



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1717156 A1

(51)5 A 01 N 63/00, C 12 N 1/20

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГКНТ СССР

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4814336/13

(22) 22.02.90

(46) 07.03.92. Бюл. № 9

(71) Институт микробиологии и вирусологии  
им. Д.К.Заболотного и Таджикский сельско-  
хозяйственный институт

(72) В.В.Смирнов, М.Я.Менликиев, С.Р.Рез-  
ник, В.А.Вьюницкая, Г.М.Ваньянц, М.Х.Сул-  
танова, А.Джумаев и Н.У.Шарипова

(53) 576.8(088.8)

(56) Патент США № 4663162, кл. А 01 N  
63/00, 1986.

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ *BACILLUS*  
*SUBTILIS* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА  
ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВА-  
НИЙ ХЛОПЧАТНИКА

(57) Использование: микробиологическая  
промышленность, получение средств защи-

2

ты растений, в частности хлопчатника, от  
возбудителей заболеваний. Штамм выра-  
щивают на сусло-агаре при pH 6,8-7,0 в те-  
чение 7-10 сут. при 28-32°C, смывают  
выросшие колонии физиологическим рас-  
твором и готовят суспензию с тиром (2-3) ×  
10<sup>11</sup> кл./мл. В суспензию вносят криопро-  
тектор (сахарозожелатиновую среду) и лио-  
филизируют. Для обработки семян  
хлопчатника лиофилизированную культуру  
разбавляют водой до содержания 5,0 × 10<sup>8</sup>  
- 1,0 × 10<sup>9</sup> кл./мл. Для обработки 1 т семян  
хлопчатника используют 500-700 л рабо-  
чей суспензии. Препарат на основе штам-  
ма позволяет защитить хлопчатник от  
возбудителей кормовой гнили на 93-94%,  
вертициллезного вилта на 85,2-86%. 7  
табл..

Изобретение относится к сельскому хо-  
зяйству, а именно к защите растений хлоп-  
чатника от поражения фитопатогенными  
грибами.

В качестве наиболее распространен-  
ного метода предупреждения грибных бо-  
лезней хлопчатника используется  
протравливание семян химическими препа-  
ратами (формалином, бромкислотой, бромкис-  
лотой с ксантаном, бромкислотой с ГМТД).  
Известен способ предпосевной обработки  
семян хлопчатника синтетическим препара-  
том с целью повышения семян.

Однако химические способы имеют ряд  
существенных недостатков: высокая токсич-  
ность для человека и животных, накаплива-  
ние в почве и растениях остаточных  
количеств ядовитых веществ, сложная тех-

нология протравливания, неэффективность  
против загнивания семян, гнили проростков  
и корневой гнили всходов, высокая сто-  
имость и др.

Известны биологические способы борь-  
бы с различными болезнями растений, в том  
числе вызываемыми грибами. Способ борь-  
бы с черной ножкой, корневой гнилью, шей-  
ковой гнилью основан на использовании  
препарата из *Irichoderma harzianum* T - 315  
(АТСС № 20671).

Однако они не эффективны для защиты  
растений хлопчатника от таких болезней,  
как вертициллезный вилт, фузариозное увя-  
дание и др.

Наиболее близким к изобретению явля-  
ется способ применения *Bacillus polymyxa*  
9A для защиты растений от вертициллезно-

(19) SU (11) 1717156 A1

го увядания. *B. polumyxa* 9A, выделенная из корней растений картофеля, росших на участках, сильно зараженных *Verticillium dahliae*, обладает способностью подавлять развитие вертициллезного увядания на таких культурах, как картофель и хлопчатник. *B. polumyxa* может быть использована в форме водных и неводных препаратов. Водные препараты содержат  $10^5 - 10^9$  кл/мл, а пасты  $10^9$  кл/мл. Неводные препараты включают дусты, смачивающие порошки, гранулы, эмульгokonцентраты. Рабочие составы могут применяться в виде растворов, гранул, дуста. Чаще всего составы используют для непосредственной обработки семян и семенного материала, хотя не исключается возможность обработки почвы вокруг посадочного материала.

Однако данный способ не включает предупреждение таких болезней хлопчатника, как черная корневая гниль и фузариозное увядание.

Целью изобретения является получение нового штамма бактерий, обладающего более широким спектром действия к возбудителям заболеваний хлопчатника.

Поставленная цель достигается использованием для предпосевного увлажнения семян хлопчатника суспензии полученной новой живой культуры *Bacillus subtilis* 26D с содержанием  $5 \cdot 10^8 - 1 \cdot 10^9$  кл/мл, применяемой в количестве 0,5-0,7 л на 1 кг семян при экспозиции 12-18 ч.

Штамм *B. subtilis* 26D получен из внутренних тканей стебля здорового растения хлопчатника в лабораторных условиях. После предварительной обработки и стерилизации поверхности стебля стерильным скальпелем снимали кору, и небольшие кусочки стебля помещали на поверхность питательного агара (картофельного агара) в чашку Петри. Чашки инкубировали при  $28^\circ\text{C}$  в течение 5-7 сут.

Штамм идентифицирован по определителю Берги (1984), на основании работ Gordon (1973), депонирован в коллекции Всесоюзного научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии под № 128.

Штамм *B. subtilis* 26D имеет следующие основные культурально-морфологические и биохимические признаки. Грамположительные подвижные аэробные спорообразующие палочки с закругленными концами, продуцирующие каталазу. Образуют эндоспоры, не раздувающие клетку. Размер клеток —  $1,9 \times 0,5$  мкм; в мазках 18 ч культуры клетки расположены одиночно, попарно, реже в цепочки. Споры в клетке расположены центрально, размер спор  $0,9 \times 0,5$  мкм.

При культивировании штамма на МПА в течение 24 ч при  $37^\circ\text{C}$  образуются складчатые колонии вязкой консистенции, телесного цвета, края колонии изрезаны. На среде Громыко (сусло-агар + МПА 1:1), pH 6,8-7,0 после 24 ч термостатирования при  $37^\circ\text{C}$  образует кремово-белые колонии, складчатые, с кратерообразным центром, консистенция вязкая, края колонии изрезанные. Культура ферментирует глюкозу, арабинозу, ксилозу, мальтозу, галактозу, лактозу, маннит, сахарозу с образованием кислоты без газа, не разлагает дульцит, рамнозу. Дает положительную реакцию Фогес-Проскауера, гидролизует крахмал, желатину, не гидролизует мочевины; утилизирует цитрат, не использует пропионат. Не растет в анаэробных условиях, не образует включения поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты на среде МПА с глюкозой; не образует индол и сероводород. Не обладает лецитиназой, коагулазой, гиалуронидазой. Патогенными свойствами (токсическими, токсигенными, вирулентными) при парентеральном и пероральном введении белым мышам не обладает.

Проверка безвредности осуществлялась следующим образом.

Лабораторным животным вводили фильтрат культуральной жидкости *B. subtilis* 26D, выращенной в течение 10 сут на мясо-пептонном бульоне при  $28^\circ\text{C}$ ; суспензии клеток *B. subtilis* 26D, выращенной на мясо-пептонном агаре при  $28^\circ\text{C}$  в течение 24 ч, суспензии инактивированных прогреванием клеток *B. subtilis* 26D, выращенной в течение 24 ч на МПА при  $28^\circ\text{C}$ .

Проверку патогенности осуществляли на белых мышах весом 18-20 г. Животным вводили суспензии и фильтраты в желудок через зонд и в инъекциях.

В табл. 1 представлены результаты исследования токсичности фильтрата культуры *B. subtilis* 26D после роста на МПБ (токсигенность культуры).

В табл. 2 приведены результаты введения животным МПБ (контроль)

В табл. 3 приведены результаты исследования вирулентности культуры *B. subtilis* 26D, выращенной на МПА при  $28^\circ\text{C}$  в течение 24 ч.

В табл. 4 приведены результаты исследования токсичности инактивированных клеток культуры *B. subtilis* 26D

Наблюдения за животными проводили на протяжении 15 дней после окончания курса инъекций или перорального введения. В период наблюдения все животные были активны, хорошо поедали пищевые рационы, физиологические отправления у них не

нарушались, поведенческие реакции были обычными, изменений со стороны шерстного покрова не отмечалось. Динамика изменения массы тела животных в опыте и контроле была сходной. Все подопытные и контрольные животные после окончания срока наблюдения были умерщвлены, вскрыты, их органы подвергнуты макроскопическому изучению.

Результаты вскрытия показали следующее.

Сердце обычной формы и величины, у подопытных животных такое же, как и у контрольных. Легкие по объему, строению долей у опытных и контрольных животных одинаковые; поверхности легких гладкие, доли легко отделяются друг от друга, спаяк не отмечено. Желудок, петли тонкого и толстого кишечника внешне обычные, признаков воспалительных изменений не отмечено. При вскрытии просвета виден неизмененный (такой же, как и у контрольных животных) рисунок слизистых. Печень темно-красного цвета, среднего кровенаполнения, не увеличена. Доли отделены друг от друга, поверхности гладкие. Почки по размерам и форме не отличаются у контрольных и опытных животных, поверхности гладкие, на разрезе виден четкий рисунок коркового и мозгового вещества. Селезенка не увеличена, обычной консистенции. На разрезе пульпа умеренно полнокровна, темно-красного цвета.

Введение суспензии живых, а также инактивированных клеток 24-часовой культуры *B. subtilis* 26D перорально в дозах 0,5-1,0 млрд. микробных клеток и интратрубно в дозах 0,5-1,0 млрд. микробных клеток на мышь не вызвало у животных каких-либо признаков заболевания. Изучение внутренних органов животных не выявило у них признаков патологического процесса и изменений, регистрируемых макроскопически.

Введение мышам фильтрата среды роста (после культивирования штамма *B. subtilis* 26D на мясо-пептонном бульоне) не выявило у животных патологического процесса, регистрируемого клинически или при макроскопическом изучении внутренних органов животных.

Таким образом, полученные данные дают основание отнести изученный штамм к 4-му классу по классификации, приведенной в Методических указаниях МЗ СССР, Главного санэпидуправления "Постановка исследований для обоснования предельно допустимых концентраций производственных штаммов и на их основе готовых форм препаратов...", т.е. к микроорганизмам,

практически не обладающим аллергенным и общетоксическим действием.

Культура *B. subtilis* 26D пересеивается на среде Громыко (сусло-агар + МПА 1:1) сусло-агаре, среде Гаузе № 2; pH 6,8-7,0. Растет при 10-50°C, температурный оптимум 37°C.

Хранится культура на среде Громыко, либо среде Гаузе № 2, либо картофельном агаре в течение 2-3 мес при комнатной температуре, а под слоем стерильного минерального масла на указанных выше средах — не менее 1-2 лет. В лиофильно-высушенном состоянии культура хранится до 3 лет и более. Для этого штамм *B. subtilis* 26D выращивают на среде Громыко или среде Гаузе № 2, или сусло-агаре в течение 5-7 сут при 28 или 37°C. С агаризованной среды биомасса снимается физиологическим раствором. В качестве защитной среды используется сахарозо-желатиновый наполнитель. Температура замораживания не выше -25°C, режим высушивания от -25°C до 32°C в течение 32 ч.

После хранения под минеральным маслом или в лиофилизированном состоянии культура образует однотипные колонии, на МПА — складчатые, вязкой консистенции, телесного цвета, края колонии изрезанные.

Антагонистические свойства. Антагонистическую активность *B. subtilis* 26D по отношению к фитопатогенным грибам определяли методом отсроченного антагонизма, а именно радиальных штрихов. Штамм-антагонист засеивали в центре чашки Петри на среде Гаузе № 2, инкубировали при 28°C в течение 72 ч, затем радиальными штрихами подсеивали тест-культуры, суспензии которых готовили в физиологическом растворе с содержанием 0,5 млрд спор в 1 мл. Учет результатов проводили по величине зоны задержки роста тест-штамма в миллиметрах.

В табл. 5 приведены данные по антагонистической активности *B. subtilis* 26D по отношению к некоторым фитопатогенным грибам.

Как видно из приведенных в табл. 5 данных, штамм *B. subtilis* 26D обладает выраженной антифунгальной активностью в отношении грибов — возбудителей корневых гнилей, фузариозного увядания, вертициллезного вилта.

Культуру *B. subtilis* 26D использовали для получения препарата.

Препарат на основе *B. subtilis* 26D представляет собой лиофилизированную взвесь культуры в физиологическом растворе NaCl с добавлением защитной среды. В

качестве защитной среды использовали 1% желатины и 1% сахарозы. Культуру *B. subtilis* 26D выращивали на среде сусло-агар (pH 6.8-7.0) в течение 7-10 сут при 28-32°C. С агаризованной среды биомассу смывали физиологическим раствором NaCl и готовили суспензию, содержащую  $2 \cdot 10^{11}$  клеток в 1 мл. Суспензию соединяли с наполнителем (сахарозо-желатиновой средой). Полученную взвесь разливали в емкости из нержавеющей стали по 300 мл и замораживали при (-25-30)°C в течение не менее 24 ч. Проводили лиофилизацию в камере в режиме от (-30) до 32°C в течение 32 ч. Высушенную биомассу помещали в полиэтиленовые пакеты и укупоривали горячим способом.

Для обработки семян хлопчатника бактериальную лиофилизированную культуру за 1-2 ч до начала обработки растворяли в небольшом количестве водопроводной воды с целью оживления бактериальных спор и клеток. Затем из маточного раствора готовили рабочую суспензию, доводя титр до  $5 \cdot 10^8 - 1 \cdot 10^9$  кл/мл. Для обработки 1 т семян необходимое приготовление 500-700 л рабочей суспензии. Обработку семян производили либо в имеющейся емкости, либо в специально приготовленной зацементированной яме. Обработку начинали за 12-18 ч до начала сева. В емкость засыпали до 1 т семян и поливали вручную из лейки. Необ-

ходимое количество рабочей суспензии использовали в 2-3 приема с интервалом в 4-6 ч, чтобы семена хорошо впитали раствор. Вслед за каждым увлажнением семян их тщательно перелопачивали и накрывали брезентом. Последнее увлажнение проводили перед посевом. Если посев задерживался, семена подсушивали, рассыпав их слоем в 5-10 см, а непосредственно перед внесением в грунт их увлажняли водой.

Результаты предпосевной обработки семян хлопчатника с целью предупреждения поражения растений грибными болезнями, повышения всхожести представлены в табл. 6.

Влияние *B. subtilis* 26D на прорастание семян и пораженность корневыми гнилями.

В табл. 7 приведены результаты предпосевной обработки семян хлопчатника с целью предупреждения поражения растений корневыми гнилями, вертициллезным вилтом, повышения урожайности.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о высокой эффективности предлагаемого способа для предпосевной обработки семян хлопчатника.

#### Формула изобретения

Штамм бактерий *Bacillus subtilis* ВНИИ-ИСХМ № 128 для получения препарата против возбудителей заболеваний хлопчатника.

Таблица 1

Количество мышей	Доза, мл	Способ введения	Курс введения	Заболело	Пало	Выжило
10	0,5	Внутрибрюшинно	1	0	0	10
10	1,0	То же	1	0	0	10
10	0,5	Перорально	5	0	0	10
10	1,0	То же	5	0	0	10

Таблица 2

Количество мышей	Доза, мл	Способ введения	Курс введения	Заболело	Пало	Выжило
10	1,0	Внутрибрюшинно	1	0	0	10
10	1,0	Перорально	5	0	0	10

Таблица 3

Количество мышей	Доза, млрд (количество микробных клеток)	Способ введения	Курс введения	Заболело	Пало	Выжило
10	0.5	Внутрибрюшинно	1	0	0	10
10	1.0	То же	1	0	0	10
10	0.5	Перорально	5	0	0	10
10	1.0	То же	5	0	0	10

Таблица 4

Количество мышей	Доза, млрд (количество микробных клеток)	Способ введения	Курс введения	Заболело	Пало	Выжило
10	0.5	Внутрибрюшинно	1	0	0	10
10	1.0	То же	1	0	0	10
10	0.5	Перорально	5	0	0	10
10	1.0	То же	5	0	0	10

Таблица 5

Штамм-антагонист	Зона задержки роста, мм тест-культуры			
	<i>Fusarium oxysporum</i> 9883	<i>Fusarium oxysporum</i> 6465	<i>Thielaviopsis basicola</i>	<i>Verticillium dahliae</i>
<i>B. subtilis</i> 26D	23±2,2	15±2,3	24±2,4	29±3,1

Примечание. 1 В качестве тест-культур использовали штаммы фитопатогенных грибов, изолированные из пораженных растений хлопчатника, выращенных в различных районах Таджикской ССР. Штамм *Fusarium oxysporum* 6365 получен из коллекции Института микробиологии и вирусологии АН УССР.

2. Время наблюдения зон лизиса фитопатогенных грибов 3-10 сут.

Таблица 6

Влияние *B. subtilis* 26D на прорастание семян и пораженность корневыми гнилями

Опыт, №	Общее количество всходов	Количество растений, пораженных корневыми гнилями, %
1	13	6,2
2	16,95	10,2
3	19,75	8,1
4	18,2	8,6
5	15,0	9,0
6	13,5	7,2
7	16,9	7,3
Контроль (формалин)	12,7	15,3

Таблица 7

Влияние *B. subtilis* 26D на пораженность растений хлопчатника корневыми гнилями, вертициллезным вилтом, повышение урожайности

Увлажнение семян суспензией <i>B.</i> <i>subtilis</i> 26D (1 млрд/мл)	Пораженность растений, %		Средняя урожай- ность, ц
	Корневые гнили	Вертициллезный вилт	
Пример 1 0,5 л на 1 кг	6,4	14,1	41,3
Пример 2 0,6 л на 1 кг	6,2	14,0	41,7
Пример 3 0,7 л на 1 кг	6,1	14,1	41,8
Пример 4 0,8 л на 1 кг	6,5	14,4	40,6
Пример 5 0,4 л на 1 кг	6,6	14,5	40,8
Пример 6 0,3 л на 1 кг	6,7	14,8	40,3
Пример 7 0,2 л на 1 кг	7,0	14,8	39,9
Пример 8 0,1 л на 1 кг	6,8	14,7	39,4

Редактор Н.Швыдка

Составитель В.Смирнов  
Техред М.Моргентал

Корректор Э.Лончакова

Заказ 829

Тираж

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР  
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101