



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4787528/13

(22) 30.01.90

(46) 23.01.92. Бюл. № 3

(71) Украинский научно-исследовательский институт садоводства Южного отделения ВАСХНИЛ

(72) А.М.Лапа, С.Р.Резник,

С.В.Лапа, В.А.Фарафонов

и И.Б.Сорокулова

(53) 576.8:632.951(088.8)

(56) Кудряшова А.А. Микробиологические основы сохранения плодов и овощей. 1986, с.167-176.

Справочник по хранению плодов, ягод и винограда.

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНИЛЕЙ ЯБЛОК И ВИНОГРАДА ПРИ ХРАНЕНИИ

Изобретение относится к микробиологической промышленности и сельскому хозяйству, в частности к получению средств защиты плодовой продукции от возбудителей гнилей яблок и винограда при хранении и касается нового штамма бактерий для получения вышеуказанного средства.

Известны способы защиты продукции при закладке ее на хранение предуборочной обработкой фунгицидами (каптан, фолнет) дезинфекцией плодохранилищ и тары парами формалина, серы, обработкой плодов антисептиками.

Однако использование этих препаратов перед уборкой плодов и закладкой на длительное хранение не гаран-

(57) Изобретение относится к микробиологической промышленности и сельскому хозяйству, в частности к получению средств защиты плодовой продукции от возбудителей гнилей яблок и винограда при хранении, и касается нового штамма бактерий для получения вышеуказанного средства. Целью изобретения является получение нового штамма бактерий, обладающего более широким спектром действия. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* выделен из почвы, депонирован в коллекции ВНИИСХМ код № 131. Штамм позволяет уменьшить скорость развития возбудителей гнилей во время хранения яблок и винограда в 3-4 раза и снизить поражение их на 23,6-66,6% по сравнению с контролем. 1 табл.

тирует получение биологически чистой продукции и приводит не только к загрязнению плодов остаточными количествами пестицидов, но и снижает пищевую ценность плодов, что неблагоприятно сказывается на здоровье людей.

Известен способ биологической борьбы с монилиозом плодов персика, вызываемый грибом *Monilia fructicola* в период хранения. Цель достигается путем погружения плодов персика в рабочий раствор или опрыскиванием плодов споровой суспензией *Bacillus subtilis* В-3 после товарной обработки.

Однако при этом применяется суспензия спор против возбудителя монилиоза плодов персика, вызываемым грибом

Monilia fructicola, и не применяется против возбудителей гнилей яблок и винограда при хранении.

Цель изобретения - получение нового штамма бактерий, обладающего более широким спектром действия по сравнению с известными и способного подавлять возбудителей гнилей плодовых культур.

Штамм *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 131 является антагонистом следующих видов фитопатогенных грибов, вызывающих гнили плодов яблок и винограда, а именно *Monilia fructigena*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Penicillium claviforme*. Штамм депонирован в коллекции культур ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии под номером 131 в качестве активного антагониста возбудителей гнилей яблок и винограда.

Штамм выделен из почвы Киевской области в 1976 г., идентифицирован по "Краткому определителю бактерий Берджи".

Морфолого-культуральные признаки *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 131 - культура спороносная, аэробная, грамм-положительная.

В мазках из колоний, выросших на ИПА, через 18 ч обнаруживаются прямые палочковидные клетки 1,9-2,1 x 0,3-0,4 мкм, расположенные одиночно, изредка цепочкой. Клетка при спорообразовании не раздувается, после роста на глюкозном агаре в протоплазме глобулы не обнаруживаются. На МПБ культура образует пленку.

Через 24 ч роста при $T = +37^{\circ}\text{C}$ на среде сусло-агар и Громько культура имеет вид плоских, складчатых кожистых колоний диаметром 4-5 мм с изрезанными краями серовато-телесного цвета, хорошо снимаемые петлей с поверхности агара.

Через 24 ч роста при $T = +37^{\circ}\text{C}$ на стрептомицетном агаре культура имеет вид мелких колоний диаметром 0,4-1,0 мм, светло-серого цвета с изрезанным краем, с центром внутри, слегка приподнимающимся над поверхностью агара, пастообразной консистенции, хорошо снимается с поверхности агара.

Через 24 ч роста при $T = +37$ на мясо-пептонном агаре культура имеет вид складчатых плоских колоний диаметром 0,2 - 0,5 мм от светло-серого до

бежевого цвета, с мелко изрезанными краями, пастообразной консистенции, хорошо снимается петлей с поверхности

Физиолого-биохимические свойства. Ферментирует глюкозу, арабинозу, маннит, ксилозу с образованием кислоты без газа. Дает положительную реакцию Фогес-Проскауэра, гидролизует крахмал, желатину. Не растет в анаэробных условиях, не обладает аргининдигидролазой, лецитиназой. Не образует газ из NO_3 в анаэробных условиях. Продуцирует индол без образования сероводорода.

Из органических источников азота штамм *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 131 может использовать следующие органические соединения: гидролизат казеина, дрожжевой автолизат, пептон, неорганические соединения нитраты (KNO_3 , NaNO_3), аммонийные соли $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$.

Минимальная температура роста штамма *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 131 -7°C , максимальная $+55^{\circ}\text{C}$, оптимальная 28 до 37°C .

Значение pH среды минимальное 5, максимальное 8, оптимальное 6-7.

Штамм не патогенен для растений и теплокровных животных.

Получение препарата против возбудителей гнилей яблок и винограда при хранении на основе штамма бактерий *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 131.

Основные этапы изготовления препарата следующие: подготовка штамма - засев на косячки с сусло-агаром, инкубирование при $T = 37^{\circ}\text{C}$ в течение 18-24 ч. Пересев на бактериологические матрасы. Инкубирование при $T = 37^{\circ}\text{C}$ в течение 7-10 сут для получения спор. Контроль спорообразования проводим микроскопически. С агаризованной среды культуру смывают физиологическим раствором, затем вносят в суспензию наполнитель - сахарозо-желатиновую среду (4 и 1% соответственно к общему объему). Таким образом полученную суспензию доводят до 10 млрд. спор в 1 мл (с помощью оптического стандарта мутности). Для длительного хранения препарата полученную смесь разливают в ампулы или лотки из нержавеющей стали и помещаем в морозильную камеру при T не выше -20°C на 48 ч. Затем проводят лиофилизацию в вакуум-

ных сушильных камерах в течение 36 ч. при температуре от -20 до +36°C. Контроль бактериальной чистоты препарата проводят методом посева на агаризованные питательные среды (МПА, Громыко, Гаузе № 2, Картофельный агар, стрептомицетный агар).

Антагонистическую активность полученного препарата на основе штамма *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 131 определяют методом радиальных штрихов (Егоров, 1969).

Антагонистическая активность опытных серий препарата на основе штамма *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 131 (после лиофильной сушки) показана в таблице.

Пример 1. Препарат для обработки плодов яблок и винограда получают наращиванием штамма *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 131 на твердой среде сусло-агар, при $T = +37^{\circ}\text{C}$ в течение 7-10 сут для получения спор.

Культуру смывают физиологическим раствором, затем вносят в суспензию наполнитель - сахароза-желатиновую среду (4 и 1% соответственно к общему объему). Готовят рабочую суспензию с концентрацией $5 \cdot 10^6$ и $1 \cdot 10^7$ спор/мл из расчета 1 л на 100 кг яблок.

Обработку препаратом проводят в условиях хранения ($T = +2-8^{\circ}\text{C}$, относительной влажности 85-95%), при естественном инфекционном фоне. Контролем служат плоды, которые обычно закладывают на хранение, обработанные перед уборкой фунгицидом поликарбацином 80% с.п. с нормой расхода 8 кг/га на 20 дн до уборки урожая.

При использовании суспензии штамма *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 131 с

титром от 5 до 10 млрд. спор достигается 100%-ная сохранность плодов яблок в течение 90 дн, в то время как в контроле уже на 7 сут наблюдаются развитие гнилей яблок.

Увеличение нагрузки спор более 10 млрд. не ведет к улучшению результатов.

Пример 2. В 1989 г в хранилище совхоза "Зеленый Гай" Николаевской области проведена обработка препаратом на основе штамма *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 131 с титром 10 млрд спор в 1 г сухого лиофильно высушенного препарата. Норма расхода 1 г препарата на 1 кг ягод винограда. Условия хранения: $T = +1-7^{\circ}\text{C}$, относительная влажность воздуха 85-90%. Контролем служат гроздья винограда, обработанные перед хранением медьсодержащими препаратами (купрозан 80% с.п. 4-6 кг/га).

Через 2 мес. после обработки установлено, что количество пораженных гроздей винограда возбудителями гнилей уменьшается на 55,4% по сравнению с контролем.

Таким образом, применение штамма *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 131 против возбудителей гнилей яблок и винограда позволяет уменьшить скорость развития гнилей во время хранения в 3-4 раза, а также снизить поражение возбудителями гнилей плодов яблок и винограда на 23,6-66,6%.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Штамм бактерий *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 131 для получения препарата против возбудителей гнилей яблок и винограда при хранении.

№ опытной серии	Зона лизиса			
	<i>Monilia fructigena</i>	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Penicillium claviforme</i>	<i>Phizopus nigricans</i>
1	21	17	16	19
2	19	19	18	17
3	20	15	19	18
4	21	18	17	19
5	18	19	19	21
6	19	20	18	20

1706504

Редактор О. Головач	Составитель Л. Шкурская Техред М. Дидык	Корректор И. Эрлей
---------------------	--------------------------------------------	--------------------

Заказ 243	Тираж	Подписное
-----------	-------	-----------

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

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