

## **ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ НОВЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ С АНТАГОНИСТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ К ФИТОПАТОГЕНАМ НА ЭПИФИТНУЮ МИКРОФЛОРУ СЕМЯН И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ ТОМАТА**

**Пархоменко Т.Ю.**

Южная опытная станция Института сельскохозяйственной  
микробиологии УААН,  
ул. К. Маркса, 107, пгт. Гвардейское Симферопольского р-на,  
АР Крым, 97513, Украина  
E-mail: icxm@mail.ru

*Показаны особенности влияния новых штаммов микроорганизмов с антагонистическими свойствами к фитопатогенам на развитие растений томатов. Изучена антагонистическая активность штаммов по отношению к патогенным микромицетам рода Fusarium. С помощью кластерного анализа выделены группы штаммов, сходные по характеру влияния на развитие растений томата.*

Ключевые слова: *штамм, Bacillus, антагонизм, кластерный анализ.*

В настоящее время все чаще обращается внимание на негативные стороны применения химических средств защиты растений от болезней и вредителей [1]. Альтернативой агрохимикатам должны стать агротехнические и биологические методы контроля возбудителей болезней, в том числе, микробные препараты на основе микроорганизмов, повышающих устойчивость растений к болезням и проявляющие антагонистические свойства к фитопатогенам. Применение микробных препаратов является достаточно распространенным приемом и может обеспечивать контроль развития заболеваний в течение всего периода вегетации растений, а также во время хранения семян и сельскохозяйственной продукции [2]. Для повышения эффективности биологического контроля необходима разработка новых препаратов, расширение их ассортимента по спектру действия, а также выяснение условий эффективного применения в комплексе с другими агротехническими приемами земледелия [3].

В производстве препаратов для биоконтроля фитопатогенов

применяют различные виды микроорганизмов-антагонистов, однако, чаще других используются представители родов *Pseudomonas* [4,5] и *Bacillus* [6-8].

Целью нашей работы явилось изучение антагонистической активности новых штаммов и особенностей их влияния на посевные свойства семян, их эпифитную микрофлору и развитие растений томатов.

**Материалы и методы.** Объектами исследования были перспективные и новые штаммы микроорганизмов, выделенные как антагонисты фитопатогенов: *Bacillus sp.* 01-1, 01-2, 19, 36, 28-1, 28-2, 30-1 и 30-2 из коллекции Южной опытной станции Института сельскохозяйственной микробиологии УААН. Сравнение проводили со штаммом *Bacillus subtilis* D-26, являющимся основой препарата Фитоспорин. В опытах использовали семена томата сорта Шанс. Для предпосевной обработки семян применяли водную суспензию бактерий в количестве 2 % от массы семян.

Антагонистическую активность новых и перспективных штаммов, выделенных как антагонисты фитопатогенов по отношению к микромицетам – возбудителям болезней растений *Fusarium oxysporum*, *F. glumarum*, *F. moniliforme*, изучали методом штриха [9]. Культуры фитопатогенных грибов получены из Селекционно-генетического института УААН. Влияние штаммов микробов-антагонистов на посевные свойства семян (энергию прорастания, биомассу проростков и всхожесть) изучали согласно ГОСТ [10]. Эпифитную микрофлору семян изучали по методике Мишустина и Трисвятского [11]. Обработанные семена томатов хранили в лабораторных условиях. В вегетационных опытах изучали влияние штаммов бактерий на развитие растений томатов. Растения выращивали на черноземе южном в сосудах объемом 200 мл, повторность опыта 10-кратная.

Математическую обработку результатов проводили по общепринятым методикам [12], корреляционный анализ – в соответствии с методическими рекомендациями и программой кластерного анализа [13].

**Результаты и их обсуждение.** По проявлению степени антагонистической активности к фитопатогену *F. oxysporum* наиболее активными были *Bacillus sp.* 28-1, 28-2, 36 и 01-2, что превышало показатели референтного штамма *B. subtilis* D-26. По отношению к *F. glumarum* – штаммы *Bacillus sp.* 28-1, 01-2, 01-1

и 36 (на уровне активности *B. subtilis* D-26). Рост *F. moniliforme* подавляли все исследованные бактерии, однако наибольшую зону угнетения роста наблюдали при изучении *Bacillus sp.* 28-2, 28-1, 36, 01-2 и *B. subtilis* D-26 (табл. 1).

Различная степень антагонистической активности штаммов предполагает специфику их взаимоотношений с резидентными микроорганизмами сообществ эпифитов семян и ризосферы и влияние на развитие проростков и растений. Поэтому мы исследовали влияние микробов-антагонистов на эпифитную микрофлору семян томата, их посевные свойства и развитие растений.

В лабораторных опытах положительного влияния на энергию прорастания семян томата при инокуляции не отмечали. В варианте с применением *Bacillus sp.* 01-2 наблюдали существенное снижение энергии прорастания – на 8 % по сравнению с контролем, несмотря на то, что инокуляционная нагрузка этой бактерии была на уровне штаммов *Bacillus sp.* 01-1, 19, 36, 28-1 и 30-1. Существенно увеличивали биомассу проростков по сравнению с контролем *Bacillus sp.* 01-1 и 30-2 – на 13 % и 11 %, соответственно. Позитивную тенденцию к увеличению биомассы проростков наблюдали и в вариантах с инокуляцией *Bacillus sp.* 36, 28-1, 28-2, 30-1 (табл. 2).

**Таблица 1. Антагонистическая активность новых бактериальных штаммов к фитопатогенным представителям рода *Fusarium***

Штаммы микроорганизмов	Зона угнетения роста фитопатогена, мм		
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium glumarum</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
<i>Bacillus subtilis</i> D-26	7,75±0,75	10,00±1,08	10,25±0,48
<i>Bacillus sp.</i> 01-1	7,33±0,88	9,50±0,50	8,33±0,33
<i>Bacillus sp.</i> 01-2	12,67±1,76	15,20±2,08	11,50±3,52
<i>Bacillus sp.</i> 19	5,67±0,67	5,71±0,36	7,50±1,04
<i>Bacillus sp.</i> 36	13,00±1,22	9,25±0,63	14,50±1,04
<i>Bacillus sp.</i> 28-1	22,0±2,41	33,00±1,00	14,71±3,15
<i>Bacillus sp.</i> 28-2	16,33±3,09	не исследовали	15,40±2,16
<i>Bacillus sp.</i> 30-1	1,34±0,88	5,00±0,38	4,00±0,41
<i>Bacillus sp.</i> 30-2	2,67±0,67	2,33±0,21	1,67±0,42

**Таблица 2. Влияние микробов-антагонистов  
на посевные свойства семян томата сорта Шанс**

Варианты опыта	Инокуляционная нагрузка, млн КОЕ/г семян	Энергия прорастания, %		Биомасса 1 проростка	
		средняя	к контролю	средняя, мг	% к контролю
Контроль	–	92,5	100	12,54	100
Контроль (обработка водой)	–	90,00	97	12,06	96
<i>B. subtilis</i> D-26	2,66	89,00	96	11,26	90
<i>Bacillus sp.</i> 01-1	7,34	88,50	96	14,19	113
<i>Bacillus sp.</i> 01-2	8,00	84,75	92	12,47	99
<i>Bacillus sp.</i> 19	8,00	91,00	98	12,51	100
<i>Bacillus sp.</i> 36	8,60	89,25	96	13,28	107
<i>Bacillus sp.</i> 28-1	8,00	92,50	100	13,16	105
<i>Bacillus sp.</i> 28-2	18,00	93,00	101	13,01	104
<i>Bacillus sp.</i> 30-1	8,00	90,75	98	13,29	106
<i>Bacillus sp.</i> 30-2	10,6	89,25	96	13,94	111
НСР <sub>05</sub>		5,98	6,6	1,23	9,5

При закладке семян на хранение инокуляционная нагрузка бактерий на 1 г семян томатов составляла от 2,7 млн до 8,7 млн КОЕ/г семян (табл. 3). Через сутки после начала опыта численность бактерий значительно снизилась во всех вариантах в сравнении с первоначальной, но была значительно выше контрольных показателей (контроль I – сухие необработанные семена; контроль II – семена, обработанные водой). Так, в варианте с применением штамма *B. subtilis* D-26 количество бактерий составляло 1,2 млн КОЕ/г семян, в варианте с *Bacillus sp.* 01-1 – 1,6 млн КОЕ, с *Bacillus sp.* 01-2 – 1,9 млн КОЕ, с *Bacillus sp.* 19 – 0,7 млн КОЕ и с *Bacillus sp.* 36 – 3,0 млн КОЕ/г семян, в то же время, в контрольном варианте I количество бактерий составляло 0,014 млн КОЕ, а в контроле II – 0,001 млн КОЕ (табл. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о гибели большого количества клеток исследуемых штаммов в течение первых суток после инокуляции. Однако численность жизнеспособных клеток

остается достаточно высокой, а отмершие клетки могут создавать определенный биохимический фон на поверхности семени. При хранении семян количество бактерий в контрольных вариантах I и II уменьшалось и через 21 день составило 4,0 и 1,0 тыс. КОЕ, соответственно. Численность бактерий уменьшилась в варианте с инокуляцией штаммом *B. subtilis* D-26: через 7 суток после инокуляции она составляла 1,2 млн КОЕ, затем снижалась и на 21 день была на уровне 0,83 млн КОЕ/г семян. Количество бактерий на поверхности семян в варианте со штаммом *Bacillus sp.* 01-1 в течение 21 суток после инокуляции составляло от 1,9 до 1,4 млн КОЕ/г семян. Подобное изменение численности наблюдалось и в варианте с инокуляцией *Bacillus sp.* 19. В то же время количество бактерий на семенах в вариантах с применением *Bacillus sp.* 01-2 и 36 несколько возросла, что, вероятно, можно объяснить колебаниями влажности воздуха.

**Таблица 3. Влияние инокуляции на численность бактерий на семенах томата сорта Шанс при хранении**

Варианты опыта	Инокуляцион. нагрузка, млн КОЕ/г семян	Количество бактерий тыс. КОЕ/г семян			
		1-е сутки хранения	7-е сутки хранения	14-е сутки хранения	21-е сутки хранения
Контроль (I)	–	14,0±6,7	2,9±1,3	2,3±0,9	4,0±1,5
Контроль (II)	–	1,0±0,8	1,8±0,9	3,0±0,6	1,0±0,6
<i>B. subtilis</i> D-26	2,66	1171,0±81,8	1200,0±20,0	605,3±54,1	828,7±72,1
<i>Bacillus sp.</i> 01-1	7,34	1568,0±126,5	1328,0±24,0	1880,0±230,8	1381,3±65,9
<i>Bacillus sp.</i> 01-2	8,00	1893,5±53,7	1574,0±70,0	1908,0±144,5	2338,7±129,8
<i>Bacillus sp.</i> 19	8,00	699,0±92,2	1632,0±68,0	3773,3±306,3	1582,7±137,4
<i>Bacillus sp.</i> 36	8,66	3048,0±585,8	1556,0±132,0	2325,3±177,3	3344,0±189,4

*Примечание:* здесь и в табл. 4-5 контроль I – сухие необработанные семена; контроль II – семена, обработанные водой.

После 21 суток хранения в варианте с обработкой семян штаммом *B. subtilis* D-26 сохраняется приблизительно 30 % клеток бактерий в сравнении с инокуляционной нагрузкой (в этом случае

пренебрегаем количеством бактерий, исходно присутствовавших на семенах, так как в сравнении с инокуляционной нагрузкой их почти в 100 раз меньше). В варианте с применением *Bacillus sp.* 01-1 – 19 %, с *Bacillus sp.* 01-2 – 29 %, с *Bacillus sp.* 19 – 20 %, и со штаммом *Bacillus sp.* 36 – 39 %. (табл. 3). Количество бактерий на 21 сутки опыта в контроле I составило 4,0 тыс. КОЕ/г семян, в контроле II – 1,0 тыс. КОЕ/г семян. Необходимо отметить, что изменения численности бактерий во всех вариантах опыта не происходили линейно, им свойственны некоторые колебания. Поэтому, с уверенностью сказать, какую именно часть в конечном количестве бактерий на семенах составляют клетки интродуцированных штаммов, а какую – клетки резидентных бактерий, на основании данного опыта мы не можем.

Количество микромицетов в контроле I через сутки после начала опыта составляло 0,1 тыс. КОЕ/г семян, в контроле II – 0,15 тыс. КОЕ. В вариантах с инокуляцией этот показатель был на уровне контрольных вариантов (табл. 4).

**Таблица 4. Влияние микробов-антагонистов на численность микромицетов в составе эпифитной микрофлоры семян томата сорта Шанс при хранении**

Варианты опыта	Количество микромицетов, тыс. КОЕ/г семян			
	1 сутки хранения	7 суток хранения	14 суток хранения	21 сутки хранения
Контроль I	0,100±0,001	0,045±0,020	0,105±0,033	0,060±0,047
Контроль II	0,150±0,050	0,133±0,020	0,043±0,022	0,015±0,005
<i>B. subtilis</i> D-26	0,330±0,220	0,023±0,017	0,020±0,005	0,083±0,023
<i>Bacillus sp.</i> 01-1	0,050±0,050	0,013±0,008	0,020±0,010	0,020±0,001
<i>Bacillus sp.</i> 01-2	0,280±0,240	0,028±0,017	0,010±0,001	0,010±0,001
<i>Bacillus sp.</i> 19	0,050±0,050	0,090±0,071	0,058±0,025	0,010±0,001
<i>Bacillus sp.</i> 36	0,100±0,001	0,085±0,019	0,038±0,022	0,058±0,048

В ходе исследований отмечено увеличение численности микромицетов на 7 день наблюдений – в контроле II и варианте с применением *Bacillus sp.* 36 – 0,133 и 0,85 тыс. КОЕ/г семян, соответственно, а также на 14 день в контроле I – 0,105 тыс. КОЕ/г семян. В других вариантах опыта на протяжении 21 дня хранения семян этот показатель находился на уровне контрольных вариантов. В то же время, в целом, отмечено снижение

численности микромицетов в вариантах опыта с 1 по 21 день наблюдений.

Показателем эффективности инокуляции и характеристикой изменений в эпифитной микрофлоре семян служит развитие растений. Результаты вегетационного опыта, заложенного через месяц после обработки семян, свидетельствуют, что все исследуемые штаммы способствуют повышению высоты растений от 14 до 18 % (табл. 5). Наибольшее увеличение наблюдалось в варианте с *Bacillus sp.* 19. Сухая масса надземной части также возрастала во всех вариантах опыта с инокуляцией. Наибольшее увеличение наблюдалось в варианте с *Bacillus sp.* 01-1 – 30 % в сравнении с контролем I. При определении массы сухой корневой системы отмечена тенденция к увеличению показателей в вариантах с инокуляцией семян *B. subtilis* D-26, *Bacillus sp.* 01-1 и 36 в сравнении с контролем I. Такие же изменения отмечены и в варианте с обработкой семян водой (контроль II).

**Таблица 5. Влияние инокуляции на развитие растений томата сорта *Шанс* (обработка семян за 1 месяц до посева, длительность опыта 45 суток)**

Варианты опыта	Высота растений, см	Количество листьев, шт.	Масса сухой надземной части, г/растение	Масса сухой корневой системы, г/растение
Контроль I	21,01	4,5	0,10	0,02
Контроль II	22,48	4,4	0,11	0,03
<i>B. subtilis</i> D-26	24,01	4,9	0,12	0,03
<i>Bacillus sp.</i> 01-1	24,15	4,8	0,13	0,03
<i>Bacillus sp.</i> 01-2	22,28	4,5	0,11	0,02
<i>Bacillus sp.</i> 19	24,80	4,5	0,12	0,02
<i>Bacillus sp.</i> 36	23,24	4,4	0,11	0,03
НСП <sub>05</sub>	2,40	0,43	0,02	0,01

На основании полученных данных (исследования эпифитной микрофлоры семян и влияния бактериальных штаммов на развитие растений в вегетационном опыте) сформировано дерево группировки вариантов (рис.). В данной дендрограмме показан уровень близости (S) между вариантами опыта, выраженный в разнице между единицей (в случае полного сходства между

вариантами) и Евклидовом расстоянии между столбцами вариантов. Различают три диапазона уровней близости: малый ( $0 < S \leq 0,3$ ); средний ( $0,3 < S \leq 0,7$ ) и большой ( $0,7 < S \leq 1,0$ ). В данном случае кластеры штаммов распределяются, четко соответствуя нашему разделению на группы. Так, наибольшее сходство выявлено между вариантами *B. subtilis* D-26 и *Bacillus sp.* 01-1 ( $S = 0,68$ ). Значение  $S$  между двумя контрольными вариантами достаточно высоко ( $0,54$ ).

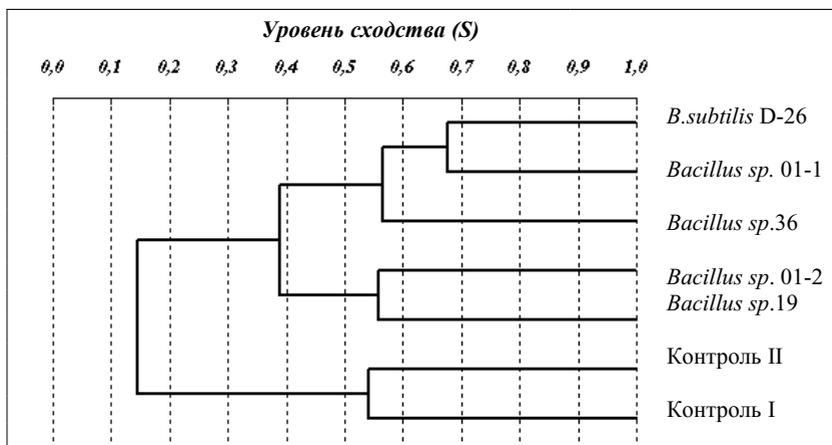


Рис. Дендрограмма группировки вариантов опыта (алгоритм «Дальний сосед») с учетом влияния штаммов на численность бактерий-эпифитов семян и на развитие растений томатов

Штамм *Bacillus sp.* 36 сходен со штаммами *B. subtilis* D-26 и *Bacillus sp.* 01-1 ( $S = 0,56$ ). Выделяется пара штаммов, близкая по своей активности – *Bacillus sp.* 01-2 и 19 ( $S = 0,55$ ).

Таким образом, наибольший эффект и комплексность воздействия на развитие растений томата оказали *Bacillus sp.* 01-1 и 19, а также референтный штамм *B. subtilis* D-26. Обработка семян этими бактериями способствовала улучшению развития растений томатов. Кластерный анализ демонстрирует сходство между особенностями влияния на растение штаммов *B. subtilis* D-26, *Bacillus sp.* 01-1, 36. Сходство обнаруживают штаммы *Bacillus sp.*01-2 и 19, образуя еще один кластер. Показано, что все штаммы, выделенные как микробы-антагонисты фитопатогенов, обладают средней степенью сходства и близки по влиянию на растения томатов.

1. Калантай Н.О. Економіко-екологічні результати розвитку інтенсифікації землеробства у світі /Калантай Н.О. //Міжнар. науково-практ. конф. «Актуальні проблеми сучасного землеробства» (м. Луганськ, 14-16 травня 2003 р.): доп. і виступи. – Луганськ: Вид-во ЛНАУ, 2003. – С. 197-201.
2. Моспалюк В.І. Еколого-економічна ефективність застосування біопрепаратів /Моспалюк В.І., Мерленко І.М. //Міжнар. науково-практ. конф. «Актуальні проблеми сучасного землеробства» (м. Луганськ 14-16 травня 2003 р.): доп. і виступи. – Луганськ: Вид-во ЛНАУ, 2003. – С. 351-354.
3. Вплив мікробних композицій на продуктивність томатів та їх стійкість до хвороб /Білявська Л.О., Титова Л.В., Сергієчко В.Г., Іутинська Г.О.//Міжнар. наукова конф. «Мікробні біотехнології»(м. Одеса, 11-15 вересня 2006 р.): тези доп. – Одеса: Астропринт, 2006. – С. 39.
4. Transformation of *Pseudomonas fluorescens* with genes for biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid improves biocontrol of rhizoctonia root rot and in situ antibiotic production /Zhengyu Huang, R.F. Bonsall, D.V. Mavrodi [et al.] //FEMS Microbiology Ecology. – 2004. – Vol. 49. – P. 243-251.
5. Lugtenberg B.J.J. Mechanisms used by *Pseudomonas* biocontrol strains to control tomato foot and root rot /Lugtenberg B.J.J. //11-th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions «New bridges between Past and Future» (St.-Petersburg, July 18-26, 2003): abstr. – St.-Petersburg, 2003. – P. 3.
6. Use of *Bacillus subtilis* as an endophyte for the control of diseases caused by fungi /Bacon Charles W., Hinton Dorothy M. /USA Department of Agriculture. – № 08/58-664; заявл. 29.12.95; опубл. 30.1.99; НПК 435/252.5.
7. Киселева Н.И. Комбинированные формы биоудобрений, которые защищают растения /Киселева Н.И. //Агро 21. – 2000. – № 5. – С. 14-15.
8. Маслак Д.В. Выделение антимикробных метаболитов бактерий *Bacillus subtilis* КМБУ 30043 /Маслак Д.В., Власик Н.В., Максимова Н.П. //Матер. междунар. конф. «Микробиология и биотехнология 21 столетия» (Минск, 22-24 мая 2002 г.). – Минск, 2002. – С. 51-52.
9. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии /Й. Сэги; под ред. и с предисл. Г.С. Муромцева; пер. с венг. – М.: Колос, 1983. – 296 с.
10. Насіння сільськогосподарських культур. Сортові та посівні якості. Технічні умови: ДСТУ 2240-93. – [Чинний від 2008-06-18]. – К.: Держстандарт України, 2008. – 73 с.
11. Мишустин Е.Н. Микробы и зерно /Е.Н. Мишустин, Л.А. Трисвятский. – М.: Изд-во АН СССР, 1963. – 291 с.
12. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта /Б.А. Доспехов. – М.:

Колос, 1973. – 350 с.

13. Воробьев Н.И. Методические рекомендации по использованию граф-анализа в исследованиях биосистем /Воробьев Н.И., Свиридова О.В., Кутузова Р.С. – СПб.-Пушкин: ГНУ ВНИИСХМ РАСХН, 2005. – 28 с.

**ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ НОВИХ ШТАМІВ  
МІКРООРГАНІЗМІВ З АНТАГОНІСТИЧНИМИ  
ВЛАСТИВОСТЯМИ ДО ФІТОПАТОГЕНІВ НА  
ЕПІФІТНУ МІКРОФЛОРУ НАСІННЯ І РОЗВИТОК  
РОСЛИН ПОМІДОРІВ**

**Пархоменко Т.Ю.**

Південна дослідна станція Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН, смт. Гвардійське

*Показано особливості впливу нових штамів мікроорганізмів з антагоністичними властивостями до фітопатогенів на розвиток рослин помідорів. Вивчено антагоністичну активність штамів по відношенню до патогенних мікроміцетів роду Fusarium. Кластерний аналіз дозволив виділити групи штамів, що схожі за характером впливу на розвиток рослин помідорів.*

Ключові слова: *штам, Bacillus, антагонізм, кластерний аналіз.*

**THE PECULIARITIES OF INFLUENCE OF  
NEW STRAINS OF MICROORGANISMS WITH  
ANTAGONISTIC PROPERTIES TO PHYTOPATHOGENS  
ON EPIPHYTE MICROFLORA OF SEEDS AND  
DEVELOPMENT OF TOMATO PLANTS**

**Parkhomenko T.Yu.**

The South Experimental Station of Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Gvardeyskoye

*The peculiarities of influence of new strains of microorganisms with antagonistic properties to phytopathogens on the development of tomato plants were shown. The antagonistic activity of provided strains to the pathogen fungi of genus Fusarium was studied. Strains similar by their influence on the development of tomato plants were grouped according to the cluster analyze data.*

Key words: *strains, Bacillus, antagonism, cluster analyze.*