

Винахід стосується сільськогосподарської мікробіології, зокрема, бактерій, які використовують як засіб захисту рослин від фітопатогенних грибів, що сприяє підвищенню врожайності овочевих та зернових культур і поліпшенню їх якості.

Широке застосування хімічних засобів підвищення продуктивності культурних рослин призводить до накопичення залишків шкідливих сполук і міграції їх в системі атмосфера-рослина-ґрунт-вода і т.д. Наслідком таких міграцій є забруднення продукції рослинництва і тваринництва з подальшим потраплянням шкідливих речовин в організм людини.

Альтернативою надлишкової хімізації сільськогосподарського виробництва є створення мікробних препаратів, що поліпшують кореневе живлення рослин, стимулюють їх ріст та захищають від хвороб та шкідників, поліпшують родючість ґрунтів.

За прототип прийнято штам бактерій *Bacillus subtilis* 26D на основі якого виготовляють фітоспорин-мікробний препарат проти бактеріальних і грибкових хвороб (А.С. №1717156). Штам *B. subtilis* 26D було виділено співробітниками Інституту мікробіології та вірусології НАНУ (м.Київ) і Таджикиського сільськогосподарського інституту (м.Душанбе) у природних умовах з бавовнику в Шааржуцькому районі Таджикиської РСР у 1986 році. Автори: Смірнов В.В., Менлікєв М.Я., Резнік С.Р., Ваньянц Г., В'юницька В.А., Султанова М.Х., Шаріпова Н.У., Хотянович А.В.

Культурально-морфологічні, фізіолого-біохімічні особливості культури бактерій *B. subtilis* 26D: Грампозитивні аеробні спороутворюючі палички, що продукують каталазу. На МПА, СА, середовищі Громико, картопляному агарі ростуть рясно. На МПА утворюють складчасті колонії в'язкої консистенції, тілесного кольору, краї колоній неправильної форми. На картопляному агарі - колонії світло-тілесного кольору, блискучі, в'язкої консистенції, краї рівні. На середовищі Громико - колонії тілесного кольору, складчасті, краї порізані, консистенція в'язка.

У мазках 18-годинної культури виявляються прямі паличковидні клітини розміром 1,9x0,5мкм, розміщені поодинокі, парно, рідше у ланцюжках. Клітини рідкі. При спороутворенні клітини не роздуваються. Спори еліптичної форми розміром 0,9x0,5мкм, у клітинах розміщені центрально.

Культура ферментує глюкозу, арабінозу, лактозу, манніт, сахарозу з утворенням кислоти; не розкладає дульцит; дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера, гідролізує крохмаль, желатину, не гідролізує сечовину; утилізує цитрат; пропіонат не використовує. Культура не росте в анаеробних умовах, не утворює включення полі-β-оксимасляної кислоти на середовищі МПА з глюкозою; не володіє лецитиназою; індол, сірководень не утворює. Штам не патогенний.

Значним недоліком прототипу є те, що він (штам *Bacillus subtilis* 26D) інгібує ріст деяких симбіотичних вільноіснуючих та асоціативних азотфіксуювальних бактерій, особливо азотобактеру, тобто проявляє бактерицидну або бактериостатичну дію до деяких виробничих штамів, що ускладнює технологію застосування фітоспорина з азотфіксуювальними, фосформобілізуючими і рістстимулюючими біопрепаратами. Недоліком прототипу є висока токсична активність як до патогенної, так і до агрономічне цінної мікрофлори, що ускладнює технологію застосування фітоспорина.

Задачею винаходу було одержання азотфіксуючих штамів бактерій сумісних з мікробними препаратами іншої функціональності, а також з більшістю хімічних засобів захисту рослин від хвороб та шкідників.

З цією метою в робочій колекції азотфіксуювальних бактерій Південного філіалу Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН методом зустрічних культур було виявлено найбільш активний антифунгальний штам 6-М - антагоніст фітопатогенних мікроорганізмів. Даний штам виділено з ризосфери гороху і за фізіологічними ознаками ідентифіковано як *Bacillus polymyxa*. Виділення штамів здійснювалося за методикою (Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991, стр.82) шляхом відбору тих колоній, навколо яких утворилася найбільша за величиною зона розчинення хітину та відсівали їх в окремі пробірки з стерильним скошеним поживним середовищем.

Технічним результатом винаходу, що заявляється, є значно вища ефективність дії на приріст врожаю злакових культур порівняно з хімічними протруйниками, а також, поліпшення кореневого живлення рослин і якості одержаної продукції рослинництва при збереженні та примноженні природної родючості ґрунтів, що досягається завдяки відсутності бактерицидної або бактериостатичної дії штамів *Bacillus polymyxa* 6-М до деяких виробничих штамів.

Характеристика штамів *Bacillus polymyxa* 6-М. Номенклатурні дані: рід - *Bacillus*, вид - *Bacillus polymyxa*, депонований в колекції Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН.

Походження штамів. Штам *Bacillus polymyxa* 6-М виділено методом аналітичної селекції з ризосфери гороху на агаризованому гороховому середовищі.

Культурально-морфологічні ознаки. Клітини 3-х добової культури штамів *Bacillus polymyxa* мають паличковидну форму розміром 0,6-0,8x2-5мкм, рухомі. Грампозитивні, факультативний анаероб. Ендогенна спора еліптичної форми центрально-термінального розташування в чітко роздутій спорангії. У рідкому кукурудзяно-мелясовому середовищі спори утворюються на 2-3 добу, на гороховому агарі - на 4-5 добу.

Зростання біомаси бактерій при посіві штрихом на гороховому агарі інтенсивне, штрих блискучий, слизький. Колонії на гороховому агарі з'являються на 2-3 добу, мають випуклу округлу форму до 4мм в діаметрі, слизькі, блискучі.

Фізіолого-біохімічні властивості. Позитивна реакція на молоці з лакмусом. Утворює газ. Желатин не розріджує. Кислотоутворюючий. На середовищах з органічним азотом (МПА) не продукує слиз але активно спороутворює, добре розвивається на середовищах з солями амонію, росте на безазотних середовищах, але не утворює спор.

Штам 6-М активно засвоює глюкозу і сахарозу та на вуглеводних середовищах активно продукує слиз. Каталазопозитивний, гідролізує крохмаль, утворює ацетон, казеїн розчіплює, відновлює нітрати до нітритів.

На твердих і в рідких середовищах штам *Bacillus polymyxa* 6-М росте в температурних межах від 12°C до 33°C, оптимум росту 22-28°C, оптимум спороутворення 16-20°C. Зростання бактерій спостерігається в середовищах з діапазоном pH 5,5-8,5, оптимум pH - 7,0-7,2.

Ознаки штаму стійкі. Антибіотична активність за оцінкою за шкалою Джексона і Карла 3 і С, тобто пригнічення фітопатогенних грибів на віддалі у всіх повтореннях досліду. Штам є антагоністом 14 видів фітопатогенних грибів збудників широко поширених хвороб сільськогосподарських рослин і безпечний для людини і тварин.

Зберігають на скошеному гороховому агарі при 3-5°C, пересівають один раз у шість місяців, для тривалого зберігання (до 3-х років) біомасу штаму наносять на стерильні шматочки фільтрувального паперу і зберігають у стерильному пеніциловому флаконі.

Біотехнологічна характеристика:

Штам *Bacillus polymyxa* 6-М інгібує розвиток багатьох грибів-збудників розповсюджених захворювань сільськогосподарських рослин, зокрема, крім збудників кореневих гнилей, одночасно не впливає на ріст агрономічно цінних симбіотичних і асоціативних азотфіксувальних і фосформобілізуєючих бактерій.

Культурально-морфологічна характеристика:

При культивуванні штаму *Bacillus polymyxa* 6-М у кукурудзяно-мелясному середовищі при температурі 30°C виділяють три основні фази росту культури. Експоненціальна фаза починається з моменту внесення посівного матеріалу (молоді вегетативні клітини 14-16 годинна культура), характеризується максимальною швидкістю розмноження клітин і триває 12 годин. Вегетативні клітини добової культури грампозитивні, мають паличковидну форму, рухаються за допомогою джгутиків. Стаціонарна фаза характеризується максимальним вмістом клітин в одиниці об'єму і триває до 32-34 годин від початку культивування (або з моменту інокуляції середовища). Для цієї фази характерно поява спороутворюючих клітин. Початок спороутворення відмічається у 28-годинній культурі. Масове спороутворення відмічається у 48-годинній культурі.

При висіві на гороховому агарі з вуглеводами колонії *Bacillus polymyxa* 5-М з'являються на 2-3 добу, мають округлу форму, опуклі, блискучі, слизькі, 2-4мм в діаметрі.

На твердих і рідких середовищах штам *Bacillus polymyxa* 6-М росте у температурних межах 12-33°C, оптимум – 22-28°C; ріст в межах рН середовища - 5,5-8,5, оптимум рН - 7,0-7,2.

Серед вивчених 17 видів фітопатогенних грибів штам *Bacillus polymyxa* 6-М пригнічує ріст 14 видів, у т.ч. широко поширені фітопатогени: *B. sorokiniana*, *F. avenaceum*, *F. graminearum* та ін.

Приготування рідкого препарату:

Оптимізований склад середовища:

Кукурудзяний екстракт - 15г/л;

Меляса бурякова - 30г/л;

Крейда - 1г/л;

Вода водопровідна

рН довести рідким склом до 7,0-7,2.

Культивування на качалці при 220об/хв при температурі 30°C.

Загальний титр 3-х добової культури - 270,0млн/мл.

Титр вегетативних клітин 3-х добової культури - 40,0млн/мл.

Титр спор - 230,0млн/мл.

Антифунгальна активність штамів виявилась досить значною: за оцінкою за шкалою Джексона і Карла індекс антагонізму – “З”, а частота зустрічаємості цього типу реакцій - „С”, що означає пригнічення фітопатогенних грибів на віддалі у всіх повтореннях досліду.

В ході досліджень по спектру дії, штам 6-М пригнічував розвиток широкого кола фітопатогенних грибів і серед них таких розповсюджених збудників хвороб сільськогосподарських рослин, як *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium avenaceum* Sacc, *Fusarium graminearum*, *Trichotecium roseum*, *Ascohyta pisi* Lib., *Cercospora herpotrichoides* Fron., *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., *Phomopsis leptostromiformis* Bubak, *Rhizoctonia violaceae* Tul., *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. De Bary, *Pseudocercospora herpotrichoides* та ін.

Порівнювали антифунгальну дію штаму *Bacillus polymyxa* 6-М з аналогом - *Bacillus subtilis* 26D який є основою мікробного препарату фітоспорин. Встановили, що швидкість росту і спектр антимікробної дії *B. polymyxa* 6-М і його антибіотична активність до грибів практично однакова з *Bacillus subtilis* 26D.

Однак, одержані результати (табл.1), свідчать про те, що штам *Bacillus polymyxa* 6-М не інгібує ріст симбіотичних азотфіксувальних бактерій родів *Rhizobium* і *Bradyrhizobium*, які утворюють бульбочки на коренях бобових культур (препарат ризобіофіт застосовується під бобові культури); діазотрофів: агробактерій, ентеробактерій і азотобактеру (препарати ризоагрин, ризоентерин і азотобактерин під злакові та овочеві культури); не заважає функціонуванню фосформобілізуєючих штамів бактерій *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 і *Agrobacterium radiobacter* 10 (універсальні препарати ФМБ 32-3 і агрофіл). Штам аналог - *Bacillus subtilis* 26D проявляє бактерицидну або бактеріостатичну дію до азотобактеру і деяких інших виробничих штамів бактерій з агрономічно цінними властивостями.

Отже, отримані результати виявили, що господарська цінність штаму *Bacillus polymyxa* 6-М визначається не лише високою антифунгальною активністю, а ще вибірковістю що антагоністичної дії на ризосферні мікроорганізми.

На послідовних етапах роботи порівнювали вплив даного антифунгального штаму і хімічних протруйників фундазолу та максимуму на чисельність мікроскопічних грибів на поверхні насіння пшениці і ячменю (табл.2).

Мікробіологічні висіви змиву з поверхні насіння обробленого вказаними речовинами показали, що дія біопротекторів не поступається за ефективністю хімічним препаратам.

Результати досліджень свідчать, що через 2 години після обробки культурою *Bacillus polymyxa* 6-М насіння озимої пшениці і ячменю кількість грибів на їх поверхні порівняно з контролем знижується у 1,3-4,0 рази, через місяць - у 7-9 разів, що на рівні дії фундазолу і майже вдвічі краще дії максимуму. Ефективність дії антифунгальних штамів в польових умовах визначали в наукових установах УААН (Одеська ДСГД, Миронівський інститут пшениць ім. В.М.Ремесла, Інститут агроєкології та біотехнології, Інститут сільськогосподарської мікробіології і його Південний філіал та ін.), і вона в середньому склала 2,5ц/га приросту врожаю злакових культур. У виробничому досліді на південному чорноземі в Криму порівнювали урожайність

озимої пшениці, вирощеної з насіння обробленого культурою *Bacillus polymyxa* П і хімічним протруйником вітатиурамом. При обробці вітатиурамом одержана урожайність 32,0ц/га, при обробці *Bacillus polymyxa* П - 36,4ц/га. Отже, ефективність дії біопротектору на 4,4ц/га була вище за дію хімічного протруйника.

Таким чином, азотфіксуючий штам *Bacillus polymyxa* 6-М є антагоністом широкого спектру мікроскопічних грибів, збудників розповсюджених хвороб сільськогосподарських рослин, але не володіє бактеріцидною або бактеріостатичною здатністю до виробничих штамів і, завдяки цьому, може використовуватись у практиці сільського господарства як біопротектор сумісно з іншими мікробними препаратами не заважаючи прояву їх власних функцій азотфіксації, фосформобілізації, рістстимуляції та ін.

Таблиця 1

Антагонізм *Bacillus polymyxa* 6-М та *Bacillus subtilis* 26D у відношенні фосформобілізуючих, асоціативних і симбіотичних азотфіксуючих штамів бактерій

Виробничі штами бактерій	Біопрепарат	Зона впливу на ріст бактерій, мм	
		<i>B. polymyxa</i> 6-М	<i>B. subtilis</i> 26D
<i>Azotobacter vinelandii</i> 10702	Азотобактерин під злаки	0	14-23*
<i>Azotobacter chroococcum</i> 20; 21	Азотобактерин під овочі	0	11-25*
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 204	Ризоагрин під пшеницю	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i> 30-ф	Ризоентерин під ячмінь	0	0
<i>Enterobacter nimipressuralis</i> 32-3	ФМБ універсальний	0	2-3**
<i>Alcaligenes paradoxus</i> 207	Акалігін під рис	0	20-40**
<i>Flavobacterium flavum</i> L-30	Флавобактерин універсальний	0	2-3**
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 6346	Ризобіфіт під сою	0	15-18**
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> М-8	Ризобіфіт під сою поліпшений	0	8-10**
<i>Rhizobium leguminosarum</i> П-2	Ризобіфіт під горох	0	5-10**
<i>Rhizobium leguminosarum</i> Н-7	Ризобіфіт під нут	0	15-20**

* - зона повної відсутності росту азотобактеру;

** - спостерігається ріст по штриху досліджуваних штамів бактерій.

Таблиця 2

Вплив обробки насіння озимої пшениці і ячменю антифунгальним біопротектором і хімічними протруйниками на грибку мікрофлору насіння

Варіант обробки	Кількість грибів, КУО/г насіння після обробки через					
	2 години		7 діб		1 місяць	
	пшениця	ячмінь	пшениця	ячмінь	пшениця	ячмінь
Контроль	400	830	370	630	370	300
<i>Bacillus polymyxa</i> 6-М	100	630	30	30	50	30
Фундазол	200	230	130	200	30	30
Максим	130	330	200	300	130	170