

Винахід відноситься до мікробіологічних засобів підвищення врожайності рослин за рахунок поліпшення фосфорного живлення й захисту від дії фітопатогенів і стосується виділення нового штаму бацил, призначеного для виготовлення бактеріального препарату.

Метою винаходу є одержання нового штаму, що характеризується високою активністю мобілізації фосфору з важкорозчинних неорганічних і органічних сполук фосфору (трикальційфосфат, гліцерофосфат, фітин і ін.), та виявляє антагоністичну активність до фітопатогенних грибів і бактерій, що викликають хвороби овочевих і злакових рослин.

Штам бактерій *Bacillus subtilis* 5-RK виділений з чорноземного ґрунту Черкаської області і селекціонований у відділі мікробіологічних процесів на твердих поверхнях Інституту мікробіології й вірусології ім.Д.К.Заболотного (1МВ) НАН України.

Штам, депонований у Депозитарії мікроорганізмів 1МВ НАН України 26 лютого 2001 р. і йому привласнено колекційний номер *Bacillus subtilis* 1МВ В-7023. Основною особливістю штаму є його здатність до мобілізації фосфору з важкорозчинних неорганічних та органічних сполук у найбільш відповідальний період розвитку рослин. У 1мл мінерального середовища з трикальційфосфатом протягом 3-х діб культивування штам накопичує  $1,8 \cdot 10^8$  клітин та  $150 \text{ мг/л } \text{PO}_4^{3-}$ ; у середовищі з гліцерофосфатом в аналогічних умовах вирощування титр життєздатних клітин складає  $3,8 \cdot 10^8$

клітин у 1мл, а концентрація  $\text{PO}_4^{3-}$  до  $300 \text{ мг/л}$ . Відомий штам *Bacillus megaterium* за 25 діб культивування накопичував з фосфатів заліза  $44,6 \text{ мг/100мл } \text{P}_2\text{O}_5$  (А.с. СССР №1645266, 1988 Суховицкая), (тобто не менше за 25 діб культивування).

Штам *Bacillus subtilis* 5-RK характеризується високою антагоністичною активністю проти фітопатогенних грибів і бактерій, що вражають овочеві й злакові культури рослин (табл.4-5). Описані раніше штами *Bacillus subtilis* мають антагоністичну активність, але при цьому не має відомостей щодо їх здатності мобілізувати фосфати (А.с.№2099947, 1996 Смирнов, Сорокулова).

Штам *Bacillus subtilis* 5-RK для одержання препарату, що поліпшує фосфорне живлення рослин за рахунок його мобілізації із важкорозчинних неорганічних (трикальційфосфат) і органічних сполук (гліцерофосфат, фітин), що захищає рослини від фітопатогенів і підвищує врожайність овочевих культур.

Винахід відноситься до ґрунтової мікробіології, зокрема, до одержання бактеріального препарату, що поліпшує фосфорне харчування рослин, за рахунок мобілізації важкорозчинних у ґрунті неорганічних і органічних сполук фосфору та захищає рослини від фітопатогенів, сприяє підвищенню врожаю овочевих і зернобобових культур і являє собою новий штам для одержання бактеріального препарату.

Штам, виділений з чорноземного ґрунту на мінеральному середовищі Менкінної з глюкозою й гліцерофосфатом кальцію. Ідентифікований відповідно до визначника Бергі, посібника Смирнова із співавт., йому привласнений №5-RK.

Штам, депонований в Українській колекції мікроорганізмів 1МВ НАН України, колекційний номер 1МВ- В-7023.

Штам *Bacillus subtilis* 5-RK має наступні властивості. Морфологічні і культуральні ознаки: грампозитивні палички з круглими кінцями, рухливі, розміром  $0,8 \times 2,9 \text{ мкм}$ . Спори овальні, розташовані субтермінально. Факультативний анаероб. Колонії на картопляному агарі округлої форми, сірувато-білого кольору, плоскі, матові, R-типу. Край колонії не рівний. Діаметр колонії 48-годинної культури складає 3-12мм. На МПБ утворює плівку, росте на МПБ з 5 і 7% NaCl. Може рости при температурі  $28^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$  і  $45^\circ\text{C}$ . Оптимальна температура росту  $28-0,5^\circ\text{C}$ , pH=6,0-7,0.

Росте на суцільному агарі pH=5,5 Дає позитивну реакцію на наявність каталази, уреазу, лецитінази. Виділяє в середовище аміак, не виділяє сірководень і індол. Гідролізує крохмаль, желатину. Відновлює метиленовий синій, нітрати й нітроти. Дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера. Здатний до утворення ацетилметилкарбінолу на середовищі Кларка. Ферментує без утворення газу глюкозу, сахарозу, галактозу, сорбіт і гліцерин. Слабкіше ферментує манніт і мальтозу. Не ферментує лактозу, ксилозу, арабінозу, дульцит. Ознаки штаму стійкі. Штам непатогенний для теплокровних тварин.

Умови зберігання. Штам зберігається й підтримується методом періодичних пересівів (не рідше 2 разів у півроку) на агаризованому середовищі Менкінної з гліцерофосфатом кальцію наступного складу (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,3; NaCl - 0,3; KCl - 0,3;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,001;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,001;  $\text{CaCO}_3$  - 5,0; глюкоза - 10,0; гліцерофосфат - 1,0 у перерахуванні на  $\text{PO}_4^{3-}$ ; pH=6,91-7,1; агар-агар - 15,0. Перед стерилізацією середовище розливають по 100мл у колби Ерленмейєра об'ємом 0,75л. Режим стерилізації: 20 хв, при 0,5 атм.

Здатність штаму мобілізувати фосфор із його органічних і неорганічних сполук підтверджується прикладом 1.

Приклад 1. Готують посівний матеріал, вирощуючи бактерії на агаризованому середовищі Менкінної з гліцерофосфатом протягом 24 год. Потім 1мл суспензії бацил, приготовленої за стандартом мутності 5 одиниць, засівають колби з рідким середовищем Менкінної, склад якого приведений вище. Бактерії *Bacillus subtilis* 5-RK вирощують в умовах періодичного культивування (240 об/хв.) протягом 3-х діб при  $28^\circ\text{C}$ . Після вирощування в культуральній рідині визначають чисельність бактерій (табл. 1-2). У фугаг культуральної рідини - концентрацію  $\text{PO}_4^{3-}$  визначають

колориметричне з використанням молібденово-кислого амонію та аскорбінової кислоти в якості відновлювача (табл. 1-2). Вміст фосфат-іонів, що накопичуються штамом бактерій обчислюють по різниці його концентрації у експериментальному й контрольному (стерильному) варіантах.

Таблиця 1

Ростова активність *Bacillus subtilis* 5-RK і накопичення  $\text{PO}_4^{3-}$  в культуральному середовищі з гліцерофосфатом

Штам	Кількість життєздатних клітин в 1мл середовища		Накопичення $\text{PO}_4^{3-}$ (мг/л) в культуральному середовищі, що містить гліцерофосфат	pH	
	початкова	кінцева		почат.	кінцев.
<i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(2,9 \pm 0,3) \cdot 10^8$	280,0	7,0	5,6
	$(4,1 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(3,8 \pm 0,2) \cdot 10^8$	300,0	7,0	5,5

Примітка: час культивування 3 доби.

Таблиця 2

Ростова активність *Bacillus subtilis* 5-RK і накопичення  $\text{PO}_4^{3-}$  в культуральному середовищі з фітином

Штам	Кількість життєздатних клітин в 1мл середовища		Накопичення $\text{PO}_4^{3-}$ в культуральному середовищі, що містить фітин (мг/л)	pH	
	початкова	кінцева		почат.	кінцев.
<i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	$(2,7 \pm 0,5) \cdot 10^5$	$(8,9 \pm 0,7) \cdot 10^7$	46,0	7,0	6,2
	$(3,0 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(9,1 \pm 0,5) \cdot 10^7$	61,0	7,0	6,1

Примітка: час культивування 3 доби.

Дані таблиці 1-2 вказують на високу активність мобілізації  $\text{PO}_4^{3-}$  запропонованим штамом з органічних фосфоровмісних сполук, що є властиві для чорноземних ґрунтів.

Порівняльні активності мінералізації фосфатів різних представників роду *Bacillus* (табл.3) показали, що найбільш високою активністю характеризувався штам *Bacillus subtilis* 5-RK. Цей штам за ознаками мобілізації фосфату з органічних сполук гліцерофосфату й фітину перевершує інші відомі мікроорганізми.

Таблиця 3

Накопичення  $\text{PO}_4^{3-}$  різними штамми бацил в культуральній рідині в середовищі с гліцерофосфатом

Мікроорганізми	Накопичення $\text{PO}_4^{3-}$ в культуральному середовищі за 3 доби (мг/л)	pH	
		почат.	кінцев.
<i>B.megaterium</i> 9	204,0	6,8	6,3
<i>B.subtilis</i> 15	219,0	7,0	6,3
<i>B.cereus</i> var.myc.6	120,0	6,9	6,0
<i>B.pumilus</i> 3	194,0	7,1	6,3
<i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	280,0	7,0	5,6

Ефективність мобілізації фосфату з важкорозчинних неорганічних сполук підтверджується прикладом 2.

Приклад 2. Готують середовище Муромцева наступного складу (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,5;  $\text{MgSO}_4$  - 0,2;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  - 0,2;  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  - 2,0; глюкоза - 10,0; pH=6,5-7,0; дріжджовий екстракт - 2мл.

Середовище розливають по 100мл у колби Ерленмейера, об'ємом 0,75л та стерилізують протягом 20 хв. при 0,5 атм. Посівний матеріал готують на агаризованому середовищі Муромцева з  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  протягом 24 год. 1мл водної суспензії бацил, приготовленої за стандартом мутності 5 одиниць, вносять в 100мл стерильного середовища Муромцева в колби Ерленмейера. Бактерії *Bacillus subtilis* 5-RK вирощують при перемішуванні (240 об/хв.) протягом 3 діб при 28°C, Вміст  $\text{PO}_4^{3-}$  у фугаті культуральної рідини визначають як показано вище. Результати досліджень наведені у табл.4. Приведені результати свідчать, що запропонований штам бацил активно мобілізує фосфати з неорганічної важкорозчинної сполуки трикальційфосфату, властивого різним типам ґрунтів.

Таблиця 4

Ростова активність *Bacillus subtilis* 5-RK і накопичення  $\text{PO}_4^{3-}$  у культуральному середовищі з трикальційфосфатом

Штам	Кількість життєздатних клітин в 1мл середовища		Накопичення $\text{PO}_4^{3-}$ (мг/л) у культуральному середовищі	pH	
	початкова	кінцева		почат.	кінцев.
<i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(1,8 \pm 0,03) \cdot 10^8$	118,0	6,4	5,2
	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(2,1 \pm 0,1) \cdot 10^8$	150,0	6,4	5,1

Примітка; час культивування 3 доби.

Перспективність використання штаму *Bacillus subtilis* 5-RK для пригнічення фітопатогенних грибів і бактерій підтверджується прикладом 3.

Приклад 3. Бактерії вирощували у середовищі Менкіної з гліцерофосфатом або фітином, або на середовищі Муромцева з трикальційфосфатом протягом 3-х діб. Отриману культуральну рідину висівали петлею у центрі чашки Петрі з агаризованим середовищем Гаузе-2 (для вивчення активності у відношенні до бактеріальних тест-культур) і на картопляний агар (для дослідження антагоністичної активності у відношенні тест-культур фітопатогенних грибів). Посіви інкубували при 28°C протягом 48-72 годин.

Потім до культури, що виросла штрихом підсівали тест-мікроорганізми, якими були фітопатогенні гриби і фітопатогенні бактерії (з суспензії добових культур фітопатогенних бактерій і суспензії грибних спор у фізіологічному розчині, що містила  $5 \times 10^8$  кл/мл). Чашки з тест-культурами бактерій інкубували у термостаті при 37°C протягом 24 год., з тест-культурами грибів - при 28°C протягом 5-7 діб. Про ефективність пригнічення фітопатогенів бактеріями *Bacillus subtilis* 5-RK судили за розміром зон інгібування росту тест-культур. Контролем росту тест-культур було паралельне вирощування їх на чашках з агаризованим середовищем Гаузе-2 та картопляним агаром без *Bacillus subtilis* 5-RK. Отримані результати, що представлені у табл.5-б, свідчать про високу антагоністичну активність *Bacillus subtilis* 5 по відношенню до фітопатогенних бактерій і грибів.

Таблиця 5

Антагоністична активність *Bacillus subtilis* 5-RK по відношенню до фітопатогенних бактерій

Тест-культури	Зони пригнічення тест-культур, мм
<i>Pseudomonas syringae</i> pv.syringae	19,0 $\pm$ 2,1
<i>P.fluorescens</i>	16,0 $\pm$ 0,2
<i>Ervin iacarotovora</i> subs. Caratovora	16,0 $\pm$ 0,8
<i>Xantomonas campestris</i> pv.campestris	31,6 $\pm$ 2,1
<i>Clavibacter michiganense</i>	24,6 $\pm$ 3,0

Таблиця 6

Антагоністична активність *Bacillus subtilis* 5-RK по відношенню до фітопатогенних грибів

Тест-культури	Зони пригнічення тест-культур, мм
<i>Fusarium gram in earum</i>	22,8 $\pm$ 0,5
<i>F.oxysporum</i>	9,2 $\pm$ 1,0
<i>F. solani</i>	18,6 $\pm$ 0,9
<i>F.sambicinum</i>	15,4 $\pm$ 1,1
<i>F.culmomm</i>	13,8 $\pm$ 1,2
<i>Biopolaris sorokiniana</i>	26,5 $\pm$ 1,5
<i>Alternaria alternata</i>	17,5 $\pm$ 1,4
<i>Gliocladium roseum</i>	9,8 $\pm$ 0,5

Запропонований штам *Bacillus subtilis* 5-RK характеризується помітним стимулюючим

впливом на енергію проростання та схожість ряду овочевих і злакових культур, що підтверджується прикладом 4.

Приклад 4. Вплив *Bacillus subtilis* 5-RK на енергію проростання і схожість насіння різних культур оцінювали згідно ГОСТ 12038-84. Для цього отримували суспензію цих бактерій в рідких поживних середовищах в умовах, що описані у прикладах 1-2. Насіння огірків, томатів, буряка, пшениці, капусти обробляли суспензією клітин *Bacillus subtilis* 5-RK (3-х добова культуральна рідина з клітинами бацил після їх вирощування у рідких середовищах Мєнкіної й Муромцева) протягом 1 год., потім насіння розкладали на фільтрувальний папір у кювети або чашки Петрі. Папір зволожували стерильною водопровідною водою. Інкубування насіння проводили у темряві при 25-30°C згідно ГОСТ 12038-84. Контролем служило насіння, оброблене стерильною водопровідною водою. Результати досліджень приведені у табл.7.

Таблиця 7

Енергія проростання і схожість насіння рослин після їх бактеризації *Bacillus subtilis* 5-RK

Варіанти	Енергія проростання	Схожість насіння
	% від контролю	% від контролю
Буряк сорту Ялтушківський		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	132,2	144,1
Томати сорту Світанок		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	129,0	127,6
Томати сорту Перемога		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	172,4	162,5
Огірки сорту Ніжинські		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	117,6	124,1
Капуста сорту Бордо		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	125,5	134,5
Квасоля сорту Мавка		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	111,4	106,5
Озима пшениця сорту Веселка		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	108,7	115,0
Озима пшениця сорту Гостіанум		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	119,0	138,1
Насіння гарбуза сорту Стофунтова		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	115,3	115,3
Насіння трави сорту Ліліпут		
Контроль	100,0	100,0
Бактеризація <i>Bacillus subtilis</i> 5-RK	113,0	118,0

Дані табл.7 показують, що культуральна рідина запропонованого штаму бацил значно підвищує енергію проростання й схожість насіння.