

**І.В. Драговоз, Л.А. Пасічник, Д.А. Жукова, С.В. Лапа,
Л.О. Крючкова, Л.В. Авдєєва**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, ДОЗ680, Україна*

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* – ПЕРСПЕКТИВНИХ АГЕНТІВ БІОКОНТРОЛЮ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР

*Досліджено антагоністичну активність штамів *Bacillus amyloliquefaciens* УКМ В-7243 та УКМ В-7404 щодо бактеріальних та грибних збудників хвороб зернових культур. Встановлено низький антагонізм штамів щодо досліджуваних збудників бактеріальних хвороб рослин. Антифунгальна активність досліджених штамів щодо збудників кореневих гнилей зернових культур проявлялася на середньому рівні. Показано високу біологічну ефективність бінарних композицій штамів бацил. Зроблено висновок, що в мікробних композиціях підсилювався фунгіцидний ефект, з одного боку, та фітостимулюючий – з іншого.*

*Ключові слова: *Bacillus amyloliquefaciens*, антагоністична активність, бактеріальні фітопатогени, фітопатогенні мікроміцети, біопрепарати, зернові культури.*

Широке розповсюдження грибних та бактеріальних хвороб сільськогосподарських культур зумовлює суттєве зниження продуктивності та якості продукції рослинництва. Фітопатогенні гриби та бактерії знищують понад 20 % світового урожаю, а фітопатогенні мікроміцети є найнебезпечнішою групою інфекційних агентів щодо сільськогосподарських культур [6]. Враховуючи актуальність проблеми біологізації землеробства, розробка ефективних біопрепаратів для захисту сільськогосподарських рослин від інфекційних хвороб є важливою проблемою сьогодення. Основою бактеріальних препаратів для біоконтролю є переважно представники ризосферних мікроорганізмів, зокрема бактерії роду *Bacillus*, що проявляють високу антагоністичну активність щодо фітопатогенних мікроорганізмів за рахунок синтезу екзометаболітів різної хімічної природи: антибіотиків, бактеріальних токсинів, летких органічних сполук та біосурфактантів [8, 11]. Окрім синтезу різних класів органічних сполук, антагонізм між ризосферними та фітопатогенними мікроорганізмами може бути обумовлений дією позаклітинних літичних ферментів, зокрема, хітиназ та β -1,3-глюканаз, що здатні руйнувати клітинні стінки грибів [9]. Тому, пошук штамів бацил з високою антагоністичною активністю щодо збудників хвороб сільськогосподарських рослин, зокрема зернових культур, є актуальним завданням.

У зв'язку з цим метою роботи було дослідити антагоністичну активність штамів *Bacillus amyloliquefaciens* УКМ В-7243 та УКМ В-7404 щодо збудників бактеріальних та грибних хвороб зернових культур.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були штами *B. amyloliquefaciens* УКМ В-7243 та УКМ В-7404 з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного (ІМВ) НАН України. У якості еталонного штаму використовували *B. amyloliquefaciens* УКМ В-7100, що є основою препарату фітодоктор.

Антагоністичні властивості штамів бацил щодо фітопатогенних бактерій досліджували методом радіальних штрихів [2]. У роботі використовували колекційні тест-культури та високо агресивні штами фітопатогенних бактерій із колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України: *Pectobacterium carotovorum* УКМ В-1095⁺, *Pseudomonas fluorescens* 8573, *Pseudomonas syringae* УКМ В-1027⁺ NCPPB 281, *Xantomonas campestris* УКМ В-1049, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 10₂, *Rhizobium vitis* УКМ В-1000, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (штами 9400, УКМ В-1013, УКМ В-1014, УКМ В-1011, 948), *P. syringae* pv. *coronafaciens* (штами УКМ В-1154, УКМ В-1111).

Антагоністичні властивості досліджених штамів бацил щодо фітопатогенних мікроміцетів визначали методом подвійної культури в чашках Петрі на картопляному агарі. Культури бацил висівали у центр чашки колом діаметром 0,5 см та культивували впродовж доби при 28 °С. Після інкубації підсівали з краю чашки блочним способом тест-культури фітопатоген-

них мікроміцетів та інкубували при температурі 24 °С [5]. Зони затримки росту враховували через 7 днів культивування. Тест-культурами слугували фітопатогенні мікроміцети, виділені з коренів, насіння озимої пшениці та рису, а саме *Fusarium graminearum* 9G, *Cochliobolus sativus* 10Z, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* 10Z, *Magnaporthe grisea* 11K.

Рівень антагоністичної активності бацил оцінювали за зонами затримки росту фітопатогенних бактерій та мікроміцетів і виражали в міліметрах. Якщо зони затримки росту фітопатогенів були відсутні або ≤ 1 мм – досліджені штами бацил вважали неактивними, 2–10 мм – з низькою антагоністичною активністю, 11–20 мм середньою, більше 20 мм – високою антагоністичною активністю.

Визначення біологічної ефективності бацил та їх композицій щодо збудників кореневих гнилей пшениці проводили на жорсткому інфекційному фоні в модельних патосистемах. Насіння проростків озимої пшениці сорту Альбатрос одеський обробляли суспензією 7 добових культур бацил, що містила 1×10^8 КУО/мл з розрахунку 0,1 мл на 100 г насіння. Досліджували антагоністичну та рістстимулювальну активності суспензій спор як окремих культур *B. amyloliquefaciens* УКМ В-7243 і УКМ В-7404, так і їх композицій у співвідношенні 1:1, 2:1 та 1:2. Контролями слугували стерильна вода та хімічний протруйник ламардор 400 FS (0,15 л/т). Біологічну ефективність дослідних варіантів оцінювали за ступенем ураження проростків (0–4 бали), а також за ваговими параметрами наростання вегетативної маси надземної частини і коренів [4].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартного пакету програм Microsoft Office.

Результати та їх обговорення. За результатами попередніх досліджень серед 23 штамів бацил із робочої колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології було відібрано штами *B. amyloliquefaciens* УКМ В-7243 та УКМ В-7404, перспективних у складі біопрепаратів для рослинництва [10]. Проте, подальша оцінка антагоністичної активності досліджених штамів щодо тест-культур фітопатогенних бактерій показала, що обидва штами проявляли досить низьку активність щодо бактерій роду *Pseudomonas* (зони затримки росту 3,6 – 12,0 мм), за виключенням *P. carotovorum* УКМ В-1095*, середню активність щодо *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 10₂, *Rhizobium vitis* УКМ В-1000 і були високо активними лише по відношенню щодо *X. campestris* УКМ В-1049 (табл. 1). Таким чином, антагоністична активність досліджених штамів бацил щодо переважної кількості використаних тест-культур фітопатогенних бактерій була низькою і не перевищувала рівень антагонізму еталонного штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-7100, що є основою препарату фітодоктор.

Таблиця 1
Антагоністична активність штамів *B. amyloliquefaciens* щодо колекційних тест-культур фітопатогенних бактерій зернових культур

Тест-культури	Зони затримки росту фітопатогенних бактерій, мм		
	УКМ В-7100 (еталон)	УКМ В-7404	УКМ В-7243
<i>P.syringae</i> УКМ В-1027* НСРРВ 281	10,3±0,5	3,6±0,5	7,3±1,2
<i>P.fluorescens</i> 8573	13,0±2,6	6,6±1,2	12,0±1,5
<i>P. carotovorum</i> УКМ В-1095*	24,0±2,6	13,0±1,0	13,3±1,5
<i>X.campestris</i> УКМ В- 049	24,5±2,5	22,0±0,6	15,0±0,6
<i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 10 ₂	15,0±1,0	13,0±1,0	16,0±2,1
<i>Rhizobium vitis</i> УКМ В - 1000	18,3±1,2	10,6±1,5	11,6±2,5

Усі штами бацил також проявляли низьку антагоністичну активність і щодо високо агресивних штамів бактерій роду *Pseudomonas* (табл. 2), які є одними з найбільш розповсюджених збудників бактеріальних хвороб рослин та мають високий рівень стійкості як до хімічних, так і до біологічних препаратів для захисту рослин [1].

У той же час, у подальших дослідженнях відмічено високу антагоністичну активність *B. amyloliquefaciens* щодо фітопатогенних мікроміцетів, а саме – збудників кореневих гнилей, що є найпоширенішими агентами у структурі хвороб зернових культур. Серед них розрізняють фузаріози (гриби роду *Fusarium* – сумчаста стадія *Gibberella*), що спричиняють побуріння кореневої системи та основи стебла, церкоспорельоз (збудники *Helgardia herpotrichoides* і *H. aciformis* – сумчасті стадії *Oculimacula yallundae* і *O.aciformis*), офіобольоз (збудник *G. graminis* var. *tritici*), звичайна, або гельмінтоспоріозна, коренева гниль (збудник *Bipolaris*

sorokiniana – сумчаста стадія *Cochliobolus sativus*). Встановлено, що найактивнішим антагоністом щодо цих збудників хвороб виявився штамп *B. amyloliquefaciens* УКМ В–7404 (табл. 3). Зокрема, слід відзначити його високий рівень антагоністичної дії щодо *F. graminearum* 9G, що домінує серед збудників кореневих гнилей пшениці [3].

Таблиця 2

Антагоністична активність штамів *B. amyloliquefaciens* щодо високо агресивних фітопатогенних бактерій, виділених із зернових культур

Штами фітопатогенних бактерій	Зони затримки росту фітопатогенних бактерій, мм		
	УКМ В-7100 (еталон)	УКМ В-7404	УКМ В-7243
<i>P.syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9400	3,0±0,0	2,7±0,6	1,0±0,0
<i>P.syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1013	5,0±1,4	5,0±1,0	3,0±0,0
<i>P.syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1014	11,0±0,0	8,3±2,1	6,0±1,0
<i>P.syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	3,5±0,7	2,3±0,6	2,0±0,0
<i>P.syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 948	5,0±0,0	4,0±1,0	3,3±1,5
<i>P.syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> УКМ В-1154	6,0±0,0	5,7±1,2	6,0±1,0
<i>P.syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> УКМ В–1111	5,0±0,0	4,3±0,6	3,3±0,6

Таблиця 3

Антагоністична активність штамів *B. amyloliquefaciens* щодо фітопатогенних мікроміцетів, виділених із зернових культур

Штами фітопатогенних мікроміцетів	Зони затримки росту фітопатогенних мікроміцетів, мм		
	УКМ В-7100 (еталон)	УКМ В-7404	УКМ В-7243
<i>F.graminearum</i> 9G	2,7±0,2	11,0±0,6	2,5±0,2
<i>C. sativus</i> 10Z	13,3±0,7	14,0±0,7	8,0±0,4
<i>G.graminis</i> var. <i>tritici</i> 10Z	11,5±0,6	7,5±0,5	9,5±0,5
<i>M. grisea</i> 11K	13,03±0,7	13,5±0,7	10,0±0,5

З огляду на порівняно високий рівень антифунгальної активності досліджених штамів бацил, зокрема штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В–7404, надалі було доцільним перевірити рівень його біологічної ефективності в модельній системі на фоні штучного зараження рослин збудниками кореневих гнилей. В умовах вегетаційного дослідження на жорсткому інфекційному фоні досліджені штами бацил, взяті окремо, проявляли досить низьку біологічну ефективність, що достовірно не відрізнялась від контролю (табл. 4). Рістстимулювальна активність штамів в умовах жорсткого інфекційного фону, створеного як *F. graminearum* 9G, так і *C. sativus* 10Z, також проявлялась на рівні контролю чи, навіть, дещо пригнічувалася (зокрема, пригнічення ростової активності озимої пшениці за дії штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В–7243 на фоні зараження *F. graminearum* 9G).

У той же час за умов *in vivo* композиції штамів бацил (*B. amyloliquefaciens* УКМ В-7243 + УКМ В-7404) у співвідношенні 1:1, 1:2, 2:1 характеризувалися більш вираженою, порівняно з дією окремих штамів, рістстимулювальною активністю та фунгіцидною дією щодо *F. graminearum* 9 і *C. sativus* 10Z (табл. 4). Такий біологічний ефект, ймовірно, зумовлений кількома причинами. По-перше, безпосереднім біоцидним впливом екзометаболітів (антибіотичних сполук та екстрацелюлярних ферментів) на фітопатогени, по-друге, дією фітогормонів, що мають стимулюючий вплив на рослину. Результатом подвійної дії стало підвищення ростових параметрів та зниження рівня захворюваності у варіантах допосівної обробки насіння бінарними композиціями штамів.

На нашу думку, висока біологічна ефективність мікробних композицій може бути також результатом адитивного ефекту, пов'язаного із взаємодією екзометаболітів обох штамів. Так, за даними літератури, позитивний вплив екзометаболітів гормональної природи на рослину підсилюється речовинами негормональної природи, зокрема, вітамінами К та групи В, синтез яких притаманний бактеріям роду *Bacillus* [12, 13]. З іншого боку, адитивний вплив, обумовлений взаємодією екзометаболітів обох штамів, ймовірно, пов'язаний з підсиленням синтезу штамом *B. amyloliquefaciens* УКМ В–7404 антифунгальних сполук за наявності фітогормонів, що синтезуються штамом *B. amyloliquefaciens* УКМ В–7243 [7]. Відомо також, що вітаміни та фенольні сполуки можуть позитивно впливати на ріст, розвиток та морфогенетичні процеси рослини, підсилюючи ефективність дії гормонів-стимуляторів, що дозволяє розглядати

їх як клас регуляторів негормональної природи з синергічним типом дії [3]. Отже, отримані результати узгоджуються з даними літератури щодо можливої участі вищенаведених сполук у прояві біологічної активності досліджених штамів бацил.

Таблиця 4

Ступінь ураження та ростова активність проростків озимої пшениці сорту Альбатрос одеський на штучному інфекційному фоні за допосівної обробки насіння досліджуваними штамми *B. amyloliquefaciens*

Фон Варіанти обробки	Без зараження		Інфекційний фон						
	Маса, мг		Розвиток хвороби, бал (0-4)	<i>F. graminearum</i> 9G		<i>C. sativus</i> 10Z		Маса, мг	
	Корені	Надземна частина		Корені	Надземна частина	Розвиток хвороби, бал (0-4)	Корені	Надземна частина	
			Корені						Надземна частина
Контроль	10,3±0,7	15,3±1,2	2,9±0,7	6,9±1,0	14,8±0,5	3,4±0,4	5,0±0,6	13,0±0,9	
Ламардор (0,15 л/т)	10,1±0,6	18,7±0,9	0,6±0,2	8,3±0,7	15,5±1,2	2,2±0,3	6,2±0,4	15,4±0,5	
<i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-7100	8,8±0,5	17,5±0,7	2,7±0,5	7,2±0,5	14,1±1,1	3,1±0,5	5,3±0,7	14,9±1,2	
<i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-7243	8,4±0,5	16,6±0,7	2,5±0,3	5,7±0,6	11,7±0,7	3,0±0,4	5,0±0,5	14,2±0,5	
<i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-7404	1,3±0,3	18,5±1,3	2,6±0,4	6,7±1,1	14,8±0,6	3,3±0,4	6,3±0,8	15,1±0,7	
<i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-7243 + <i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-7404(1:1)	9,0±0,6	16,4±0,5	2,2±0,5	9,5±1,0	15,3±0,9	3,3±0,2	6,0±0,5	15,4±1,1	
<i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-7243 + <i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-7404(1:2)	9,7±1,1	18,2±0,8	2,0±0,3	7,8±0,6	15,1±1,2	1,5±0,6	6,6±0,9	15,6±0,9	
<i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-7243 + <i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-7404(2:1)	9,7±0,7	19,9±0,8	1,3±0,2	10,2±0,9	18,5±0,8	2,7±0,5	5,5±0,4	14,3±0,6	

За результатами оцінки антагоністичної активності досліджуваних штамів бацил було показано можливість та доцільність використання композиції штамів *B. amyloliquefaciens* УКМ В-7404 та УКМ В-7243 у співвідношенні 1:2 або 2:1 при створенні біопрепарату для пригнічення розвитку хвороб зернових культур, збудниками яких є *F. graminearum* і *C. sativus* відповідно. В модельній системі на жорсткому інфекційному фоні антифунгальна та рістстимульовальна активність проявлялась більш виражено за умов сумісного застосування досліджуваних штамів бацил, що, в свою чергу, позитивно впливало як на зниження ступеня ураженості рослин грибними хворобами, так і на загальну ростову активність рослин озимої пшениці.

**И.В. Драговоз, Л.А. Пасичник, Д.А. Жукова, С.В. Лапа,
Л.А. Крючкова, Л.В. Авдеева**

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *BACILLUS* *AMYLOLIQUEFACIENS* – ПЕРСПЕКТИВНЫХ АГЕНТОВ БИОКОНТРОЛЯ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

Резюме

В работе исследована антагонистическая активность штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* УКМ В-7243 та УКМ В-7404 в отношении бактериальных и грибных возбудителей заболеваний зерновых

культур. Установлен низкий уровень антагонизма исследованных штаммов в отношении возбудителей бактериальных болезней зерновых. Антифунгальная активность исследуемых штаммов относительно возбудителей корневых гнилей озимой пшеницы проявлялась на среднем уровне. Показана высокая биологическая эффективность бинарных композиций исследуемых штаммов за счет усиления фунгицидного эффекта, с одной стороны, и фитостимулирующей активности – с другой.

Ключевые слова: *Bacillus amyloliquefaciens*, антагонистическая активность, бактериальные фитопатогены, фитопатогенные микромицеты, биопрепараты.

*I.V. Dragovoz, L.A. Pasichnyk, D.A. Zhukova, S.V. Lapa,
L.O. Kriuchkova, L.V. Avdeeva*

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* STRAINS – POTENTIAL BIOCONTROL AGENTS FOR CEREAL CROPS

Summary

The antagonistic activity of strains *Bacillus amyloliquefaciens* УКМ В-7243 and УКМ В-7404 against bacterial and fungal agents of winter wheat diseases was demonstrated. Low antagonistic level against bacterial agents of plant diseases was shown. Antifungal activity of strains against agents of winter wheat was on the low level. High biological efficiency was shown under binary compositions of the studied strains. It was concluded that the enhancing of fungicide and growth-stimulation effects in binary compositions were found.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у w o r d s: *Bacillus amyloliquefaciens*, antagonistic activity, bacterial phytopathogens, phytopathogenic micromycetes, biopreparations.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *Dragovoz I.V.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Буценко Л.М., Пасичник Л.А., Ходос С.Ф., Карева І.О. Антибактеріальна та мутагенна дія деяких фунгіцидів на *Pseudomonas syringae* pv. *artrofaciens* // Агроекологічний журн. – 2010. – № 4. – С. 71–79.
2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Высш. шк., 1986. – 448 с.
3. Кефели В.И. Витамины и некоторые другие представители негормональных регуляторов роста растений (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 1981. – 17, вып. 1. – С. 5–23.
4. Крючкова Л.О. Гриби роду *Fusarium* – збудники корневих гнилей озимі пшениці // Захист і карантин рослин. – 2000. – 46. – С. 86–91.
5. Крючкова Л.О. Хвороби озимі пшениці, які спричиняються некротрофними грибними патогенами, та методи їх діагностики: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – К., 2007. – 43 с.
6. Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л. Как растения защищаются от болезней. – М.: Наука, 1985. – 192 с.
7. Bashan Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture // Biotechnology advances. – 16. – 4. – 1998. – P. 729–770.
8. Compant S. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – 71. – P.4951-4959.
9. Haas D., Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads // Nat. Rev. Microbiol. – 2005. – 3. – P. 307–319.
10. Kriuchkova L., Dragovoz I., Zhukova D., Lapa S., Avdeeva L. Suppression of wheat diseases by new *Bacillus* strain // Защита растений – проблемы и перспективы: Материалы докладов Международного симпозиума (30–31 октября 2012). – Кишинев, Молдова, 2012. – С. 295–299.
11. Moshafi M., Foroontanfar H., Ameri A., Shakibaie M., Dehghan-Noudeh G., Razavi M. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. strain FAS1 isolated from soil // Pak. J. Pharm. Sci. – 2011. – 24(3). – P.269–275.
12. Sato T., Yamada Y., Ohtani Yu., Mitsui N., Murasawa H., Araki Sh. Production of menaquinone (Vitamin K₂)-7 by *Bacillus subtilis* // J. Bioscience and Bioengineering. – 2001. – 91, N 1. – P. 16–20.
13. Stahmann K. P., Revuelta J. L., Seulberger H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – 53. – P. 509–516.

Отримано 23.09.2013