



УКРАЇНА

(19) UA (11) 54923 (13) A

(51) 7 C05F11/08, C12N1/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ *BACILLUS SUBTILIS* ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО ДОБРИВА ДЛЯ РОС-  
ЛИННИЦТВА

1

2

(21) 2002054179

(22) 22 05 2002

(24) 17 03 2003

(46) 17 03 2003, Бюл. №3, 2003 р.

(72) Курдиш Іван Кирилович, Рой Алла Олександрівна

(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ  
Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАН УКРАЇНИ(57) Штам бактерій *Bacillus subtilis* IMB В-7023 для  
одержання бактеріального добрива під овочеві  
культури

Винахід відноситься до мікробіологічних засобів підвищення врожайності рослин за рахунок поліпшення фосфорного живлення й захисту від дії фітопатогенів і стосується виділення нового штаму бацил, призначеного для виготовлення бактеріального препарату.

Метою винаходу є одержання нового штаму, що характеризується високою активністю мобілізації фосфору з важкорозчинних неорганічних і органічних сполук фосфору (трикальційфосфат, гліцерофосфат, фітин і ін.), та виявляє антагоністичну активність до фітопатогенних грибів і бактерій, що викликають хвороби овочевих і злакових рослин.

Штам бактерій *Bacillus subtilis* 5-RK виділений з чорноземного ґрунту Черкаської області і селекціонований у відділі мікробіологічних процесів на твердих поверхнях Інституту мікробіології й вірусології ім. Д.К. Заболотного (ІМВ) НАН України.

Штам, депонований у Депозитарії мікроорганізмів ІМВ НАН України 26 лютого 2001 р. і йому привласнено колекційний номер *Bacillus subtilis* 1MB В-7023. Основною особливістю штаму є його здатність до мобілізації фосфору з важкорозчинних неорганічних та органічних сполук у найбільш відповідальний період розвитку рослин. У 1 мл мінерального середовища з трикальційфосфатом протягом 3-х діб культивування штам накопичує  $1,8 \cdot 10^8$  клітин та 150 мг/л  $\text{PO}_4^{3-}$ , у середовищі з гліцерофосфатом в аналогічних умовах вирощування титр життєздатних клітин складає  $3,8 \cdot 10^8$  клітин у 1 мл, а концентрація  $\text{PO}_4^{3-}$  до 300 мг/л.

Відомий штам *Bacillus megaterium* за 25 діб культивування накопичував з фосфатів заліза 44,6 мг/100 мл  $\text{P}_2\text{O}_5$  (А с СССР №1645266, 1988 Суховицкая), (тобто не менше за 25 діб культивування).

Штам *Bacillus subtilis* 5-RK характеризується високою антагоністичною активністю проти фітопатогенних грибів і бактерій, що вражають овочеві й злакові культури рослин (табл. 4-5). Описані раніше штами *Bacillus subtilis* мають антагоністичну активність, але при цьому не має відомостей щодо їх здатності мобілізувати фосфати (А с №2099947, 1996 Смирнов, Сорокулова).

Штам *Bacillus subtilis* 5-RK для одержання препарату, що поліпшує фосфорне живлення рослин за рахунок його мобілізації із важкорозчинних неорганічних (трикальційфосфат) і органічних сполук (гліцерофосфат, фітин), що захищає рослини від фітопатогенів і підвищує врожайність овочевих культур.

Винахід відноситься до ґрунтової мікробіології, зокрема, до одержання бактеріального препарату, що поліпшує фосфорне харчування рослин, за рахунок мобілізації важкорозчинних у ґрунті неорганічних і органічних сполук фосфору та захищає рослини від фітопатогенів, сприяє підвищенню врожаю овочевих і зернобобових культур і являє собою новий штам для одержання бактеріального препарату.

Штам, виділений з чорноземного ґрунту на мінеральному середовищі Менкіної з глюкозою й гліцерофосфатом кальцію (ідентифікований відповідно до визначника Бергі, посібника Смирнова із співавт., йому привласнений №5-RK).

(13) A

(11) 54923

(19) UA

Штам, депонований в Українській колекції мікроорганізмів 1МВ НАН України, колекційний номер 1МВ-В-7023

Штам *Bacillus subtilis* 5-RK має наступні властивості: Морфологічні і культуральні ознаки: грам-позитивні палички з круглими кінцями, рухливі, розміром 0,8х2,9мкм. Спори овальні, розташовані субтермінально. Факультативний анаероб. Колонії на картопляному агарі округлої форми, сірувато-білого кольору, плоскі, матові, R-типу. Край колонії не рівний. Діаметр колонії 48-годинної культури складає 3-12мм. На МПБ утворює плівку, росте на МПБ з 5 і 7% NaCl. Може рости при температурі 28°C, 37°C і 45°C. Оптимальна температура росту 28-0,5°C, pH=6,0-7,0.

Росте на суспензії pH=5,5. Дає позитивну реакцію на наявність каталази, уреазу, лецитинази. Виділяє в середовище аміак, не виділяє сірководень і індоп. Гідролізує крохмаль, желатину. Відновлює метиленовий синій, нітрати й нітрити. Дає позитивну реакцію Фогеса-Проскауера. Здатний до утворення ацетилметилкарбінолу на середовищі Кларка. Ферментує без утворення газу глюкозу, сахарозу, галактозу, сорбіт і гліцерин. Слабкіше ферментує манніт і мальтозу. Не ферментує лактозу, ксилозу, арабінозу, дульцит. Ознаки штаму стійкі. Штам непатогенний для теплокровних тварин.

Умови зберігання. Штам зберігається й підтримується методом періодичних пересівів (не рідше 2 разів у півроку) на агаризованому середовищі Менкінго з гліцерофосфатом кальцію наступ-

ного складу (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,3, NaCl - 0,3, KCl - 0,3,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,001,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,001,  $\text{CaCO}_3$  - 5,0, глюкоза - 10,0, гліцерофосфат - 1,0 у перерахуванні на  $\text{PO}_4^{3-}$ , pH=6,91-7,1, агар-агар - 15,0. Перед стерилізацією середовище розливають по 100мл у колби Ерленмейєра об'ємом 0,75л. Режим стерилізації: 20 хв, при 0,5 атм.

Здатність штаму мобілізувати фосфор із його органічних і неорганічних сполук підтверджується прикладом 1.

Приклад 1. Готують посівний матеріал, вирощуючи бактерії на агаризованому середовищі Менкінго з гліцерофосфатом протягом 24 год. Потім 1мл суспензії бацил, приготовленої за стандартом мутності 5 одиниць, засівають колби з рідким середовищем Менкінго, склад якого приведений вище. Бактерії *Bacillus subtilis* 5-RK вирощують в умовах періодичного культивування (240 об/хв) протягом 3-х діб при 28°C. Після вирощування в культуральній рідині визначають чисельність бактерій (табл. 1-2). У фугаті культуральної рідини - концентрацію  $\text{PO}_4^{3-}$  визначають колориметрично з використанням молібденово-кислого амонію та аскорбінової кислоти в якості відновлювача (табл. 1-2). Вміст фосфат-іонів, що накопичуються штамом бактерій обчислюють по різниці його концентрації у експериментальному й контрольному (стерильному) варіантах.

Таблиця 1

Ростова активність *Bacillus subtilis* 5-RK і накопичення  $\text{PO}_4^{3-}$  в культуральному середовищі з гліцерофосфатом

Штам	Кількість життєздатних клітин в 1мл середовища		Накопичення $\text{PO}_4^{3-}$ (мг/л) в культуральному середовищі, що містить гліцерофосфат	pH	
	початкова	кінцева		почат	кінець
<i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(2,9 \pm 0,3) \cdot 10^8$	280,0	7,0	5,6
	$(4,1 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(3,8 \pm 0,2) \cdot 10^8$	300,0	7,0	5,5

Примітка: час культивування 3 доби

Таблиця 2

Ростова активність *Bacillus subtilis* 5-RK і накопичення  $\text{PO}_4^{3-}$  в культуральному середовищі з фітином

Штам	Кількість життєздатних клітин в 1мл середовища		Накопичення $\text{PO}_4^{3-}$ в культуральному середовищі, що містить фітин (мг/л)	pH	
	початкова	кінцева		почат	кінець
<i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	$(2,7 \pm 0,5) \cdot 10^5$	$(8,9 \pm 0,7) \cdot 10^7$	46,0	7,0	6,2
	$(3,0 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(9,1 \pm 0,5) \cdot 10^7$	61,0	7,0	6,1

Примітка: час культивування 3 доби

Дані таблиці 1-2 вказують на високу активність мобілізації  $\text{PO}_4^{3-}$  запропонованим штамом з органічних фосфоровмісних сполук, що є властиві для чорноземних ґрунтів.

Порівняльні активності мінералізації фосфатів різних представників роду *Bacillus* (табл. 3) показу-

ли, що найбільш високою активністю характеризувався штам *Bacillus subtilis* 5-RK. Цей штам за ознаками мобілізації фосфату з органічних сполук гліцерофосфату й фітину перевершує інші відомі мікроорганізми.

Таблиця 3

Накопичення  $\text{PO}_4^{3-}$  різними штамами бацил в культуральній рідині в середовищі з гліцерофосфатом

Мікроорганізми	Накопичення $\text{PO}_4^{3-}$ в культуральному середовищі за 3 доби (мг/л)	pH	
		почат	кінець
<i>B. megaterium</i> 9	204,0	6,8	6,3
<i>B. subtilis</i> 15	219,0	7,0	6,3
<i>B. cereus</i> var <i>myc</i> 6	120,0	6,9	6,0
<i>B. pumilus</i> 3	194,0	7,1	6,3
<i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	280,0	7,0	5,6

Ефективність мобілізації фосфату з важкорозчинних неорганічних сполук підтверджується прикладом 2

Приклад 2 Готують середовище Муромцева наступного складу (г/л)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,5,  $\text{MgSO}_4$  - 0,2,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  - 0,2,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  - 2,0, глюкоза - 10,0, pH=6,5-7,0, дріжджовий екстракт - 2мл

Середовище розливають по 100мл у колби Ерленмейєра, об'ємом 0,75л та стерилізують протягом 20 хв при 0,5 атм. Посівний матеріал готують на агаризованому середовищі Муромцева з  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  протягом 24 год 1мл водної суспензії

бацил, приготовленої за стандартом мутності 5 одиниць, вносять в 100мл стерильного середовища Муромцева в колби Ерленмейєра. Бактерії *Bacillus subtilis* 5-RK вирощують при перемішуванні (240 об/хв) протягом 3 діб при 28°C. Вміст  $\text{PO}_4^{3-}$  у фугаті культуральної рідини визначають як показано вище. Результати досліджень наведені у табл 4. Приведені результати свідчать, що запропонований штам бацил активно мобілізує фосфати з неорганічної важкорозчинної сполуки трикальційфосфату, властивого різним типам ґрунтів

Таблиця 4

Ростова активність *Bacillus subtilis* 5-RK і накопичення  $\text{PO}_4^{3-}$  у культуральному середовищі з трикальційфосфатом

Штам	Кількість життєздатних клітин в 1мл середовища		Накопичення $\text{PO}_4^{3-}$ (мг/л) у культуральному середовищі	pH	
	початкова	кінцева		почат	кінець
<i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(1,8 \pm 0,03) \cdot 10^8$	118,0	6,4	5,2
	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(2,1 \pm 0,1) \cdot 10^8$	150,0	6,4	5,1

Примітка, час культивування 3 доби

Перспективність використання штаму *Bacillus subtilis* 5-RK для пригнічення фітопатогенних грибів і бактерій підтверджується прикладом 3

Приклад 3 Бактерії вирощували у середовищі Менкінго з гліцерофосфатом або фтіном, або на середовищі Муромцева з трикальційфосфатом протягом 3-х діб. Отриману культуральну рідину висівали петлею у центрі чашки Петрі з агаризованим середовищем Гаузе-2 (для вивчення активності у відношенні до бактеріальних тест-культур) і на картопляний агар (для дослідження антагоністичної активності у відношенні тест-культур фітопатогенних грибів). Посіви інкубували при 28°C протягом 48-72 годин

Потім до культури, що виросла штрихом підсилювали тест-мікроорганізми, якими були фітопатогенні гриби і фітопатогенні бактерії (з суспензії добових культур фітопатогенних бактерій і суспензії грибних спор у фізіологічному розчині, що мстила  $5 \times 10^3$  кл/мл). Чашки з тест-культурами бактерій інкубували у термостаті при 37°C протягом 24 год, з тест-культурами грибів - при 28°C протягом 5-7 діб. Про ефективність пригнічення фітопатогенів бактеріями *Bacillus subtilis* 5-RK судили за розміром зон інгібування росту тест-культур. Контролем росту тест-культур було паралельне вирощування їх на чашках з агаризованим середовищем Гаузе-2 та картопляним агаром без

*Bacillus subtilis* 5-RK. Отримані результати, що представлені у табл 5-6, свідчать про високу антагоністичну активність *Bacillus subtilis* 5 по відношенню до фітопатогенних бактерій і грибів

Таблиця 5

Антагоністична активність *Bacillus subtilis* 5-RK по відношенню до фітопатогенних бактерій

Тест-культури	Зони пригнічення тест-культур, мм
<i>Pseudomonas syringae</i>	19,0±2,1
<i>P. fluorescens</i>	16,0±0,2
<i>Erwinia carotovora</i> subs <i>Carotovora</i>	16,0±0,8
<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i>	31,6±2,1
<i>Clavibacter michiganense</i>	24,6±3,0

Таблиця 6

Антагоністична активність *Bacillus subtilis* 5-RK по відношенню до фітопатогенних грибів

Тест-культури	Зони пригнічення тест-культур, мм
<i>Fusarium graminearum</i>	22,8±0,5
<i>F. oxysporum</i>	9,2±1,0
<i>F. solani</i>	18,6±0,9

продовж таб 6

Тест-культури	Зони пригнічення тест-культур, мм
<i>F. sambicinum</i>	15,4±1,1
<i>F. culmorum</i>	13,8±1,2
<i>Biopolans sorokiniana</i>	26,5±1,5
<i>Alternaria alternata</i>	17,5±1,4
<i>Gliocladium roseum</i>	9,8±0,5

Запропонований штам *Bacillus subtilis* 5-RK характеризується помітним стимулюючим впливом на енергію проростання та схожість ряду овочевих і злакових культур, що підтверджується прикладом 4

Приклад 4 Вплив *Bacillus subtilis* 5-RK на енергію проростання і схожість насіння різних культур

оцінювали згідно ГОСТ 12038-84. Для цього отримували суспензію цих бактерій в рідких поживних середовищах в умовах, що описані у прикладах 1-2. Насіння опрків, томатів, буряка, пшениці, капусти обробляли суспензією клітин *Bacillus subtilis* 5-RK (3-х добова культуральна рідина з клітинами бацил після їх вирощування у рідких середовищах Менкінго й Муромцева) протягом 1 год, потім насіння розкладали на фільтрувальний папір у кювети або чашки Петрі. Папір зволожували стерильною водопровідною водою. Інкубування насіння проводили у темряві при 25-30°C згідно ГОСТ 12038-84. Контролем служило насіння, оброблене стерильною водопровідною водою. Результати досліджень приведені у табл 7

Таблиця 7

Енергія проростання і схожість насіння рослин після їх бактеризації *Bacillus subtilis* 5-RK

Варіанти	Енергія проростання	Схожість насіння
	% від контролю	% від контролю
<b>Буряк сорту Ялтушківський</b>		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	132,2	144,1
<b>Томати сорту Світанок</b>		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	129,0	127,6
<b>Томати сорту Перемога</b>		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	172,4	162,5
<b>Опрки сорту Нижинські</b>		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	117,6	124,1
<b>Капуста сорту Бордо</b>		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	125,5	134,5
<b>Квасоля сорту Мавка</b>		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	111,4	106,5
<b>Озима пшениця сорту Веселка</b>		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	108,7	115,0
<b>Озима пшениця сорту Гостанум</b>		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	119,0	138,1
<b>Насіння гарбуза сорту Стофунтова</b>		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	115,3	115,3
<b>Насіння трави сорту Ліліпут</b>		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	113,0	118,0

Дані табл 7 показують, що культуральна рідина запропонованого штаму бацил значно підвищує

енергію проростання й схожість насіння