



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **49158** (13) **U**
(51) **МПК (2009)**
C12N 1/20
C05F 11/08 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ШТАМ *BACILLUS SP.* 01-1 ДЛЯ ЗАХИСТУ РОСЛИН ВІД ПАТОГЕННИХ МІКРОМІЦЕТІВ ТА ПІДВИЩЕННЯ ВРОЖАЙНОСТІ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР, ВИРОЩУВАНИХ В УМОВАХ СХІДНОГО ТА ПІВДЕННОГО СТЕПУ УКРАЇНИ

1

2

(21) u200909345

(22) 11.09.2009

(24) 26.04.2010

(46) 26.04.2010, Бюл.№ 8, 2010 р.

(72) ПАРХОМЕНКО ТЕТЯНА ЮРІЇВНА, МЕЛЬНИЧУК ТЕТЯНА МИКОЛАЇВНА, ТАТАРИН ЛЮДМИЛА МИКОЛАЇВНА, АЛЕКСЕЄНКО НАДІЯ ВОЛОДИМИРІВНА

(73) ПІВДЕННА ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ ІНСТИТУТУ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК

(57) Штам *Bacillus sp.* 01-1 для захисту рослин від патогенних мікроміцетів та підвищення врожайності сільськогосподарських культур, вирощуваних в умовах східного та південного Степу України, № *Bacillus sp.* IMB B - 7210 у колекції Інституту мікробіології і вірусології НАНУ та № *Bacillus sp.* B-165 у колекції Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН.

Корисна модель стосується сільськогосподарської мікробіології, зокрема бактерій роду *Bacillus*, які використовують для біологічного захисту рослин від фітопатогенних мікроміцетів і для підвищення врожайності сільськогосподарських культур.

Як найближчий аналог обрано референтний штам *Bacillus subtilis* D-26 - основа препарату фітоспорин. Штам ідентифіковано в Інституті мікробіології і вірусології УААН ім. Д.К. Заболотного і депонований в Державній науковій установі Всеросійський науково-дослідний Інститут сільськогосподарської мікробіології РАСГН під номером 158.

Штам *Bacillus subtilis* D-26 - грампозитивні аеробні спороутворюючі палички. На м'ясопептонному агарі (МПА), сусло-агарі і картопляному агарі росте добре. На МПА утворює складчасті колонії в'язкої консистенції, бежевого кольору, край колонії неправильної форми. На м'ясопептонному бульйоні культура росте у вигляді білуватої плівки й придонного осаду, викликаючи незначне помутніння середовища. Оптимально температура для розвитку мікроорганізму - 37,0±1°C.

При спороутворенні клітин не роздувається. Спори схожі на еліпс, розмір спор 0,9×0,5мкм, у клітині розволені центральні.

Bacillus subtilis D-26 продукує протеазу, желатиназу, амілазу, каталазу, ліпазу; засвоює глюкозу, арабінозу, ксилулу, мальтозу, рибозу з утворен-

ням кислоти, не засвоює дульцит, рамнозу, лактозу, галактозу; дає позитивну реакцію Фогес-Проскрауера, гідролізує цитрат, не використовує пропіонат. Штам не росте в анаеробних умовах, не має лецитіназної активності, утворює аміак, індол, сірководень не утворює.

Згідно класифікації Головного санітарно-епідеміологічного управління Міністерства охорони здоров'я Російської Федерації бактерія *Bacillus subtilis* D-26 віднесена до 4 класу - до мікроорганізмів, які практично не мають алергенної і загально токсичної активності.

Показано, що штам є ендofітом сільськогосподарських рослин.

Штам виявляє антагоністичну активність до широкого спектру фітопатогенних грибів і бактерій.

На основі штаму *Bacillus subtilis* D-26 розроблені рідка та суха форми препарату фітоспорин. Препарат отримав державну реєстрацію Російської Федерації за №-05-772-012601270128-0.

Препарат фітоспорин застосовувався з високою ефективністю, в основному, на пшениці.

З метою розширення використання біологічного контролю хвороб сільськогосподарських рослин продовжується пошук нових більш конкурентоздатних і ефективних штамів, більш активних антагоністів і стимуляторів росту і розвитку рослин та розробка препаратів на їх основі.

Розширення колекції штамів для біоконтролю

(13) **U**

(11) **49158**

(19) **UA**

фітопатогенів та вивчення особливостей і закономірностей взаємодії їх з рослинами дозволить вирішувати проблеми розробки і ефективного використання нових екологічно безпечних методів захисту рослин. Необхідно зазначити, що різноманітні ґрунтово-кліматичні умови вирощування сільськогосподарських культур вимагають пошуку ефективних штамів саме для специфічних умов різних регіонів України.

Технічним результатом корисної моделі є підвищення ефективності захисту рослин від фітопатогенних мікроміцетів і підвищення урожайності сільськогосподарських культур, вирощуваних в умовах східного і південного Степу України.

В основу корисної моделі поставлена задача одержання ефективного штаму роду *Bacillus* для захисту рослин від патогенних мікроміцетів та підвищення врожайності сільськогосподарських культур, вирощуваних в умовах східного та південного Степу України, що є енергозберігаючим засобом і зумовлює відмову або зниження доз хімічних засобів захисту рослин, а також покращення фітосанітарного стану ґрунту та зниження антропогенного навантаження на довкілля.

Поставлена задача вирішена шляхом виділення у 2001 році на середовищі сусло-агар мікробіологічним методом з епіфітної мікрофлори насіння помідорів сорту Шанс штаму *Bacillus* sp. 01-1, який проявляє антагоністичну активність до фітопатогенних мікроміцетів та позитивно впливає на розвиток рослин, вирощуваних в умовах східно-

го та південного Степу України.

Виділений мікробіологічним методом штаму *Bacillus* sp. 01-1 має такі морфологічні, фізіологічні та біохімічні властивості, які переважно співпадають з властивостями штаму *Bacillus subtilis* D-26. Колонії штаму 01-1 на МПА: форма - округла, профіль - бугристий, край - велико-зубчатий, поверхня - складчаста, розмір - середній (діаметр від 2 до 4мм), оптичні властивості - не прозора, матова, колір - світло-коричневий, структура - зверху утворюється плівка, легко знімається з агару.

Мікроскопіювання культур на фазово-контрастному мікроскопі (збільшення у 600 разів) 3-добової культури мікроорганізмів показало, що багато вільних спор, клітини одиничні, іноді спарені. Спори утворюються з одного з кінців палички, займають приблизно $\frac{1}{4}$ довжини клітини. При мікроскопіюванні на 5 добу розвитку штаму в полі зору мікроскопу знаходиться багато вільних спор і лише 1-2 клітини. Ріст бактерій при посіві штрихом на МПА добре, колір штриху світло-бежевий.

В лабораторних дослідках визначено, що штаму *Bacillus* sp. 01-1 не поступається антагоністичною активністю та спектром дії на фітопатогенні гриби штаму *Bacillus subtilis* D-26. Так, встановлено, що штаму *Bacillus* sp. 01-1 пригнічує розвиток *Xanthomonas campestris* B-1060, *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* F-55800, *F. oxysporum* 2246, 2271, *F. solani*, 73, *F. avenaceum* (штами фітопатогенів отримані з Інституту мікробіології і вірусології НАНУ) (табл. 1, 2).

Таблиця 1

Вплив нового штаму *Bacillus* sp. 01-1 на розвиток фітопатогенів
(лабораторний дослід, середовище м'ясо-пептонний агар)

Досліджувані штами		Зона пригнічення росту мікроорганізмів, що тестуються, мм			
		<i>Xanthomonas campestris</i> B-1060	<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>orthoceras</i> F-55800	<i>F. solani</i> , 73	<i>F. avenaceum</i>
<i>Bacillus subtilis</i> D-26	3 доба	20,0	5,5	3,5	11,0
	5 доба	19,0	5,0	6,5	10,0
<i>Bacillus</i> sp. 01-1	3 доба	16,0	6,5	7,0	11,0
	5 доба	21,0	6,0	7,5	9,5

Таблиця 2

Вплив штаму *Bacillus* sp. 01-1 на ріст мікроміцетів виду *Fusarium oxysporum*
(лабораторний дослід, 2001, середовище сусло-агар)

Досліджувані штами		Зона пригнічення росту мікроорганізмів, що тестуються, мм		
		<i>Fusarium oxysporum</i> , 2246	<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>orthoceras</i> F-55800	<i>Fusarium oxysporum</i> , 2277
<i>Bacillus subtilis</i> D-26		14,0	6,5	16,0
<i>Bacillus</i> sp. 01-1		16,0	7,0	13,5

В польовому досліді з кукурудзою гібриду сорту Луганський 287МВ показано зниження поширення пухирчастої сажки під впливом біопрепарату та досліджуваних штамів (табл. 3). Поширення хвороби у контрольному варіанті

складало 3,3%, при використанні біополіциду - 2,2%, при використанні штаму *Bacillus subtilis* D-26 - 1,1%. Не зареєстровано хвороби у варіанті з використанням штаму *Bacillus* sp. 01-1.

Таблиця 3

Поширення пухирчастої сажки кукурудзи гібриду Луганський 287 МВ у фазі повної стиглості (польовий дослід, 2005 рік, чорнозем звичайний, Луганський Інститут селекції і технологій)

Варіант	Поширення хвороби, %			
	I	II	III	середнє
Контроль	3,3	3,3	3,3	3,3
Біополіцид	0	6,6	0	2,2
Bacillus sp. 01-1	0	0	0	0
Bacillus subtilis D-26	0	3,3	0	1,1
HIP ₀₅	-	-	-	2,50

Зазначена вище сукупність суттєвих ознак штаму *Bacillus* sp. 01-1 підтверджує можливість одержання очікуваного результату.

Характеристика штаму бактерій *Bacillus* sp. 01-1. Номенклатурні дані: рід - *Bacillus*; вид - не визначений, депонований у колекції Інституту мікробіології і вірусології НАНУ під номером *Bacillus* sp. IMB B - 7210, у колекції ІСГМ УААН під № *Bacillus* sp. B-165.

Походження штаму. Штам *Bacillus* sp. 01-1 було отримано у Південному філіалі Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН з епіфітної мікрофлори насіння помідорів сорту Шанс, насіння було відібрано з плодів помідорів контрольного варіанта польового дослідження у Кримській дослідній станції овочівництва і баштанництва Інституту південного овочівництва і баштанництва УААН у 2001 році.

Спосіб виділення. Штам виділений методом посіву граничних розведень з епіфітної мікрофлори насіння помідорів Пархоменко Т.Ю. Штам ідентифікований Пархоменко Т.Ю., Мельничук Т.М., Татарин Л.М., Алексєєнко Н.В. по методичних рекомендаціях з первинної ідентифікації перспективних спорів штаму мікроорганізмів-антагоністів Інституту мікробіології та вірусології НАНУ [Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных. / Смирнов В.В., Резник С.Р., Сороулова И.Б., 1983] та визначником Берджи [Определитель бактерий Берджи. В 2-х томах. Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хорста, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. - М.: Мир, 1997] і, згідно сучасній систематичі, визначений як вид *Bacillus* sp., порівняний із типовим штамом бактерій *Bacillus subtilis* D-26, який депоновано у колекції в Державній науковій установі Всеросійський науково-дослідний Інститут сільськогосподарської мікробіології РАСГН під номером 158.

Біотехнологічна характеристика. Штам *Bacillus* sp. 01-1 знижує ураження кореневими гнилями пшениці, кукурудзи, помідорів, сприяє зниженню ураження рослин кукурудзи пухирчастою сажкою, пригнічує розвиток мікроміцетів на насінні пшениці, нуту і помідорів, що сприяє оздоровленню насіннєвого матеріалу, підвищенню якості насіння, кращому розвитку рослин і підвищенню урожайності рослин.

Культурально-морфологічні ознаки. Колонії штаму 01-1 на МПА: форма - округла, профіль -

бугристий, край - велико-зубчатий, поверхня складчаста, розмір - середній (діаметр колонії від 2 до 4 мм), оптичні властивості - не прозора, мата, колір - світло-коричневий, структура колонії - зверху утворюється плівка, легко знімається з агару.

Фізіолого-біохімічні властивості. Мікроскопіювання культур на фазово-контрастному мікроскопі (збільшення у 600 разів) 3-добової культури мікроорганізмів показало, що багато вільних спор, клітини одиничні, іноді спарені. Спори утворюються з одного з кінців палички, займають приблизно ¼ довжини клітини. При мікроскопіюванні на 5 добу розвитку штаму в полі зору мікроскопу знаходиться багато вільних спор і лише 1-2 клітини. Ріст бактерій при посіві штрихом на МПА добрий, колір штриху світло-бежевий. Штам 01-1 засвоює глюкозу, сахарозу, манніт, слабо засвоює крохмаль, етанол, рафінозу, не засвоює цитрати. При культивуванні на МПБ утворює плівку на поверхні середовища, може утворюватись невеликий осад, утворює аміак, не утворює індол. Росте при 37°C. Тип засвоєння глюкози за бродильно-окисним тестом Хью-Лейфсона - бродильного типу. Продукує каталазу. На лакмусовому молоці зміщує рН в кислоту сторону - лакмусове молоко червоніє. Штам здатен гідролізувати казеїн - на молочному агарі під його дією виникала прозора зона гідролізу і складала 6 мм. Позитивно фарбується по Граму.

Ознаки штаму стійкі. Культура *Bacillus* sp. 01-1, згідно висновку, який видано для депонування культури Інститутом мікробіології і вірусології НАНУ, належить до авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи досліджених теплокровних тварин. Згідно даних щодо відсутності вірулентності штам є непатогенним і по ступені небезпеки мікроорганізмів відноситься до 4-го класу малонебезпечних, практично без алергенної та загально токсичної дії мікроорганізмів.

Культуру зберігають на гороховому агарі з сахарозою при температурі 4-5°C. Пересівають один раз у 3 місяці.

Штам використовують для передпосівної інокуляції насіння сільськогосподарських культур у вигляді водної суспензії, яку отримують шляхом змиву біомаси штаму з агарового поживного середовища 5-10 мл води.

Передпосівна обробка насіння помідорів сорту Шанс штамом *Bacillus* sp. 01-1 сприяє підвищенню біомаси проростків, не знижуючи при

цьому енергію проростання та схожість насіння (табл. 4).

Таблиця 4

Вплив обробки штамами *Bacillus subtilis* D-26 і *Bacillus* sp. 01-1 на посівні властивості насіння помідорів сорту Шанс (лабораторний дослід)

Варіант досліджу	Енергія проростання, %		Біомаса проростка		Схожість, %	
	середня	до контролю	середня, мг	% до контролю	середня	до контролю
Контроль сухий	92,5	100	12,54	100	98,3	100
Контроль (вода)	90,00	97	12,06	96	98,5	100
<i>Bacillus subtilis</i> D-26	89,00	96	11,26	90	97,3	99
<i>Bacillus</i> sp. 01-1	88,50	96	14,19	113	97,0	99
НСР ₀₅	5,98	6,64	1,23	9,54	2,56	2,62

Передпосівна інокуляція штамом *Bacillus* sp. 01-1 насіння кукурудзи гібриду Луганський 287 МВ сприяє розвитку рослин. Так, у вегетаційному досліді під впливом штаму *Bacillus* sp. 01-1 істотно зростає висота рослин - на 5,3см; сира маса -

на 29%; суха маса надземної частини - на 19% та суха маса кореневої системи - на 35% в порівнянні до контролю і перевищує показники штаму *B. subtilis* D-26 (табл. 5).

Таблиця 5

Вплив передпосівної інокуляції штамами мікроорганізмів-антагоністів на розвиток рослин кукурудзи гібриду Луганський 287 МВ (вегетаційний дослід, вермікуліт, повне поживне середовище Прянішнікова, теплиця, 2005 р., ПДС ІСГМ УААН)

Варіант досліджу	Висота рослин, см	Маса надземної частини, г		Суха маса кореневої системи, г
		Сира	Суха	
Контроль (вода)	28,30	1,28	0,14	0,15
<i>B. subtilis</i> D-26	32,01	1,57	0,17	0,19
<i>Bacillus</i> sp. 01-1	33,59	1,63	0,17	0,20
НСР ₀₅	3,38	0,30	0,03	0,03

Можливе використання штаму для завчасної обробки насіння сільськогосподарських культур з метою зменшення чисельності мікроміцетів в епіфітній мікрофлорі насіння, яка є основним резервуаром мікроорганізмів для формування як епіфітної мікрофлори проростку, так і ризосфери. Отже, зменшення чисельності мікроміцетів в епіфітній мікрофлорі є шляхом до збереження якості насіння та його оздоровлення.

Встановлено пригнічення розвитку мікроміцетів на поверхні насіння нуту сорту Александрит шляхом його обробки штамом *Bacillus* sp. 01-1 в

порівнянні з хімічним фунгіцидом Вітаваксом-200 ФФ і референтним штамом. Зміни чисельності мікроміцетів та бактерій на насінні перевіряли через добу, місяць та півроку збереження інокульованого насіння (табл. 6). У варіанті з *Bacillus* sp. 01-1 виявлено найбільш активний антагонізм до мікроміцетів. За 6 місяців їх чисельність зменшилась в порівнянні з контролем на 92,5%. Обробка насіння Вітаваксом-200 ФФ знижувала кількість мікроміцетів в порівнянні з контролем на 73,6%.

Таблиця 6

Вплив мікроорганізмів-антагоністів фітопатогенів на чисельність мікроміцетів в епіфітній мікрофлорі насіння нуту сорту Александрит при зберіганні, тис. КУО/г насіння

Варіант досліджу	1 доба	1 місяць	6 місяців
Контроль	6,0±0,51	6,6±0,47	5,3±0,27
Вітавакс-200 ФФ	2,2±0,70	2,3±0,52	1,4±0,22
<i>Bacillus subtilis</i> D-26	2,1±0,44	2,3±0,18	1,7±0,38
<i>Bacillus</i> sp. 01-1	0,5±0,10	0,8±0,10	0,4±0,35

