

ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ *BACILLUS AMYLOLIGUEFACIENS* ТА *BACILLUS SUBTILIS* ДЛЯ ЗАХИСТУ СОЇ ВІД БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ

Лапа С.В.,¹ Житкевич Н.В.,¹ Жмурко Л.Г.²

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ, вул. Академіка Заболотного, 154, м. Київ, 03143, Україна

²Національний науковий центр “Інститут землеробства УААН”, вул. Машинобудівників, 2б, Київська обл., смт. Чабани, 08162, Україна

*Встановлено, що біологічний препарат спорофіт, створений на основі *Bacillus amyloliguefaciens* УКМ 5137, можна рекомендувати як засіб захисту сільськогосподарських рослин від бактеріальних хвороб, викликаних збудниками роду *Xanthomonas*. Показано, що суміш із двох штамів – *Bacillus amyloliguefaciens* УКМ 5137 та *Bacillus subtilis* УКМ 5009 – проявляє антагоністичні властивості до фітопатогенів родів *Xanthomonas* та *Pseudomonas* і може бути використана як основа для створення біопрепарату проти бактеріозів сої.*

Ключові слова: *Bacillus amyloliguefaciens*, *Bacillus subtilis*, антагоністична дія, фітопатогенні бактерії

Соя – цінна продовольча, кормова і технічна культура, яка є джерелом білка, служить сировиною для виробництва олії, комбікормів та багатьох інших продуктів. Унікальність цієї культури полягає в рідкісному хімічному складі: в її бобах міститься 38-42 % білка, 18-22 % жиру, 25-30 % вуглеводів, а також вітаміни, мінеральні речовини, ферменти. Завдяки тому, що в симбіозі з бульбочковими бактеріями рослини сої активно фіксують азот атмосфери, покращується родючість і азотний баланс ґрунту.

Згідно зі статистичними даними, в Україні у 2004 р. вироблялося всього 366 тис. т сої. Однією з причин такого незначного обсягу був вузький ринок її збуту, відсутність спеціальної техніки для вирощування культури. Докорінно змінити ситуацію покликана профільна програма “Сою України 2005-2010”: у найближчі п’ять років виробництво даної культури, відповідно до цієї програми, має збільшитися до 1,7 млн. т, а площі під соєю – до 1-1,2 млн. га [8].

Великої шкоди посівам сої завдають не тільки фітопатогенні гриби, а й бактерії. Їх розвиток призводить до зниження продук-

тивності, а то й загибелі рослин. Фітопатогенні бактерії широко розповсюджені в природі і в умовах, сприятливих для їхнього розвитку, можуть спричинити значне зниження врожайності зернобобових [1,3].

Технологія виробництва сої включає застосування пестицидів (гербіцидів, фунгіцидів, інсектицидів та ін.) – хімічних сполук різної дії. Однак відомо, що застосування пестицидів призводить до забруднення продукції, навколишнього середовища та накопичення продуктів розпаду в ґрунті. Тому прийнята у світовій практиці концепція інтегрованого захисту рослин передбачає обмеження застосування хімічних пестицидів за рахунок використання екологічно безпечних методів, одним з яких є біологічний. Проте цей метод захисту сої від хвороб поки що застосовується не дуже широко, оскільки на сьогодні в нашій країні біологічних препаратів виробляється мало, а для захисту сої – не зареєстровано жодного. Труднощі виникають на всіх етапах розробки препарату – від пошуку високоактивних штамів з широким спектром антагоністичної дії щодо фітопатогенів до їх впровадження у виробництво.

Останнім часом активно ведеться пошук і впроваджуються у виробництво біопрепаратів для захисту рослин на основі бактерій роду *Bacillus* [12,13]. У Росії широко застосовуються для захисту рослин від хвороб такі біопрепарати, як агат, бактофіт, фітоспорин, фітоспорин М [10,11].

В Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного на основі *Bacillus amyloliguefaciens* УКМ 5137 створено новий біологічний препарат – спорофіт, який проходить випробовання в польових умовах. Показано, що цей препарат при його застосуванні для захисту гречки від сірої гнилі дозволяє зменшити ураженість посівів збудником цієї хвороби та значно підвищити врожайність культури [4]. В результаті лабораторних досліджень було встановлено, що спорофіт проявляє антагоністичні властивості щодо різних видів бактерій роду *Xanthomonas* [6].

Метою досліджень було: визначити в лабораторних умовах антагоністичну дію штамів *Bacillus amyloliguefaciens* УКМ 5137, *Bacillus subtilis* УКМ 5009 та суміші цих культур (*Bacillus amyloliguefaciens* УКМ 5137 та *Bacillus subtilis* УКМ 5009, взятих у співвідношенні 1:1) щодо фітопатогенних бактерій з родів *Xanthomonas* і *Pseudomonas*; у польових умовах визначити ефективність дії суміші штамів *B. amyloliguefaciens* УКМ 5137 і

B. subtilis УКМ 5009 щодо бактеріозів сої.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень слугували аеробні спороутворювальні бактерії *Bacillus amyloliguefaciens* УКМ 5137 та *Bacillus subtilis* УКМ 5009, ідентифіковані за визначником Бергі [5].

Антагоністичну дію бактерій *B. amyloliguefaciens* УКМ 5137 (1), *B. subtilis* УКМ 5009 (2) та суміші цих штамів (1+2), взятих у співвідношенні 1:1, щодо колекційних та ізольованих фітопатогенів з родів *Xanthomonas* та *Pseudomonas* досліджували методом радіальних штрихів [2]. Суть методу полягає в тому, що 18-годинну культуру бактерії висівали на поживне середовище в центр чашки Петрі діаметром 12 см. Через 5 діб інкубування в термостаті при 28 °С підсівали радіальним штрихом тест-культури з титром бактеріальної суспензії 5×10^8 КУО/мл. Зони відсутності росту враховували через 18-24 годин інкубування. Контролем слугували типові штами бактерій роду *Bacillus*.

Бактеріостатична (б/с) та бактерицидна (б/ц) дія досліджуваних бактерій оцінювалась за радіусом пригнічення росту тест-культур фітопатогенних бактерій. Бактерицидна дія на тест-культури в радіусі 15 мм або більше вважалась позитивною.

Польові досліди з визначення ефективності дії бактерій роду *Bacillus* проводили у дослідному господарстві “Чабани” Інституту землеробства УААН. Насіння сої обробляли суспензією суміші штамів *Bacillus amyloliguefaciens* УКМ 5137 та *Bacillus subtilis* УКМ 5009 (1+2), взятих у рівних пропорціях з титром 1×10^7 КУО/мл. Робочий розчин з титром 1×10^7 КУО/мл виготовляли завчасно до обробки насіння. Експозиція замочування насіння сої становила 20 хв. Витрата ліофільно висушеного препарату бактерій становила 0,4-0,5 кг/га. У дослідах використано середньостійкий до бактеріальних хвороб сорт сої Устя.

Результати та їх обговорення. В результаті досліджень показано, що *Bacillus amyloliguefaciens* УКМ 5137 – грампозитивні аеробні спороутворювальні палички, які продукують каталазу. Ростуть на м'ясо-пептонному агарі (МПА), сусло-агарі, середовищі Громико, картопляному агарі. На МПА утворюють складчасті колонії в'язкої консистенції бежевого кольору, з краями неправильної форми, на картопляному агарі – колонії світло-бежевого кольору, блискучі, в'язкої консистенції з рівними краями, на середовищі Громико – колонії бежевого кольору, складчасті, з підвищеним

центром, краї зрізані, консистенція в'язка. Клітини при спороутворенні не роздуваються, після росту на глюкозному агарі в протоплазмі вакуолі не утворюються. На МПБ культура утворює плівку. Ферментує глюкозу, арабінозу, маніт, ксилозу з утворенням кислоти, дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера, гідролізує крохмаль, желатину, росте при 7 % NaCl, утилізує цитрат, не використовує пропіонат. Культура не росте в анаеробних умовах при додаванні у живильне середовище 10 % NaCl. Як показали дослідження, штам *Bacillus amyoliguefaciens* УКМ 5137 продукує комплекс біологічно активних речовин, у тому числі антибіотики поліпептидної та аміноглікозидної природи [7, 9].

Встановлено, що штам *Bacillus amyoliguefaciens* УКМ 5137 має виражені антагоністичні властивості щодо широкого спектру фітопатогенів, характеризується високою антагоністичною активністю щодо збудників хвороб бактеріальної природи, в лабораторних умовах проявляє антагоністичну дію стосовно багатьох видів фітопатогенних бактерій роду *Xanthomonas* (табл. 1) та збудника пустульного бактеріозу сої *X. axonopodis* pv. *glycines* (табл. 2).

Показано, що штам *B. subtilis* УКМ 5009 – аеробна спороутворювальна бактерія, яка добре росте на поживних середовищах при температурі 37 °С. На елективному середовищі утворює складчасті колонії темно-коричневого кольору з нерівними краями, пласкі, неправильної форми, розпливчасті. Клітини при спороутворенні не роздуваються, після росту на глюкозному агарі в протоплазмі вакуолі не утворюються. Результати вивчення антагоністичної дії *B. subtilis* УКМ 5009 показали, що штам проявляє активність щодо деяких фітопатогенів родів *Pseudomonas* та *Xanthomonas*.

Встановлено, що суміш штамів-антагоністів (*B. amyoliguefaciens* УКМ 5137 + *B. subtilis* УКМ 5009 у рівних співвідношеннях) проявляє комплексну дію щодо збудників фітопатогенів з родів *Pseudomonas* та *Xanthomonas* (табл. 1, 2). В ході досліджень встановлено, що суміш штамів *B. amyoliguefaciens* УКМ 5137 та *B. subtilis* УКМ 5009 (1+2) проявляє високу активність відносно бактеріальних хвороб сої при використанні її в польових умовах. Показано, що штам *B. amyoliguefaciens* УКМ 5137, який в лабораторних умовах виявляє антагоністичну дію тільки щодо збудників бактеріальних хвороб з роду *Xanthomonas*, в польових

умовах спільно з *B. subtilis* УКМ 5009 гальмує розвиток хвороб, викликаних збудниками, які належать до родів *Xanthomonas* і *Pseudomonas*.

Таблиця 1. Чутливість фітопатогенних бактерій до *B. amyloliguefaciens* УКМ 5137, *B. subtilis* УКМ 5009 та суміші цих штамів

Тест-культури фітопатогенних бактерій	Зони затримки росту тест-культур штамами бацил, мм		
	<i>B. amyloligue- faciens</i> УКМ 5137 (1)	<i>B. subtilis</i> УКМ 5009 (2)	Суміш штамів (1+2)
<i>Pseudomonas savastanoi</i> <i>pv. glycinea</i> 8571	0	25	25
<i>P. fluorescens</i> 8573	0	б/с	б/с
<i>P. lachrymans</i> 7395	0	18	22
<i>P. syringae</i> 8511	0	22	20
<i>P. cepacia</i> 4207	9	18	21
<i>Xantomonas campestris</i> 80036	35	19	35
<i>X. maltofilia</i>	30	17	30
<i>X. malvacearum</i> 6518	25	18	30
<i>X. phaseoli</i> 262	35	17	35
<i>X. ampelina</i> 10 a	33	19	35
<i>X. vesicatoria</i>	30-45	21	35

Примітка: б/с – бактеріостатична дія; цифри – зона бактерицидної дії; 0 – антагоністична дія відсутня.

Виявлено, що поширення бактеріозів при використанні суміші штамів зменшується у всі фази розвитку рослин сої (табл. 3). Гальмується також розвиток хвороб у всі фази росту сої, хоча дещо повільніше, ніж поширення. Як засвідчили результати дослідів, продуктивність сої при цьому підвищується. Порівнявши ефективність традиційного хімічного пестициду фундазолу та показники контролю, можна зробити висновок, що використання суміші запропонованих штамів-антагоністів для захисту посівів сої від ураження бактеріальними хворобами є перспективним.

Таблиця 2. Чутливість фітопатогенних бактерій до *B. amyloliguefaciens* УКМ 5137, *B. subtilis* УКМ 5009 та суміші цих штамів

Тест-культури фітопатогенних бактерій	Зони затримки росту тест-культур штамами бацил, мм		
	<i>B. amyloliguefaciens</i> УКМ 5137 (1)	<i>B. subtilis</i> УКМ 5009 (2)	Суміш штамів (1+2)
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> , шт. 3, 8562, 8609, 8835, 9075; 5, 11,8 с	30-42	25	30-35
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> , 10 штамів	30-42	20	30-35
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> , шт. 8541, 8571, 9072, 9074; 1, 4, 22	0	15-20	15-20
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>tabaci</i> , шт. 223, 225	0	20	15
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , шт. 8511, 1с	0	20-23	15
<i>Pantoea agglomerans</i> , шт. 8490; 2, 3, 7,	0	10	5-12

Дослідження впливу суміші штамів *B. amyloliguefaciens* УКМ 5137 і *B. subtilis* УКМ 5009 на поширення і розвиток бактеріозу показали її здатність зменшувати ураженість рослин бактеріальною кутастістю, плямистістю листя у всі фази розвитку рослин, починаючи від появи сходів до дозрівання. Рівень поширення та розвитку бактеріозу при застосуванні суміші *B. amyloliguefaciens* УКМ 5137 і *B. subtilis* УКМ 5009 був у 2-3,8 раза нижчим, ніж у контролі, і в 1,5 раза – ніж при застосуванні хімічного фунгіциду фундазолу. Відмічено, що під час цвітіння та плодоутворення, коли відбувається максимальний розвиток інфекції, у контрольному варіанті (без обробки) кількість уражених бактеріозом рослин становила 76,5 % при розвитку хвороби – 48,5 %, а в результаті застосування суспензії сіміші штамів бацил – 37,5 і 12,6 %, відповідно (табл. 3).

Таблиця 3. *Ефективність дії суміші штамів V. atyololiguefaciens УКМ 5137 і V. subtilis УКМ 5009 на ураженість сої бактеріозом (Інститут землеробства УААН, дослідне господарство “Чабани”, 2004-2005 рр.)*

Варіанти	Бактеріоз, %						Висота рослин, см	Врожайність, ц/га
	поширення хвороби*			розвиток хвороби**				
	1	2	3	1	2	3		
Контроль	28,7±0,06	76,5±0,11	50,0±0,05	9,5±0,11	48,5±0,11	22,5±0,17	71,9±0,17	30,3±0,17
Фундазол	16,1±0,11	58,0±0,11	34,7±0,11	6,7±0,11	19,0±0,17	9,9±0,17	72,1±0,11	29,8±0,4
Суміш штамів бацил	8,1±0,17	37,5±0,17	20,6±0,17	1,1±0,11	12,6±0,23	11,8±0,17	76,6±0,17	32,3±0,23

Примітки:

1-3 – фази розвитку сої: першого листка (1), цвітіння (2), дозрівання (3);

* кількість хворих рослин до загальної кількості рослин у досліді;

** ступінь розвитку хвороби (бали, переведені у % за 5-бальною шкалою)

Встановлено також, що суміш штамів *B. amyloliguefaciens* УКМ 5137 і *B. subtilis* УКМ 5009 не тільки пригнічувала розвиток бактеріальних хвороб, а й виявляла рiстактивууючий вплив на розвиток рослин. Так, за iнтенсивнiстю росту рослини цього варiанту дослiду перевищували не тiльки показники контролю, але й варiанту з використанням фундазолу. Врожайнiсть пiд впливом сумiшi штамiв вiдносно даних контролю зроста на 2,0 ц/га, порiвняно з фундазолом – на 2,5 ц/га.

Таким чином, в результатi проведених дослiджень встановлено, що штам *B. amyloliguefaciens* УКМ 5137 проявляє антагонiстичну дiю щодо фiтопатогенних бактерiй з роду *Xanthomonas*, в тому числi – збудника пустульного бактерiозу сої *X. axonopodis* pv. *glycines*.

Показано, що *B. subtilis* УКМ 5009 проявляє антагонiстичну активнiсть щодо ряду фiтопатогенiв з родiв *Pseudomonas* і *Xanthomonas*. Доведена можливiсть застосування бактерiй роду *Bacillus* для створення нових бiопрепаратiв з заданими властивостями.

Показано також, що сумiш штамiв (*B. amyloliguefaciens* УКМ 5137 + *B. subtilis* УКМ 5009) проявляє комплексну дiю щодо збудникiв фiтопатогенних бактерiй – представникiв родiв *Pseudomonas* і *Xanthomonas*, що вiдкриває можливостi створення комплексного бiологiчного препарату для захисту сої вiд бактерiальних хвороб.

1. Бельтюкова К.И., Королева И.Б., Мурас В.А. Бактериальные болезни зернобобовых культур. – К.: Наук. думка, 1974. – 328 с.

2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Изд. МГУ, 1994. – 512 с.

3. Житкевич Н.В., Жмурко Л.Г. Розповсюдження бактерiальних захворювань сої у Київській облaстi // X з'їзд Тов. мiкробiологiв України (м. Одеса, вересень, 2004): Тез. доп. – Одеса: Астропринт, 2004. – С. 244-248.

4. Жмурко Л.І., Грищенко Р.Є., Лапа С.В., Ткаченко Н.В. Спорофiт проти сiрої гнилі гречки // Карантин і захист рослин. – 2005. – № 6. – С. 10-11.

5. Краткий определитель бактерий Берги. – М.: Мир, 1980. – 495 с.

6. Лапа С.В., Житкевич Н.В., Кирик М.М. Препарат спорофіт як засіб захисту від фітопатогенних бактерій // Міжнар. наук. конфер. “Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія. Алелопатія” (м. Київ, жовтень, 2005): Тез. доп. – К.: Альфа-Прайм, 2005. – С. 69.

7. Лапа С.В., Рева О.Н. Деякі властивості штамів *Bacillus subtilis*, активних щодо збудників гнилей плодів та ягід // Мікробіол. журн. – 2005. – Т. 67, № 1. – С. 22-31.

8. Никифоров С. Соя – новий фаворит, кукурудза – колишній. // Агроперспектива. – 2005. – № 3. – С. 42-43.

9. Рева О.Н. Поиск продуцентов новых полипептидных антибиотиков среди штаммов *Bacillus* методом генетического типирования // Микробиол. журн. – 2005. – Т. 67, № 6. – С. 25-27.

10. Смирнов В.В., Менликиев М.Я., Сорокулова І.Б., Рева О.Н. Эндофитные бактерии, использование их в защите растений от болезней // Міжнар. наук. конфер. “Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія. Алелопатія” (м. Київ, жовтень, 2005): 36. статей. – К.: Альфа-Прайм, 2005. – С. 181-185.

11. Франк Р.И., Сазонова Л.А., Удальева С.Г. Биологический фунгицид бактофит // Средства защиты растений. – 2004. – № 5. – С. 25.

12. Perez S.M., Marrero T., Martinez V.R. Control de la pustule bacteriana de la soya con un extracto microbiano // Cienc. agr. – 1990. – № 40. – P. 31-35.

13. Rukayadi Y., Suvanto A., Tjahjono B., Harling R. Survival and epiphytic fitness of a nonpathogenic mutant of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* // Appl. And Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66, N.3. – P. 1183-1189.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ *BACILLUS AMYLOLIGUEFACIENS* И *BACILLUS SUBTILIS* ДЛЯ ЗАЩИТЫ СОИ ОТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Лапа С.В.,¹ Житкевич Н.В.,¹ Жмурко Л.Г.²

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАНУ, г. Киев

²Национальный научный центр “Институт земледелия УААН”, пгт. Чабаны

*Установлено, что биологический препарат спорофит на основе *Bacillus amyloliguefaciens* УКМ 5137, можно рекомендовать в качестве средства защиты сельскохозяйственных растений от бактериальных заболеваний, вызванных возбудителями рода *Xanthomonas*. Показано, что смесь из двух штаммов – *Bacillus amyloliguefaciens* УКМ 5137 и *Bacillus subtilis* УКМ 5009 – проявляет антагонистические свойства против фитопатогенов родов *Xanthomonas* и *Pseudomonas* и может быть использована как основа для создания биопрепарата против бактериозов сои.*

Ключевые слова: *Bacillus amyloliguefaciens*, *Bacillus subtilis*, антагонистическое действие, фитопатогенные бактерии.

EFFICIENCY OF *BACILLUS AMYLOLIGUEFACIENS* AND *BACILLUS SUBTILIS* USE FOR SOYBEAN PROTECTION FROM BACTERIAL DISEASES

Lapa S.V., Zhitkevitch N.V., Zhmurko L.G.

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, Kyiv

²Institute of Agriculture, UAAS, Chabani

*It is recommended to use a biological preparation Sporophit based on *Bacillus amyloliguefaciens* UKM 5137 as a means of agricultural plant protection against bacterial disease, caused by *Xanthomonas* agents. It is determined that the composition of two strains *Bacillus amyloliguefaciens* UKM 5137 and *Bacillus subtilis* UKM 5009 displays antagonistic properties against phytopathogenic agents of *Xanthomonas* and *Pseudomonas* genus and can be used as a basis for creation of a biopreparation against soybean bacteriosis.*

Key words: *Bacillus amyloliguefaciens*, *Bacillus subtilis*, antagonistic action, phytopathogenic bacteria