

*Л.В. Авдєєва, М.А. Хархота, Г.В. Хархота*

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

## **ДЕСТРУКЦІЯ ПОЖНИВНИХ РОСЛИННИХ ЗАЛИШКІВ ШТАМАМИ *BACILLUS SUBTILIS* ІМВ В-7516 І *B. LICHENIFORMIS* ІМВ В-7515**

*Показано, що штами *Bacillus subtilis* ІМВ В-7516 та *B. licheniformis* ІМВ В-7515 здатні розкладати поживні рослинні залишки. В лабораторних умовах ефективність розкладання пшеничної соломи складала 15–30 %, соняшникового та кукурудзяного бадилля – 40–60 % відповідно. Встановлено роль пектиназної та ксиланазної активностей досліджуваних штамів у процесах деструкції рослинних залишків. Оптимальним джерелом азотного живлення для прояву гідролітичної активності штамів *B. subtilis* ІМВ В-7516 та *B. licheniformis* ІМВ В-7515 є нітрат амонію.*

*К л ю ч о в і с л о в а: поживні рослинні залишки, бактерії роду *Bacillus*, гідролітична активність.*

У результаті інтенсифікації сільського господарства щорічно зростає кількість рослинних залишків на полях, що призводить до ускладнення механічної обробки ґрунтів та широкого розповсюдження фітопатогенних мікроорганізмів [1]. Існує декілька шляхів вирішення цієї проблеми: вивезення рослинних залишків з полів з подальшим використанням у тваринництві, спалювання та використання мікроорганізмів-деструкторів рослинних залишків [1–3]. Останній спосіб найбільш ефективний, оскільки, одночасно з розкладанням целюлозовмісних залишків, відбувається відновлення родючості ґрунтів та зменшення кількості фітопатогенних мікроорганізмів. На даний час широко застосовуються біологічні препарати на основі грибів *Trichoderma* spp. [4–5]. Однак існують повідомлення про їх етіологічну роль у процесах імуносупресії макроорганізмів. Деякі штами *T. viride* викликають у людей алергічні захворювання верхніх дихальних шляхів та легеневі інфекції; штами *T. viride*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum* можуть бути збудниками перитонітів [6]. Тому актуальним є пошук безпечних мікроорганізмів-деструкторів рослинних залишків.

На відміну від грибів, бактерії роду *Bacillus*, у переважній більшості, непатогенні, стабільні при збереженні, технологічні у виробництві, що у поєднанні з високою гідролітичною активністю робить їх перспективними для створення біопрепаратів для деструкції поживних залишків [6].

Метою нашої роботи було дослідити ефективність деструкції поживних залишків монокультурами *Bacillus subtilis* ІМВ В-7516 або *B. licheniformis* ІМВ В-7515, а також при сумісному використанні цих штамів.

**Матеріали та методи.** Об'єктами дослідження слугували штами *Bacillus subtilis* ІМВ В-7516 та *B. licheniformis* ІМВ В-7515 з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. В якості тест-культур для дослідження антагоністичної

активності використовували штами фітопатогенних бактерій, отримані з колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України: *Pectobacterium carotovorum* УКМ В-1095<sup>†</sup>, *Pseudomonas fluorescens* 8573, *P. syringae* УКМ В-1027<sup>†</sup>, *Xantomonas campestris* 8003б, *Clavibacter michiganensis* 10<sub>2</sub>, *Agrobacterium tumefaciens* 8628.

При дослідженні ступеня деструкції рослинних залишків, досліджувані штами бацил культивували на мінеральному середовищі наступного складу (г/л):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 3,0;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 1,3 (чи еквівалентна кількість сечовини (за азотом));  $\text{MgSO}_4$  – 0,2, рН – 7,0. В якості джерел вуглецевого живлення було використано пшеничну солому, соняшник та кукурудзу (1,0 та 2,0 %). Після 12 діб культивування залишки целюлозовмісного субстрату відділяли від культуральної рідини, висушували та розраховували відсоток їх деструкції за формулою:  $A = (1 - (A_0 - A_1) / A_0) * 100$ , де  $A_0$  – початкова вага субстрату;  $A_1$  – кінцева вага субстрату.

На 1, 5, 8, 12 добу культивування в безклітинному центрифугаті суспензії штамів визначали пектиназну, ксиланазну та целюлозолітичну (КМЦ-азну (ендоглюканазну) та ФП-азну (здатність розкладати фільтрувальний папір)) активності. Для визначення КМЦ-азної активності використали метод визначення редукуючої здатності реакційної суміші з 0,5 % Na-КМЦ у 1/15 М фосфатному буфері. ФП-азну, пектиназну та ксиланазну активності визначали аналогічним шляхом з використанням фільтрувального паперу, пектину та ксилану в якості субстратів у реакційній суміші. Реакційна суміш складалася з 2 мл відповідного субстрату (40 мг) в буфері та 1 мл розчину ферменту (центрифугату культуральної рідини). Вміст редукуючих речовин визначали методом Шомоді-Нельсона [7]. Калібрувальний графік будували за глюкозою та ксилозою. Білок визначали за методом Бредфорда [7]. Калібрувальний графік будували за бичачим сиворотковим альбуміном.

Антагоністичну активність штамів бацил щодо фітопатогенних бактерій досліджували методом радіальних штрихів [8]. Штами досліджуваних бацил попередньо вирощували на картопляному агарі (КА) впродовж 18 годин при 28 °С. 18-годинну культуру бацил висівали в центр чашки з КА. Після 3 діб культивування при 28 °С підсівали радіальними штрихами суспензії ( $10^9$  КУО/мл) добових тест-культур фітопатогенних бактерій. Облік результатів проводили через 18–24 годин інкубування при 28 °С за зонами затримки росту досліджуваних культур і виражали в міліметрах. Якщо зони затримки росту фітопатогенних бактерій були відсутні або < 1 мм, досліджувані штами бацил вважали неактивними, 1–10 мм – слабо активними, 11–20 мм – середньо активними, більше 20 мм – високоактивними.

Для оцінки достовірності експериментальних даних, представлених у роботі, використовували параметричні критерії нормального розподілу, розраховуючи середнє арифметичне ( $X_{\text{ср}}$ ) і середнє квадратичне відхилення ( $S_{\text{ср}}$ ) за рівня значущості < 0,05.

**Результати та обговорення.** Дослідження ефективності штамів *Bacillus subtilis* ІМВ В-7516 і *Bacillus licheniformis* ІМВ В-7515 при розкладанні целюлозовмісних субстратів проводили з використанням пшеничної соломи, соняшникового та кукурудзяного бадилля, оскільки в Україні вони складають основну масу рослинних залишків на полях. Крім того, ці

субстрати відрізняються один від одного компонентним полісахаридним складом. А саме, до складу пшеничної соломи входять значні кількості целюлози та лігніну, соняшника – пектинових речовин, а кукурудзяного бадилля – геміцелюлози.

Встановлено, що штам *B. subtilis* IMB B-7516 здатний до деструкції пшеничної соломи на 16–17 %, соняшника – на 30 % незалежно від використаного джерела азотного живлення (сечовини чи нітрату амонію) (рис. 1). Деструкція кукурудзи ефективніше проходила за використання в якості джерела азоту  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (56 %), тоді як відповідний показник за додавання до середовища культивування сечовини дорівнював 37 %. Від внесеного у середовище джерела азоту залежала також активність деструкції штамом *B. licheniformis* IMB B-7515 пшеничної соломи та кукурудзяного бадилля. Таким чином, ефективність деструкції поживних залишків залежить не лише від їх типу та використаного штаму-деструктора, а й від джерела азотного живлення.

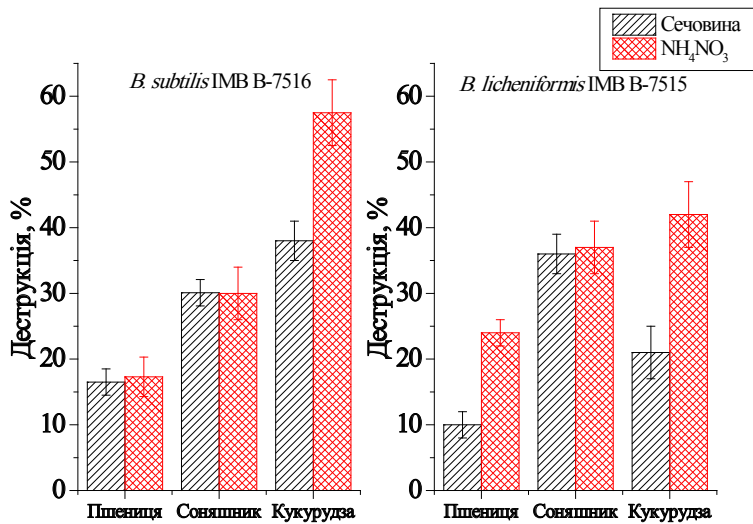


Рис. 1. Ступінь деструкції целюлозовмісних рослинних залишків штамми *B. subtilis* IMB B-7516 та *B. licheniformis* IMB B-7515 за наявності різних джерел азотного живлення

Отже, штам *B. licheniformis* IMB B-7515 більш ефективно, а саме на 24 та 37 %, розкладав пшеничну солому та соняшник, що на 30 та 19 % більше за аналогічні показники, отримані для штаму *B. subtilis* IMB B-7516.

Нами було висунуто припущення, що сумісне використання культур *B. subtilis* IMB B-7516 та *B. licheniformis* IMB B-7515 має інтенсифікувати процес деструкції рослинних залишків за рахунок синергізму їх целюлозолітичних ферментних систем. Однак виявилось, що композиція штамів у співвідношенні 1:1 порівняно з їх монокультурами більш ефективно діяла лише на пшеничну солому, ступінь розкладу якої становив 30 %, що на 43 та 20 % більше за відповідні показники монокультур (рис. 2).

Відомо, що на ефективність розщеплення рослинних решток значно впливає кількісний вміст останніх. Показано, що найбільш ефективно розкладання пшеничної соломи та соняшника штамом *B. subtilis* IMB B-7516 відбувалося при 2 % вмісті субстратів у середовищі культивування, кукурудзи – при 1 %. Штам *B. licheniformis* IMB B-7515 був більш

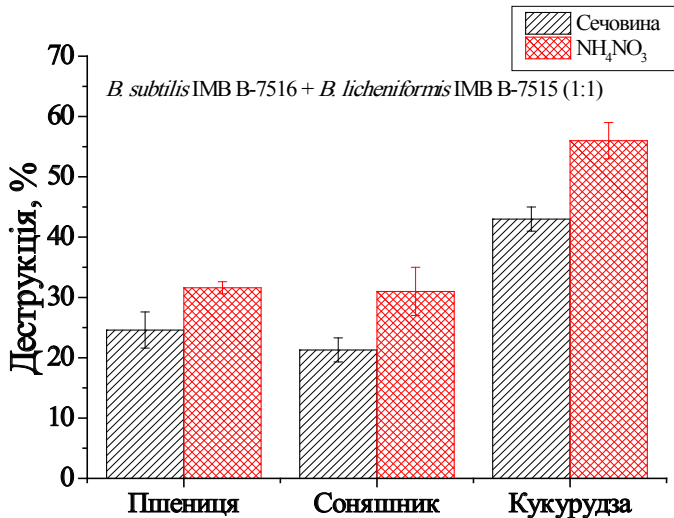


Рис. 2. Вплив композиції штамів *B. subtilis* IMB B-7516 та *B. licheniformis* IMB B-7515 (у співвідношенні 1:1) на деструкцію рослинних залишків

ефективним деструктором при 1 % вмісті пшеничної соломи та 2 % – соняшника (рис. 3). Кількісний вміст кукурудзи не впливав на ефективність її деструкції штамом *B. licheniformis* IMB B-7515.

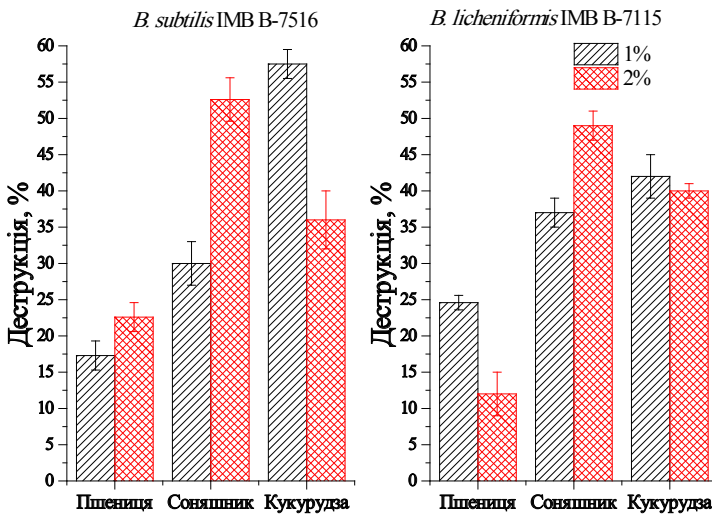


Рис. 3. Вплив концентрації рослинних залишків у середовищі культивування на їх деградацію целюлозолітичними штамми *B. subtilis* IMB B-7516 та *B. licheniformis* IMB B-7515

Отже, штами *B. subtilis* IMB B-7516 та *B. licheniformis* IMB B-7515 ефективно розщеплюють рослинні залишки, проте не зовсім зрозуміла різниця у ступені їх розкладання. Можливо, це пояснюється участю, окрім целюлозолітичної активності, й інших гідролітичних активностей.

Тому, нами було визначено рівень окремих активностей (КМЦ-азної, ФП-азної, ксилано- та пектолітичної) досліджуваних штамів у культуральній рідині при вирощуванні на середовищах з пшеничною соломою, кукурудзяним та соняшниковим бадиллям (рис. 4).

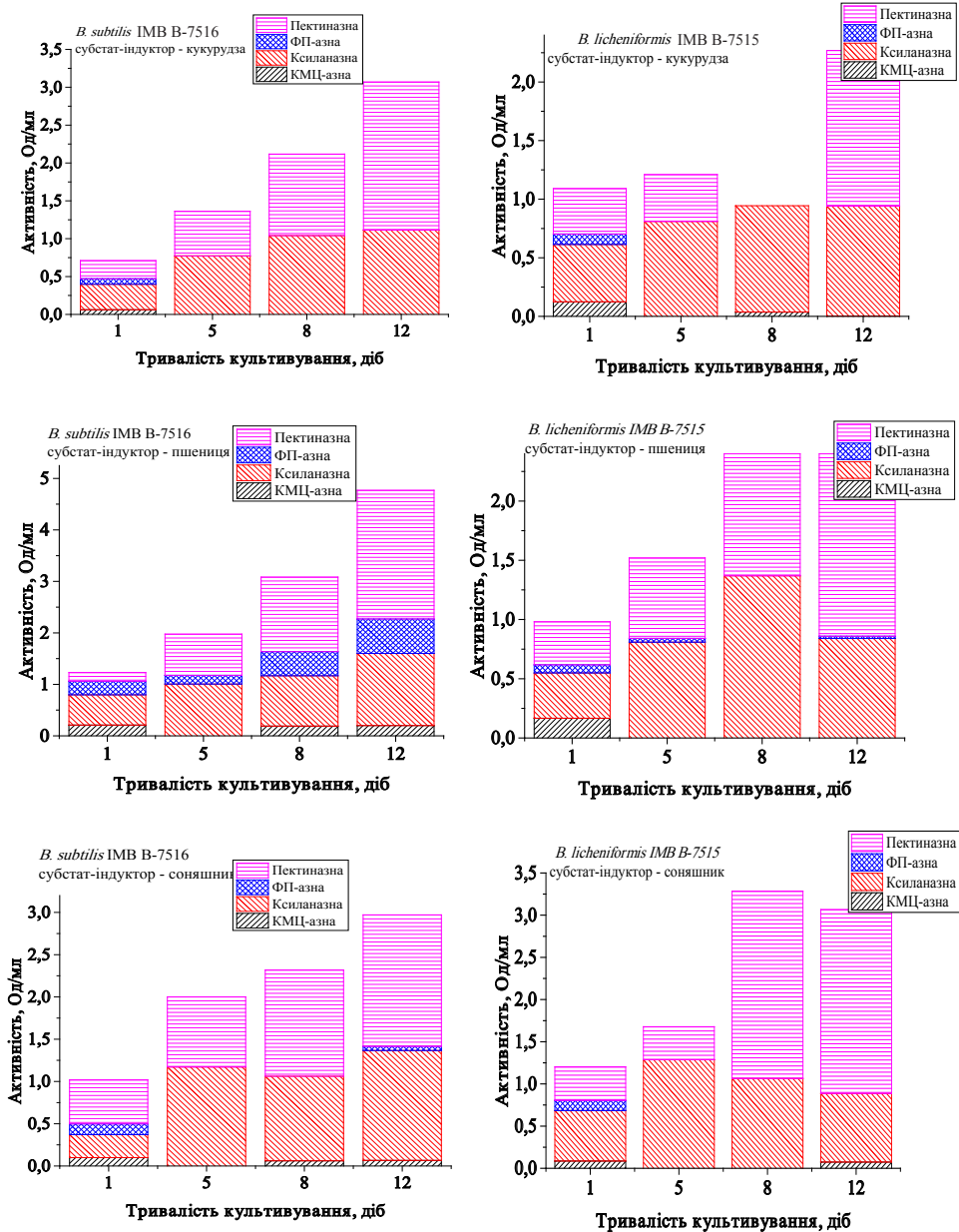


Рис. 4. Якісний та кількісний склад гідролітичного комплексу штамів *B. subtilis* IMB B-7516 та *B. licheniformis* IMB B-7515 при їх культивуванні на різних субстратах

Встановлено, що на першу добу культивування обох штамів бацил на всіх досліджуваних субстратах відмічалась наявність усіх типів активностей. У подальшому відмічалось зменшення рівня целюлозолітичної, та одночасне збільшення пектолітичної активності, за незмінного рівня ксиланолітичної. Виключення становив варіант досліду, де штам *B. subtilis* IMB B-7516 культивувався на середовищі з пшеничною соломкою. У цьому випадку реєструвалося, поряд зі збільшенням пектолітичної, зростання ФП-азної активності культуральної рідини. Тобто, нами показано, що в деструкції рослинних залишків, окрім целюлозолітичної, беруть участь пектолітичні та ксиланолітичні активності.



Однак, за даними літератури відомо, що целюлази можуть виступати факторами патогенності фітопатогенних мікроорганізмів; з іншого боку є повідомлення, що целюлозолітична активність мікроорганізмів може значно підвищувати схожість та ростові параметри рослин. Встановлено, що обидва досліджувані штами бацил не чинили інгібуючого впливу на ріст тест-об'єктів рослин (табл. 1). Показники схожості насіння пшениці, вага надземної та підземної частин проростків у всіх дослідних групах майже не відрізнялися від контролю (вода), що свідчить про нешкідливість штамів *B. subtilis* IMB B-7516 та *B. licheniformis* IMB B-7515 для вищих рослин.

**Таблиця 1**

**Вплив целюлозолітичних штамів *B. subtilis* IMB B-7516 та *B. licheniformis* IMB B-7515 на морфометричні показники рослин**

| Розведення культуральної рідини | <i>B. subtilis</i> IMB B-7516 |                           |                           | <i>B. licheniformis</i> IMB B-7515 |                           |                           |
|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                                 | Схожість, %                   | Маса надземної частини, г | Маса підземної частини, г | Схожість, %                        | Маса надземної частини, г | Маса підземної частини, г |
| Контроль (вода)                 | 92±2                          | 0,1±0,003                 | 0,037±0,001               | 92±2                               | 0,1±0,003                 | 0,037±0,001               |
| Нативна                         | 90±1                          | 0,097±0,002               | 0,035±0,004               | 89±4                               | 0,096±0,004               | 0,034±0,001               |
| 1:50                            | 88±3                          | 0,098±0,004               | 0,037±0,002               | 90±3                               | 0,095±0,003               | 0,043±0,002               |
| 1:100                           | 91±2                          | 0,098±0,001               | 0,034±0,003               | 90±5                               | 0,102±0,003               | 0,037±0,004               |
| 1:200                           | 93±4                          | 0,099±0,003               | 0,038±0,004               | 93±4                               | 0,099±0,004               | 0,037±0,003               |

Для мікроорганізмів, котрі є основою для препаратів, що будуть використовуватись у сільському господарстві, бажаною є антагоністична активність до фітопатогенів. Отримані дані щодо антагоністичної активності досліджуваних штамів бацил наведені в табл. 2. Штам *B. licheniformis* IMB B-7515 характеризується низькою антагоністичною активністю щодо *Xanthomonas campestris* 800 та *Clavibacter michiganensis* 102, і зовсім не пригнічував ріст усіх інших тест-культур. У свою чергу, штам *B. subtilis* IMB B-7516 проявляв високу антагоністичну активність щодо *Agrobacterium tumefaciens* 9628 та *Pectobacterium carotovorum* 8928, середню активність щодо *Pseudomonas fluorescens* 8573, зони затримки росту яких становили 27 ± 2, 22 ± 2, та 16 ± 1 мм відповідно. Інші фітопатогени виявились не чутливими до даного штаму бацил.

Таким чином, ефективність деструкції рослинних залишків досліджуваними штамми *B. subtilis* IMB B-7516 та *B. licheniformis* IMB B-7515, не поступається відомим аналогам. Так, штам гриба *Chaetomium globosum* IMB F-100063, призначений для одержання комплексу целюлаз з метою розкладання рослинних решток та підвищення урожайності сільськогосподарських культур, здатний розкласти залишки на 31,5 % [9]. Однак

Таблиця 2

Антагоністична активність досліджуваних штамів бацил *B. subtilis* IMB B-7516 та *B. licheniformis* IMB B-7515 щодо колекційних штамів фітопатогенних мікроорганізмів

| №  | Тест-культура                          | Антагоністична активність, мм зон затримки росту |                                    |
|----|----------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------|
|    |                                        | <i>B. subtilis</i> IMB B-7516                    | <i>B. licheniformis</i> IMB B-7515 |
| 1. | <i>Xanthomonas campestris</i> 800      | 0                                                | 8±1                                |
| 2. | <i>Clavibacter michiganensis</i> 102   | 0                                                | 7±1                                |
| 3. | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 9628  | 27±2                                             | 0                                  |
| 4. | <i>Pseudomonas syringae</i> 9511       | 0                                                | 0                                  |
| 5. | <i>Pectobacterium carotovorum</i> 8928 | 22±2                                             | 0                                  |
| 6. | <i>Pseudomonas fluorescens</i> 8573    | 16±1                                             | 0                                  |

даний вид може викликати алергічні захворювання і не є повністю безпечним для людини. Порівняно зі штамми *Trichoderma* spp. та *C. globosum*, бацилярна культура більш стійка до несприятливих умов навколишнього середовища, що надає їй переваги у застосуванні.

Отримані нами результати з одночасної індукції целюлозо-, ксилано- та пектолітичної активностей у штамів *B. subtilis* IMB B-7516 та *B. licheniformis* IMB B-7515 при розкладанні ними рослинних залишків, до складу яких, окрім целюлози, входять й інші структурні компоненти (геміцелюлоза, пектин, лігнін), свідчать, що для ефективної деструкції останніх необхідна наявність множинної ферментативної активності у штамів-деструкторів. Крім того, не виключено наявність у досліджуваних штамів бацил целюлаз з ксиланазною активністю і навпаки [10, 11].

Встановлений факт прояву штамми *B. subtilis* IMB B-7516 та *B. licheniformis* IMB B-7515 антагоністичної активності щодо фітопатогенних бактерій дає підстави припустити, що використання їх композиції, в якості біопрепарату для утилізації поживних залишків, дозволить не лише зменшити на полях кількість целюлозовмісних субстратів, а й ареал існування фітопатогенів та безпосередньо впливати на видовий і кількісний склад останніх.

Отже, нами показано, що штами *B. subtilis* IMB B-7516 та *B. licheniformis* IMB B-7515 здатні до ефективного розкладу целюлозовмісних рослинних залишків та проявляють антагоністичну активність щодо фітопатогенних мікроорганізмів, що вказує на перспективність створення на їх основі біопрепарату для сільськогосподарського рослинництва.

**Л.В. Авдеева, М.А. Хархота, А.В. Хархота**

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного  
НАН України, ул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

**ДЕСТРУКЦИЯ ПОЖИВНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОСТАТКОВ ШТАММАМИ *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7516 И *B. LICHENIFORMIS* IMB B-7515**

## Р е з ю м е

Показано, что штаммы *Bacillus subtilis* IMB B-7516 и *B. licheniformis* IMB B-7515 способны разлагать пожнивные растительные остатки. В лабораторных условиях эффективность разложения пшеничной соломы составляла 15–30 %, подсолнечной и кукурузной ботвы – 40–60 % соответственно. Показана роль пектиназной и ксиланазной активностей исследуемых штаммов в процессах деструкции растительных остатков. Оптимальным источником азотного питания для проявления гидролитической активности штаммов *B. subtilis* IMB B-7516 и *B. licheniformis* IMB B-7515 является нитрат аммония.

К л ю ч е в ы е с л о в а: пожнивные остатки, бактерии рода *Bacillus*, гидролитическая активность.

**L.V. Avdeeva, M.A. Kharkhota, A.V. Kharkhota,**

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine*

### **THE DECOMPOSITION OF VARIOUS TYPES OF CROP RESIDUES BY STRAINS *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7516 AND *B. LICHENIFORMIS* IMB B-7515**

#### **S u m m a r y**

It is shown that *Bacillus subtilis* IMB B-7516 and *B. licheniformis* IMB B-7515 strains are capable to decomposing crop residues. The effectiveness of the wheat straw decomposition by both strains was 15–30 %, sunflower and corn stubble – 40–60 % under the laboratory conditions. It is shown the role of pectinase and xylanase activity of the studied strains in the processes of destruction of plant residues. Ammonium nitrate is the best source of nitrogen nutrition for the manifestation of hydrolytic activity by strains *Bacillus subtilis* IMB B-7516 and *Bacillus licheniformis* IMB B-7515.

К е y w o r d s: crop residues, *Bacillus* strain, hydrolytic activity.

1. Петров В.Б., Чеботарь В.К. Микробиологические препараты – базовый элемент современных интенсивных агротехнологий растениеводства // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 8. – С. 11–15.
2. Кувшинова Е.К., Денисенко В.В., Мажара А.В. Урожайность озимой пшеницы при комплексном применении биопрепарата Экстрасол и минеральных удобрений // Вестник аграрной науки Дона. – 2014. – Т. 3. – № 27.
3. Степанова Л.П. Экологические последствия сжигания сельскохозяйственных отходов на состояние плодородия пахотных почв // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2012. – Т. 35. – № 2.
4. Гелетуха Г.Г., Железная Т.А., Трибой А.В. Перспективы использования отходов сельского хозяйства для производства энергии в Украине // Промышленная теплотехника: Международный научно-прикладной журнал. – 2014. – Т. 36, – № 5. – С. 73–80.
5. Тарасов С.А., Шершинева О.М. Использование микробиологических препаратов для ускорения деструкции соломы // Вестник Курской ГСХА. – 2014. – № 6. – С. 41–45.



6. Тухбатова Р.И., Тазетдинова Д.И., Алимова Ф.К. Характеристика потенциально патогенных видов *Trichoderma*, выделенных на территории республики Татарстан. // Успехи медицинской микологии. – 2007. – Т. 10. – С. 31–33.
7. Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження // К.: Наук. думка. – 2010. – 439 с.
8. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Высшая школа, 1986. – 448 с.
9. Патент 95427 С12N 1/14, С12N 9/42. Природный штам гриба *chaetomium globosum* – продуцент комплексу целюлаз / Авторы: Надкерничный С.П., Копилов С.П., Скуловатов О.В. – Опубл.: 25.12.2014.
10. Júlio X. Heck; Plinho F. Hertz; Marco A.Z. Ayub. Cellulase and xylanase production by isolated amazon Bacillus strains using soybean industrial residue based solid state cultivation // Brazilian journal of microbiology. – 2002. – V. 33. – P. 213–218.
11. Balakrishnan H., Dutta-Choudhury M., Srinivasan M.C., Rele M.V. Cellulase-free xylanase production from alkalophilic *Bacillus* species // World journal of microbiology and biotechnology. – 1992. – V. 8. – P. 627–631.

Отримано 17.09.2015