Луганський 287 МВ під впливом передпосівної інокуляції насіння Біополіцидом та штамми *Bacillus sp.* 12501 в порівнянні з контрольним варіантом, на 30 та 60% відповідно. Обробка насіння штамом *Bacillus sp.* 01-1 забезпечила відсутність пухирчастої сажки. Урожайність зерна кукурудзи в цьому варіанті перевищувала контроль на 15%.

4. Показано регуляторну дію штаму *Bacillus sp.* 12501 в мікробному угрупованні ризосфери озимої пшениці. Під впливом інтродукції штаму вдвічі зростає чисельність азотфіксуючих мікроорганізмів, у три рази зростає нітрогеназна активність ґрунту ризосфери, на порядок зменшується кількість мікроміцетів.

1. *Биопрепараты* в сельском хозяйстве: Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве / И.А.Тихонович, А.П. Кожемяков, В.К. Чеботарь и др., – М.: Б.и., 2005. – 154 с.
2. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1973. – 350 с.
3. *Кавецький В.М.* Екоотоксикологічне обґрунтування застосування засобів хімізації // Агроекологічний журн. – 2002. – № 2. – С. 24 – 30.
4. *Методы* исследований клубеньковых бактерий: Методические рекомендации для курсов повышения квалификации научных сотрудников по сельскохозяйственной микробиологии / Т.А. Новикова, Л.М. Афанасьева – Л.: Б.и., 1981. – 48 с.
5. *Методы* селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к болезням в странах – членах СЭВ. – Прага, 1988. – 321 с.
6. *Мікробіологія: Підручник.* – К.: Київськ. ун-т, 2005. – 357 с.
7. *Мочалов Ю.М., Шерстобоев Н.К.* Способ определения фитотоксичности почвы. А.с. СССР № 90085
8. *Петюх Г.П., Патика В.П.* Сучасні агротехнології в Україні: проблеми та перспективи // Агроекологічний журн. – 2005. – № 1. – С. 3 – 7.

9. Рева О.Н., Полтавский А.Н. Использование полимеразной цепной реакции для идентификации штаммов эндофитного экотипа *Bacillus amyloliquefaciens* // Микробиологичний журн., – 2005. – 67, № 4., С. 14 – 20.
10. Сайко В.Ф. Землеробство в сучасних умовах // Вісн. аграрної науки. – 2002. – № 5 (589). – С. 5 – 10.
11. Сзги Й. Методы почвенной микробиологии: Пер. с венг.; под ред. и с предисл. Г.С. Муромцева. – М.: Колос, 1983. – 296 с.
12. Теннер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1987. – С. 145 – 156.
13. Умаров М.М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенномикробиологических исследованиях // Почвоведение. – М. – 1976, № 11, – С. 119 – 123.
14. Шерстобоева О.В. Элементы технології застосування *Bacillus polymyxa* – діазотрофа з антифунгальними властивостями // Физиология и биохимия культурных растений. Научно-теоретический журн. – 2003. – 35, № 1 (201) – С. 79 - 83.
15. Zhengyu Huang, Robert F. Bonsall, Dmitri V. Mavrodi, David M. Weller and Linda S. Thomashow. Transformation of *Pseudomonas fluorescens* with genes for biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid improves biocontrol of rhizoctonia root rot and in situ antibiotic production // FEMS Microbiology Ecology, Volume 49, Issue 2, 1 August 2004, p. 243 – 251.

Південна дослідна станція Інституту
сільськогосподарської мікробиології УААН

Надійшла 06.07.2007

УДК 631.461: 631.463

ЗАСТОСУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ-АНТАГОНІСТІВ ДЛЯ БІОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ ФІТОПАТОГЕНІВ ЗЕРНОВИХ РОСЛИН

Т.М. Мельничук, М.К. Шерстобоев, Т.Ю. Пархоменко, І.О. Каменева, Н.В.Алексєєнко, О. В. Каліберденко
Південна дослідна станція Інституту сільськогосподарської мікробиології УААН

Встановлено зниження ступеню ураження рослин ярої пшениці кореневими гнилями під впливом препарату Біополіцид та штамів *Bacillus sp.* 12501 і 01-1. Виявлено зменшення поширення пухирчастої сажки під впливом Біополіциду на 30% та штаму *Bacillus sp.* 12501 на 60 % відносно контролю. При використанні штаму *Bacillus sp.* 01-1 хвороби не виявлено. Під впливом штаму *Bacillus sp.* 12501 в мікробному угрупованні ризосфери озимої пшениці підвищується чисельність азотфіксуючих мікроорганізмів, знижується кількість мікроміцетів.

UDC 631.461: 631.463

USING OF MICROORGANISM-ANTAGONISTS FOR BIOLOGICAL CONTROL OF GRAIN PLANT PHYTOPATHOGENS

T.N. Melnichuk, N.K. Sherstoboyev, T.Y. Parkhomenko, I.A. Kameneva, N.V.Alekseyenko, Ye.V. Kaliberdenko
The South experimental station of Institute of agricultural microbiology UAAS

Decreasing of degree of spring wheat plant affection by root rot under influence of preparation Biopolycid and strains of *Bacillus sp.* 12501 and 01-1 is established. Decreasing of boil smut widespread is registered in variants with using of Biopolycid on 30% and *Bacillus sp.* 12501 on 60% in comparison with control. In variant with *Bacillus sp.* 01-1 disease is not registered. The quantity of nitrogen-fixing bacteria increases and the quantity of fungi decreases in rhizosphere of winter wheat under effect of strains *Bacillus sp.* 12501.