

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ
імені Д.К. ЗАБОЛОННОГО

На правах рукопису

КОЗАЧКО Ірина Олександрівна

**ЕНДОФІТНИЙ ШТАМ *BACILLUS SUBTILIS* 26Д -
ОСНОВА МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ЗАСОБУ
ЗАХИСТУ РОСЛИН**

03.00.07 - мікробіологія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1997

549

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00761043 (L)

Дисертація є рукописом.

Робота виконана у відділі антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України.

Науковий керівник: академік НАН України,
професор В.В.Смирнов.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
професор Гвоздяк Р.І.

кандидат біологічних наук
Лаппа Н.В.

Провідна організація: Національний аграрний університет.

Захист відбудеться "19" лютого 1997 року о 10 годині на засіданні спеціалізованої ученої ради Д 016.06.01 по присудженню наукового ступіня доктора наук при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України (252143, Київ-143, вул. Заболотного, 164)

З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Автореферат розісланий "___" _____ 199 року.

**Учений секретар
спеціалізованої ради
кандидат біологічних наук**

Л.М.Пуріш

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТИ.

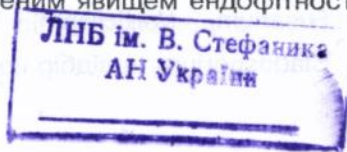
Актуальність теми. Одним з найважливіших науково-практичних завдань мікробіологічної науки є теоретичне обґрунтування, розробка і конструювання високоефективних мікробних препаратів для захисту сільськогосподарських рослин від бактеріальних та грибних захворювань.

Перевагою біологічних засобів захисту на відміну від хімічних пестицидів є те, що вони не забруднюють навколишнє середовище токсичними сполуками, не порушують взаємозв'язків між компонентами агроєкосистеми, практично нешкідливі для організму теплокровних.

Результатами досліджень вчених різних країн протягом останніх років переконливо доведено, що до складу мікроорганізмів, перспективних з точки зору створення мікробних пестицидів, є всі підстави віднести бактерії роду *Bacillus* (Baker C.I., 1986, Berenek I., 1989, Kado C.I., 1987).

В роботах Афанасьєвої Л.Б., 1990, Utkhege R.S., Li T.S., 1989, Phal Chae-Gun Sasaki, Masauhi, 1990 та багатьох інших наводяться відомості про високу антагоністичну активність штамів бактерій роду *Bacillus* по відношенню до різних збудників бактеріальних та грибних захворювань рослин. Перспективність розвитку досліджень у зазначеному напрямі підтверджується тим, що на основі цих бактерій вже створені та впроваджені в практику біопрепарати: бацифіт, бациспецин БМ та бактофіт.

Особливий інтерес до проблеми створення біологічних засобів захисту рослин від хвороб на основі бактерій роду *Bacillus* виникає у зв'язку з нещодавно встановленим явищем ендодітності бактерій-антагоністів.



Результатами досліджень Менлікієва М.Я. 1987, Misaghi T.I., Donndelinger, 1989, Fucikovskiy L., Luna T., 1989, виявлено, що деякі бактерії-антагоністи здатні заселяти тканини рослин, починаючи з фази проростків та сходів, і персистувати в них протягом тривалого періоду розвитку рослин, не завдаючи їм ніякої шкоди.

Більше того, співіснування бактерії-антагоніста з рослиною виявляється для останньої корисним, оскільки запобігає проникненню в неї збудників хвороб і тим самим в значній мірі захищає від патогенних мікроорганізмів.

Таким чином, розробка високоефективних засобів боротьби з хворобами рослин, заснованих на використанні ендofітних бактерій роду *Bacillus* - антагоністів фітопатогенних бактерій і грибів, постає надто важливим з теоретичної точки зору та актуальним щодо практичного використання у сільському господарстві завданням.

Мета і завдання досліджень. Метою даної роботи було виділення і вивчення високоефективних культур бактерій роду *Bacillus* - антагоністів збудників деяких бактеріальних і грибних хвороб рослин та створення на основі найбільш ефективного штаму принципово нового препарату, призначеного для захисту рослин.

При цьому були поставлені такі завдання:

1. Ізолювання ендofітних бактерій роду *Bacillus* із внутрішніх тканин здорових рослин бавовника.
2. Вивчення фізіолого-біохімічних властивостей та ідентифікація ізольованих ендofітних бактерій.
3. Дослідження антагоністичних властивостей виділених бактерій відносно фітопатогенних бактерій та грибів родів: *Erwinia*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Clavibacter*, *Xanthomonas*, *Botritis*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Trichotecium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Cladosporium* та відбір найбільш перспективних культур.

4. Встановлення нешкідливості та безпечності для теплокровних відібраних перспективних штамів.
5. На основі найбільш ефективного та нешкідливого штаму розробити біопрепарат, призначений для захисту рослин від хвороб.
6. Вивчення ефективності розробленого препарату в лабораторних і польових дослідках.
7. Розробити науково-технічну документацію на біопрепарат.
8. Визначити деякі механізми специфічної активності препарату.

Наукова новизна. З внутрішніх тканин здорових рослин виділені ендодітні бактерії роду *Bacillus*, відповідно сучасним уявленням про систематику бактерій проведена їх ідентифікація, і вперше показано видове представництво бацил в ендодітній мікрофлорі рослин бавовника. Цілеспрямовано отримані штами ендодітних бактерій роду *Bacillus*, які мають широкий спектр антагоністичної активності відносно різних збудників грибних і бактеріальних хвороб ряду сільськогосподарських рослин.

Досліджені біологічні властивості активних антагоністів, перспективних для конструювання біопрепарату для захисту рослин від хвороб.

Для культури *B.subtilis* 26Д, що є основою біопрепарату, розроблене дешеве, без харчових компонентів, рідке поживне середовище, яке використовується у промисловім виготовленні біопрепарату глибинним способом. Отримані лабораторні серії препарату "фітоспорин" з титром $1,0 \cdot 10^{10}$ - $1,0 \cdot 10^{11}$ життєздатних клітин і спор 40-50% на грам сухого біопрепарату.

В польових дослідках вперше встановлена висока ефективність розробленого препарату з метою захисту сільськогосподарських рослин від деяких грибних і бактеріальних хвороб. Показано, що одним із механізмів захисної дії фітоспорину є здатність

штаму *B. subtilis* 26Д синтезувати антибіотичні речовини, які відносяться до різних класів хімічних сполук.

Практичне значення роботи. Розроблено біопрепарат "фітоспорин" на основі штаму *B. subtilis* 26Д, виділеного з внутрішніх тканин здорових рослин бавовника, призначений для захисту ряду сільськогосподарських рослин від найбільш шкідливих грибних та бактеріальних хвороб.

Матеріали досліджень включені до Регламенту виробництва, Технічних умов, а також з 1992 року рішенням Комітету з комплексної гігієнічної регламентації використання пестицидів та регуляторів росту рослин біопрепарат включений до плану Держвипробувань.

Апробація роботи. Матеріали дисертації були представлені на II симпозіумі країн-членів РЕВ з мікробних пестицидів (Протвіно, 1990), на Всесоюзній конференції "Проблеми створення і застосування мікробіологічних засобів захисту рослин" (Велегож, 1989), на 4 Всесоюзній конференції "Мікроорганізми в сільському господарстві" (Пушино, 1992).

Публікації. Основні положення дисертації відображені в 5 друкованих роботах.

Структура та об'єм дисертації. Матеріали дисертації викладені на 140 сторінках машинописного тексту і складаються зі вступу, 2 глав огляду літератури, експериментальної частини, яка включає опис матеріалів і методів роботи, та 4 глави власних досліджень, обговорення результатів, списку літератури, який вміщує 192 джерела, з них 117 - на іноземній мові. Робота ілюстрована 19 таблицями та 11 малюнками.

ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень. Основними об'єктами досліджень були штами аеробних спороутворюючих бактерій, ізольовані з ендотканин здорових рослин бавовника, ідентифіковані

до виду. Крім того, були використані бактерії роду *Bacillus* з відомою видовою належністю, що зберігаються в музеях культур мікроорганізмів ІМВ НАН України та на кафедрі мікробіології КДУ, а також одержані з всесоюзних колекцій мікроорганізмів.

Як тест-культури були використані 19 штамів фітопатогенних грибів, одержаних з музею мікроорганізмів Таджицького аграрного університету, кафедри захисту рослин, а також із музею живих культур мікроорганізмів ІМВ НАН України, відділу систематики мікроміцетів, і 20 штамів фітопатогенних бактерій, одержаних із музею мікроорганізмів ІМВ НАН України, відділу фітопатогенних бактерій.

Ідентифікацію виділених ендоефітних бактерій роду *Bacillus* проводили на основі культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних тестів, викладених у 8 виданні Визначника Бергі і "Методичних рекомендаціях з виділення та ідентифікації бактерій роду *Bacillus* із організму людини та тварин" (1983).

Чутливість до антибіотиків вивчали методом дифузії в агар з використанням стандартних індикаторних дисків (Єгоров, 1986).

Антагоністичну активність бацил вивчали методом відстрошеного антагонізму по відношенню до широкого спектру фітопатогенних бактерій і грибів (Єгоров, 1986).

Токсигенні, токсичні та вірулентні властивості аеробних бацил досліджували по Біргер (1982). Результати дослідів співставляли з інструктивними матеріалами, регламентуючими патогенні властивості мікробних культур.

Вивчення ростових властивостей штамів бацил при їх глибинному культивуванні проводили на рідкому поживному середовищі, що містило (г/л): глюкоза - 19,0, цитрат натрію - 1,29, сульфат амонію - 1,92, сульфат магнію - 0,18, воду - до 1л (рН - 7,0-7,2). Бактеріальні популяції вирощували у колбах, ємкістю 750 мл з

50 мл суспензії на качалках при 200 об/хв. та 37°C протягом 24 годин. Як джерела вуглецевого живлення замість глюкози, досліджували ряд моно- та дісахаридів в еквівалентному їй об'ємі - 2 об.%. Постачальниками азоту були амонійні та нітратні солі й деякі органічні сполуки, котрі вносили в кількості 50 мг% по азоту замість сульфату амонію. Титр бактерій визначали шляхом ряду послідовних розведень та висіву на агаризовані поживні середовища з подальшим підрахунком колоній, що виростили.

Антимікробну активність культуральної рідини по відношенню до фітопатогенних бактерій і грибів визначали після її фільтрації через фільтри Зейтца методом дифузії в агар (Єгоров, 1986).

Вміст вільних амінокислот в культуральній рідині вивчали на аміно-кислотному аналізаторі LC 5001 фірми "Biotronic" після відповідної обробки проб сульфасаліциловою кислотою за методикою, описаною Смирновим з співавторами (1983).

Оптимізацію складу поживного середовища здійснювали за допомогою методу математичного планування експерименту (Бірюков, 1975).

Виготовлення препарату проводили методом, запропонованим В'юницькою (1988).

Ефективність препарату в польових умовах вивчали методом обробки насіння напівсухим способом (Менлікєв, 1987).

З метою вивчення діючого начала препарату проводили виділення індивідуальних речовин за допомогою тонкошарової й колоночної хроматографій і визначали їх структуру за допомогою ЯМР ¹H-спектроскопії.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

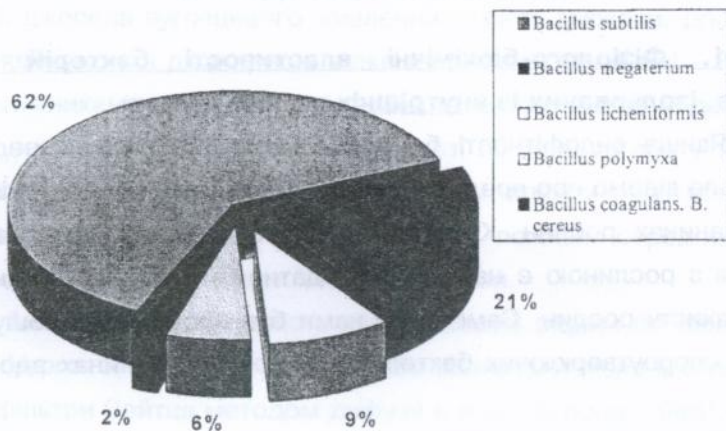
1. Фізіолого-біохімічні властивості бактерій роду *Bacillus*, ізольованих із внутрішніх тканин рослин.

Явище ендofітності бактерій відкрито порівняно недавно, тому мало відомо про представництво різних груп мікроорганізмів в ендof-тканинах рослин. Крім того, мікроорганізми, що живуть в симбіозі з рослиною є найбільш придатними щодо створення засобів захисту рослин. Саме тому нами був проведений пошук аеробних спороутворюючих бактерій у внутрішніх тканинах здорових рослин.

В результаті проведених досліджень з внутрішніх тканин рослин бавовника ізольовано 153 штами бактерій роду *Bacillus*. Дослідження культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних властивостей штамів ендofітних бактерій дало можливість віднести їх до 6 видів: *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. cereus* та *B. coagulans*. Серед них чисельну перевагу мав вид *B. subtilis* (98 штамів) (мал. 1).

Штами цього виду з основних морфологічних та фізіолого-біохімічних ознак були подібними, лише щодо здатності поглинати вуглеводи, - трохи відрізнялись. Але ці відмінності все-таки не були підставою для віднесення їх до будь-якого іншого виду.

У зв'язку з цим, як додатковий критерій для ідентифікації виділених штамів ендofітних бактерій, був використаний метод, заснований на різниці їх чутливості до антибіотиків. Результати досліджень щодо розподілу на види штамів ендofітних бактерій роду *Bacillus*, проведених запропонованим методом, були аналогічні отриманим класичними методами ідентифікації.



Мал. 1. Видове представництво бацил в ендофітній мікрофлорі бавовника.

Найбільша імовірність помилок була у визначенні серед видів *B. subtilis* - *B. megaterium* та *B. licheniformis* - *B. polymyxa*. Проте ці види досить чітко розрізняються з морфологічних та біохімічних ознак.

Імовірність помилок даного методу складала не більше 10%, що не поступається надійності більшості біохімічних тестів /Табл. 1/.

Таким чином, результати проведених нами досліджень ендофітних бактерій роду *Bacillus* показали, що вони принципово відрізняються від подібних бактерій названих видів, які існують в навколишньому середовищі. До того ж структура розподілу на види ендофітних бацил аналогічна до такої ж в інших екологічних нішах. Це дає змогу допустити, що джерелом надходження названих бактерій до внутрішніх тканин є ризосфера рослин, ґрунт та інші складові навколишнього середовища.

Таблиця 1.

Надійність визначення виду при використанні запропонованого методу ідентифікації.

		Штами визначаються, як види:					
		К-сть штамів	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. polymyxa</i>	<i>B. cereus</i>
Штами належать до видів	<i>B. subtilis</i>	98	86	2	40	2	0
	<i>B. megaterium</i>	9	1	0	7	3	0
	<i>B. licheniformis</i>	37	0	30	0	10	0
	<i>B. polymyxa</i>	6	0	3	2	4	0
	<i>B. cereus</i>	2	0	0	0	0	2

2. Антагоністичні властивості бактерій роду *Bacillus* перспективних штамів для створення засобів захисту рослин.

Початковим етапом досягнення поставленої мети був відбір штамів, перспективних щодо створення біопрепарату для захисту рослин. В основі захисної дії біопрепаратів із живих мікробних культур лежить явище антагонізму. Тому первинним критерієм для скринінгу була вибрана антагоністична активність ізольованих ендодітних бацил по відношенню до ряду збудників грибних та бактеріальних захворювань рослин.

Аналіз результатів показав, що більшість ендодітних бактерій роду *Bacillus* характеризується різноманітною за спектром і ступенем антагоністичною активністю по відношенню, як до фітопатогенних бактерій, так і до грибів. Визначено, що серед бактерій роду *Bacillus*, особливо серед виду *B. subtilis*, є штамів (до 10%), які

мають достатньо широкий спектр дії, пригнічують (до 80%) тест-культури, як фітопатогенних бактерій, так і грибів, при цьому ступінь їх антагоністичної дії надто високий (зона затримки росту тест-культур понад 20 мм). Виявлені окремі штами (табл. 2), що характеризуються більш широким спектром і більш високою антагоністичною активністю по відношенню до різних тест-культур.

Зазначені культури, відібрані в результаті проведених досліджень, ми віднесли до найбільш перспективних для створення біопрепаратів.

3. Перспективні штами-антагоністи роду *Bacillus* - основа для конструювання біопрепарату.

Однією з найважливіших умов створення препарату з живих мікробних культур є їх повна нешкідливість для організму теплокровних.

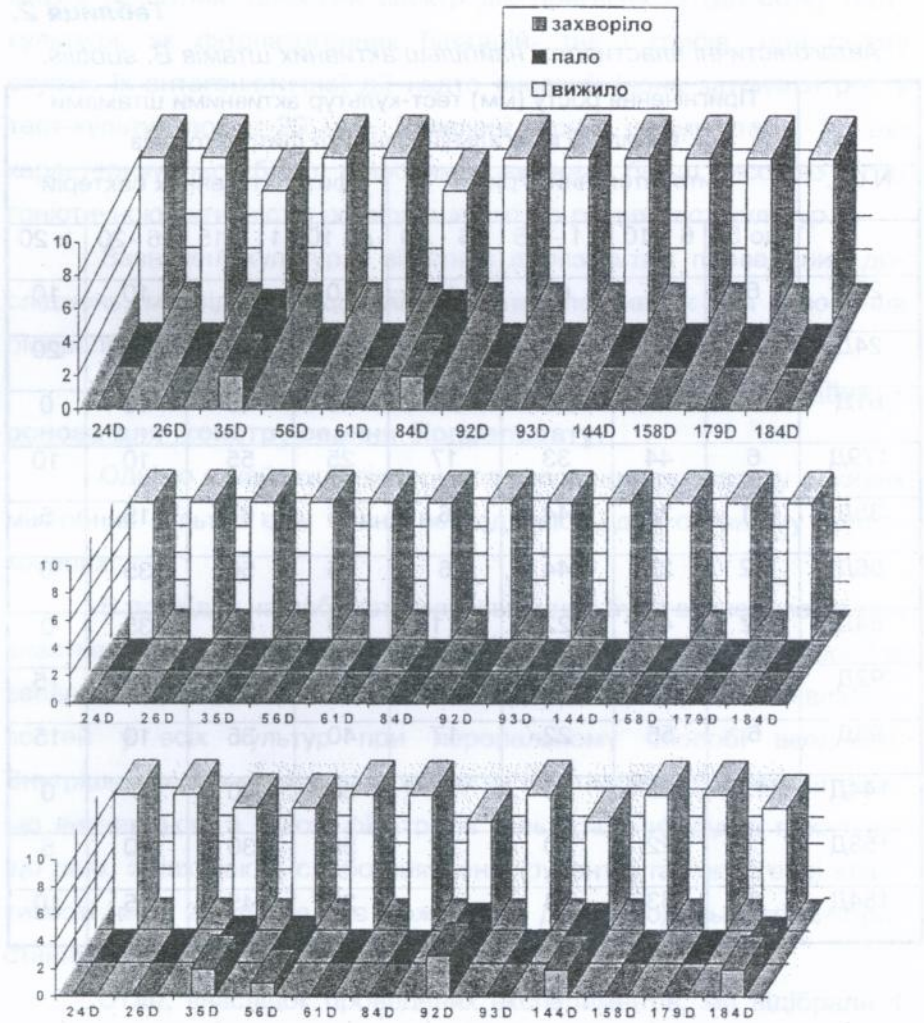
В дослідях на лабораторних тваринах були вивчені патогенні властивості відібраних штамів-антагоністів при різних способах введення. Досліди *in vivo* показали відсутність патогенних властивостей у всіх культур при пероральному способі введення. Внутрішньочеревне введення живих та інактивованих клітин штамів, що вивчаються, а також фільтратів культуральних рідин показало, що деякі з них мають слабо виявлені вірулентні та токсигенні властивості (мал. 2), що не дає можливості для їх подальшого використання, як основи біопрепарату.

Отже, внаслідок проведених експериментів, ми відібрали 4 штами ендоспориювальних бактерій роду *Bacillus* (*B. subtilis* 24Д, 26Д, 61Д, 179Д), які відзначаються яскраво виявленою антагоністичною активністю по відношенню до фітопатогенних бактерій і грибів і при цьому характеризуються повною нешкідливістю для теплокровних.

Таблиця 2.

Антагоністичні властивості найбільш активних штамів *B. subtilis*.

№ шт.	Пригнічення росту (мм) тест-культур активними штамми бацил, % к загальній кількості фітопатогенів							
	фітопатогенних грибів				фітопатогенних бактерій			
	до 5	6 - 10	11 - 15	16 - 20	до 10	11 - 15	16 - 20	> 20
26Д	6	17	61	17	10	70	10	10
24Д	11	50	28	11	10	40	30	20
61Д	17	39	28	17	45	40	15	0
179Д	6	44	33	17	25	55	10	10
35Д	11	39	44	6	15	65	15	5
56Д	22	28	44	6	15	50	35	0
84Д	22	44	22	11	20	45	35	0
92Д	11	56	22	11	45	25	15	15
93Д	6	56	22	17	40	35	10	15
144Д	11	33	39	17	60	40	0	0
158Д	11	22	50	17	55	30	10	5
184Д	6	33	44	17	30	45	15	10



Мал. 2. Результати дослідження патогенних властивостей відібраних штамів *B. subtilis*: А - токсигенності, Б - токсичності, В - вірулентності.

Крім того, розробка біопрепаратів на основі бактерій роду *Bacillus* та їх практичне використання потребує вивчення умов ро-

сту і розвитку культур, їх фізіологічних та біохімічних особливостей, а також біосинтезу біологічно активних речовин, що виділяються в середовище (ферментів, антибіотичних речовин, амінокислот) та впливу на ці процеси різних факторів (t° , pH). Нами досліджено вплив різних джерел вуглецю та азоту на ріст і розвиток відібраних штамів в глибинних умовах культивування з метою створення оптимального середовища для отримання біопрепарату.

Як показали результати досліджень, штами *B. subtilis* можуть використовувати різні вуглеводи, як джерела вуглецевого живлення, проте, максимальне накопичення біомаси спостерігалось при вирощуванні їх на середовищах, що містили меласу та зелену патоку. Для штаму 61Д одержані ростові показники, що перевищували контрольний рівень на 18% з виходу біомаси, для штаму 179Д - на 174-220%, 24Д - на 227-319%, 26Д - на 165-179%. При цьому спектр випробуваних вуглеводів ширший для штаму 26Д, - крім зеленої патоки і меласи, цей штам ефективно використовує також для свого росту змішані джерела вуглеводів, як глюкоза у сполученні з ксиліозою та арабінозою.

Значний вплив на ріст і розвиток ендоситних бактерій роду *Bacillus* здійснювали джерела органічного та неорганічного азоту, які містились у середовищі. Отримані дані показали, що найбільш ефективним джерелом азоту є кукурудзяний екстракт, який забезпечує максимальний приріст живих клітин для всіх досліджуваних штамів при цьому рівень біомаси (г/л) збільшувався для штаму 61Д з 1,6 до 3,8, 179Д - з 1,4 до 5,2, 24Д - з 1,4 до 4,6, 26Д - з 1,4 до 4,8.

Отримані результати показали також, що деякі джерела вуглецевого та азотного живлення не тільки впливали на вихід життєздатних клітин штамів, що вивчалися, але й сприяли проявленню ними антимікробної активності.

Крім названих ростових параметрів, ми також враховували кислотність середовища та її взаємозв'язок з накопиченням біологічно активних речовин наприкінці ферментації. Дослідження показали, що при максимальному накопиченні біомаси на середовищі з меласою, а також з неорганічними формами азоту, величина рН середовища знаходилась в межах області, близької до нейтральної (рН - 6,3-6,8) та активність культуральної рідини не проявлялась. При використанні культурами зеленої патоки і глюкози у сполученні з ксилозою та арабінозою, як джерел вуглецевого живлення, та органічних джерел азоту (кукурудзяний екстракт) відзначалось максимальне накопичення антимікробних речовин в культуральній рідині при трохи більшій кислотності середовища, (рН знаходилось в діапазоні 5,6-6,2), що узгоджується з відомими літературними даними.

Таким чином, нами було розроблене методом підбору середовище, в якому, як джерела вуглецю та азоту, використовуються зелена патока та кукурудзяний екстракт відповідно. Для підбору оптимальних кількісних співвідношень компонентів середовища ми використовували математичний метод багатофакторного планування експерименту. В результаті обробки експериментальних даних було створене нове оптимальне поживне середовище для культивування бактерій роду *Bacillus*: зелена патока - 40 мл/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,94 г/л, кукурудзяний екстракт - 25-30 мл/л, K_2HPO_4 - 9 г/л, MgSO_4 - 0,2 г/л, вода - до 1л.

Дослідження аміносинтетичної активності відібраних штамів показало, що вони є продуцентами таких важливих амінокислот, як глутамінова кислота, що складає від 12 до 75% від загального вмісту утворених амінокислот і займає одне з центральних положень у метаболізмі клітин, пролін - до 55%, що є одним з компонентів багатьох лікувальних препаратів, ароматичні амінокислоти -

триптофан, тирозин, гістидин, фенілаланін - 46, 25, 9, 7% відповідно, що дають початок великій кількості біологічно активних речовин - гормонам, медіаторам, коферментам тощо.

З метою перевірки специфічної активності штамів бактерій роду *Bacillus* в польових дослідках на рослинах було виготовлено 4 варіанти лабораторних серій препаратів на основі 4 штамів: *B. subtilis* 24Д, 26Д, 61Д, 179Д. Препарати випробовували на рослинах бавовника. Найбільш яскраво виявленою специфічною активністю в польових дослідках характеризувалась культура *B. subtilis* 26Д, яка, маючи широкий спектр антагоністичної активності, виявилась ефективною для захисту бавовника від таких захворювань, як кореневі гнилі, вертицильозний вілт і гоммоз.

Враховуючи отримані нами раніше дані з фізіолого-біохімічних властивостей цього штаму, його нешкідливості для організму теплокровних, здатності поглинати різні джерела вуглецю та азоту, продукувати різні біологічно активні речовини, ендоефітний штам *B. subtilis* 26Д був обраний нами, як основа біопрепарату для захисту рослин від хвороб.

4. Препарат "фітоспорин".

Отримані результати вивчення біологічних властивостей штаму *B. subtilis* 26Д є складовою частиною робіт щодо створення та впровадження в сільськогосподарську практику препарату "фітоспорин". Необхідним етапом цих робіт було обґрунтування параметрів для Виробничого регламенту та Технічних умов. Початковою назвою препарату була "хлопкоспорин", оскільки штам був ізольований з ендотканин здорових рослин бавовника і позитивний результат його використання в польових умовах був також отриманий на рослинах бавовника.

Матеріали з препарату були представлені в Держхімкомісію та був отриманий дозвіл на проведення державних випробувань препарату "фітоспорин" як біологічного засобу захисту рослин.

З метою поширення сфери застосування біопрепарату були проведені польові випробування на ряді сільськогосподарських рослин: кукурудзі, черенках цитрусових, ячмені, озимій пшениці, цукровому буряку і томатах. Обробка насіння вказаних культур препаратом не тільки значно зменшувала враженість їх різними хворобами, але й підвищувала врожайність, покращувала його якість. Так, передпосівна обробка насіння озимої пшениці привела до 50% зниження враженості рослин кореневими гнилями (з 21% у контролі (вода) до 11,1% в досліді), бурою іржою (з 31% до 12,7). Добрі результати, що були отримані по показниках враженості хворобами і врожайності відзначені при обробці фітоспорином ячміню: враженість кореневими гнилями на дослідних ділянках виявлялася в 1,7 рази рідкіше, ніж у контролі; середня врожайність ячміню на 2,1 ц/га у досліді була вищою за контроль (мал. 3, 4). Позитивні результати використання препарату одержані також на таких рослинах як лимон, томати, кукурудза і цукровий буряк.

Щодо питання про захисну дію "фітоспорину", треба відзначити, як надто важливі, результати наших бактеріологічних досліджень. Результати цих дослідів свідчать про проникнення бактерій препарату із тканин обробленого насіння у виростаючі з них рослини. Так, тканини рослин з насіння, обробленого фітоспорином, містили в 2,2 рази більше спорових бактерій, ніж тканини контрольного варіанту. Це вказує на те, що протягом росту і розвитку рослини складаються умови для пригнічення патогенної мікрофлори в значній мірі за рахунок прояву антагоністичної дії бактерій препарату.



Мал.3. Вплив фітоспорину на врожайність деяких сільськогосподарських культур.



Мал.4. Вплив фітоспорину на врожайність рослин хворобами

Безумовно, отримавши значний ефект від застосування створеного препарату, уявлялось важливим зробити спробу з'ясувати деякі елементи механізму його дії. Механізм дії біопрепаратів на основі бактерій-антагоністів складається з багатьох факторів, включаючи руйнування клітинних стінок фітопатогенів за рахунок ферментативної активності, утворення летючих інгібіторів (антибактеріальних речовин), утворення нелетючих інгібіторів (антибіотичних речовин), а також шляхом позитивного впливу на фізіологічні процеси рослини і активізації її корисної мікрофлори. Однак, основним фактором, що вносить найбільш вагомий вклад у загальний захисний ефект, щодо нашого уявлення, є продукція мікробами-антагоністами антибіотичних речовин.

Проведеними дослідженнями показано, що одним із механізмів захисної дії препарату "фітоспорин", є продукування штамом *B.subtilis* 26Д антибіотичних речовин аміноглікозидної та поліпептидної природи, перші з яких переважно пригнічують ріст фітопатогенних бактерій, а другі - фітопатогенних грибів.

Таким чином, результатом всього комплексу приведених вище досліджень, було створення препарату "фітоспорин", забезпечення його виробничого випуску та широких випробувань у польових дослідках.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено представництво аеробних спороутворюючих бактерій в ендоефітній мікрофлорі здорових рослин бавовника. Відзначено, що ці бактерії представлені 6 видами: *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. cereus* та *B. coagulans*. Перевагу мав вид *B.subtilis*.
2. Вперше відзначена висока антагоністична активність ендоефітних бацил відносно широкого спектру збудників грибних і бак-

теріальних хвороб рослин. Відібрані високоактивні штами-антагоністи, перспективні для розробки біопрепарату для захисту рослин.

3. Обґрунтовано включення до складу препарату для захисту рослин штаму *B. subtilis* 26Д, який поряд з вираженою антагоністичною активністю до широкого спектру фітопатогенів, показав повну нешкідливість для теплокровних, високу технологічність при глибокій засобі культивування, здатність до продукування біологічно активних речовин та високу специфічну активність у польових дослідках.
4. Оптимізовані варіанти поживних середовищ для високопродуктивного глибинного культивування штаму *B. subtilis* 26Д. Обґрунтовані необхідні параметри для виробничого регламенту і технічних умов щодо отримання біопрепарату "фітоспорин".
5. Встановлена висока ефективність препарату "фітоспорин" при масштабних польових дослідженнях на ряді сільськогосподарських рослин. Обробка насіння рослин біопрепаратом приводила до значного зменшення враженості їх різними захворюваннями, високого підвищення врожайності, покращення якості врожаю.
6. Показано, що одним із механізмів захисної дії препарату "фітоспорин" є продукування штамом *B. subtilis* 26Д антибіотичних речовин поліпептидної і аміноглікозидної природи.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Козачко И.А., Выюницкая В.А., Бережницкая Т.Г., Резник С.Р., Смирнов В.В. Эндифитные бактерии рода *Bacillus*-перспективные культуры для создания биологических средств защиты растений от болезней.// Микробиол. журн.-1995.-57, N5, -с. 69-78.

2. Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Козачко И.А. Подбор состава среды для оптимизации аминосинтетической активности аэробных бацилл // Микробиол. журн. -1991. -53, N4, -с.68-73.
3. Менликиев М.Я., Ваньянц Г.М., Смирнов В.В., Резник С.Р., Вьюницкая В.А., Султанова М.Х., Шарипова Н.У., Каримов К., Резванула Н., Чаплинский В.Е., Козачко И.А., Джумаев А. Хлоп-коспорин - новый биологический препарат для защиты хлопчатника от болезней.//Информационный листок.-Душанбе: Тадж. НИИНТИ, сер.68-35, N63-92, 1992. -2с.
4. Осадчая А.И., Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Козачко И.А., Смирнов В.В. Стимуляция роста и спорообразования *B.subtilis* за счет оптимизации углеводного питания при глубинном культивировании.// Прикладная микробиология.-1997. (принята к печати).
5. Осадчая А.И., Кудрявцев В.А., Козачко И.А., Сафронова Л.А., Смирнов В.В. Азотное питание штаммов аэробных спорообразующих бактерий в условиях глубинного культивирования.// Прикл.микробиол. -1997. - (принята к печати).
6. Осадчая А.И., Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Козачко И.А., Смирнов В.В. Факторы физиологической регуляции продукции внеклеточных аминокислот штаммами аэробных спорообразующих бактерий.// Прикл.микробиол.-1997. - (принята к печати).
7. Kudryavtsev V.A., Osadchaya A.I., Safronova L.A., Kozachko I.A. Extracellular aminoacids of aerobic sporo-forming bacteria / IUMS Congress: Bacteriology, mycology / Osaka, 16-22 September 1990. -p.92.
8. Reva O.N., Vyunitskaya V.A., Reznik S.R., Kozachko I.A., Smirnov V.V. Antibiotic susceptibility as a taxonomic characteristic of genus *Bacillus* // Int. J. Syst. Bacteriol. -1995. -45, N2, -p.

РЕЗЮМЕ

Козачко И.А. Эндобитний штамм *Bacillus subtilis* 26Д - основа микробиологического средства защиты растений. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.07 - микробиология. Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины, Киев, 1996.

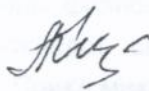
Изложены результаты исследований биологических свойств штаммов аэробных спорообразующих бактерий, изолированных из эндо-тканей здоровых растений. Из их числа отобран штамм *B. subtilis* 26Д, который обладает ярковыраженной антагонистической активностью по отношению к различным фитопатогенам, безвреден и безопасен для теплокровных, технологичен. На его основе создан препарат "Фитоспорин", предназначенный для предпосевной обработки семян, с целью защиты различных сельскохозяйственных растений от ряда грибных и бактериальных болезней. Фитоспорин безопасен для окружающей среды и характеризуется высокой эффективностью при его практическом использовании.

SUMMARY

Kozachko I.A. Endophytic strain *B. subtilis* 26D - is the basis of plant protection microbiological remedy. The Candidat Thesis for a Philosophy Doctor degree, the speciality 03.00.07 - microbiology. The Institute of Microbiology and Virology nm. D.K. Zabolotny of the NAS of Ukrain, Kiev, 1996.

The present study reports about biological properties of the aerobic sporeforming bacterium, isolated from the symptom-free plants endo-tissues. The one most prominent strain was picked over them is *B. subtilis* 26D, with striking antagonistic activity to different phytopathogens, safe, harmless for and technological. Based on *B. subtilis* 26D the new preparation "phyto sporin" was created to pre-sowing seeds processing in order to protect different agricultural plants from bacteriological diseases and mycosis. Phyto sporin is safe for the environment and high effective in its practical use.

Ключові слова: бацили-антагоністи, ендоефітний штам, бактеріальний препарат, захист рослин від хвороб.



Kozachko I.A., Salonova L.A., Kozachko I.A.
Isolates of aerobic spore-forming bacteria / IJMS
Microbiology / Osaka, 16 77 August 1997

Підписано до друку 27.12.96р. Формат 60x84/16.
Ум. друк. арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.
Тираж 100. Зам. 109.

Відділ оперативної поліграфії
Центру "Міжнародна освіта"
227-12-75, 227-37-86

441782

AB 36.813
AB 36.813