

В результате испытаний установлена эффективность действия регулятора роста Оберег^{про} (действующее вещество – 1-метилциклопропен). Его использование замедляет процессы послеплодового дозревания плодов и вместе с тем содействует сохранению положительных физических и потребительских показателей их качества. Яблоки, обработанные данным препаратом, отличаются более продолжительным сроком хранения, менее склонны к поражению физиологическими расстройствами и микробиологическими гнилями. Остаточный эффект хранения их повышенный.

Ключевые слова: плоды яблони, препарат Оберег^{про}, 1-метилциклопропен, лежкость, болезни при хранении, качество.

Одержано редколегією 11.04.18

УДК 632.937

КОНТРОЛЬ ФІТОПАТОГЕННИХ ОРГАНІЗМІВ В АГРОЦЕНОЗАХ З ВИКОРИСТАННЯМ БАКТЕРІЙ РОДУ (Р.) *BACILLUS*

Т.І. ПАТИКА, доктор с.-г. наук, професор

Л.О. КРЮЧКОВА, доктор біол. наук, професор

М.В. ПАТИКА, доктор с.-г. наук, професор, член-кореспондент НААН України
Національний університет біоресурсів та природокористування України
(НУБіП), 03041, Київ, вул. Героїв оборони, 13,
e-mail: patykatatyana@gmail.com

*Розглянуто питання біоконтролю фітопатогенів за участю бактерій *B. subtilis* і *B. pumilus*, які здатні ініціювати природні механізми, впливати на склад ризосферних мікробних угруповань. Встановлено антагоністичну активність штамів В/1, В/16 по відношенню до збудників різних форм фузаріозу, плямистостей, корневих гнилей з індексом пригнічення мікроміцетів від 31 до 61 % і різними механізмами дії.*

Ключові слова: бактерії роду *Bacillus*, фітопатогени, антагонізм, інфекційний фон.

Природою закладені всі механізми управління найважливішими біосферними процесами – синтез мікроорганізмами біологічно активних речовин, які істотно впливають на фізіологічний стан рослин та їх імунітет, антагонізм певних мікроорганізмів до патогенів, спричинення епізоотій у фітофагів тощо [1]. Система біологічного контролю агроценозів відіграє провідну роль у вирішенні проблем, котрі виникають в результаті пестицидного навантаження. Концепція такого фітозахисту базується на класичних моделях біорегуляції, тобто використанні живих організмів або продуктів їх метаболізму проти живих компонентів агро-

ценозу, а також методів, спрямованих на управління, в першу чергу, природними (біотичними) факторами середовища, які здатні обмежувати чисельність і шкідливість організмів. Мова йде саме про управління та контроль за чисельністю видів фітопатогенів, шкідників, а не про їх повне знищення, оскільки так званий «шкідник» є насправді всього лиш одним із елементів середовища, котрий інтенсивно розмножується через порушення біологічної рівноваги. Сучасна концепція створення фітосанітарних технологій враховує основний спектр багатофакторної залежності в досягненні гарантованого захисту врожаю та екологічної безпеки [1, 2]. Пріоритетними стають підсилення природних механізмів гомеостазу триотрофної системи, спрямоване та кероване застосування біоагентів та екологічно вивірені інтегровані системи.

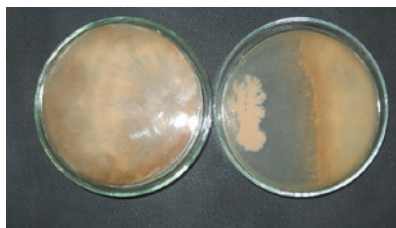
Біологічний контроль фітопатогенних організмів в агроценозах на сьогодні – це не лише специфічна сфера знань і атрибут біологізації агропромислового виробництва, але й найбільш екологічна, наукоємна складовою комплексного захисту. Для високоефективного застосування мікробіологічного методу фітозахисту необхідні різнопланові дослідження біологічних особливостей природних популяцій патогенів, а також чутливих до них цільових об'єктів. **Мета** цих досліджень – розробка та впровадження сучасних систем мікробіоконтролю шкідливих організмів за участю природних регуляторів, зокрема бактерій роду *Bacillus*, спрямованих на відновлення та підтримку біоценотичної рівноваги агроценозів. Використання в сучасному світі біотехнологічних препаратів на основі ендоспорових бактерій *Bacillus* ssp. не тільки підвищує стійкість рослин до фітопатогенів, продуктивність і якість продукції, а й сприяє оздоровленню агроценозів від шкідливої дії хімічних препаратів [3, 4].

Особливості штамів бактерій р. *Bacillus* (*B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*) значно варіюють за патогенністю і токсичністю метаболітичних комплексів, які продукуються ними. Доведено здатність метаболітів до трансформації різних субстратів і стабільного виживання в мінливому середовищі. Так, штами *B. subtilis*, *B. pumilus* проявляють антагоністичні властивості по відношенню до патогенних і умовно-патогенних форм мікроорганізмів, таких як *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Fusarium*, а також продукують біологічно активні речовини, синтезують амінокислоти, вітаміни та інші сполуки, крім цього, активізують фізіологічні процеси росту і розвитку рослин. *B. subtilis*, як бактеріальний ендофіт, займає ті ж екологічні ніші в рослинах, що й фітопатогенні форми мікроорганізмів. Тому він є перспективним біоконтрольним агентом для фітопатогенів різних рослин.

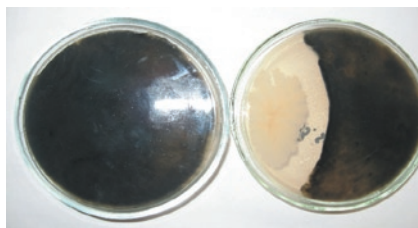
Отже, контроль за розвитком ґрунтових патогенів рослин можна забезпечити за допомогою методів природної біоінженерії, основну частку яких становлять мікробні групи. Розвиток патогенів та їх контроль відбуваються за рахунок особливих екосистем, в яких культурні рослини захищені від специфічних ґрунтових патогенів, що зумовлено діяльністю і впливом на них інших ґрунтових мікроорганізмів. Загальна супресія ґрунтового біому щодо патогенів пов'язана із загальною мікробною біомасою, а також залежить від того організму, який проявляє антагоністичні властивості до специфічного виду або роду патогену. Практично весь ґрунтовий біом володіє природними механізмами, здатними обмежувати розвиток захворювання. Так, епіфітотії значно менше поширюються в ґрунті з високим рівнем біорізноманіття мікроорганізмів, ніж у середовищі, яке має кілька представників мікробіоти. Таким чином, біотехнологічні розробки для контролю в системі ризосфери патогенних мікроорганізмів дають можливість ініціювати природні механізми («природна інженерія»), отже, і впливати на формування складу ризосферних мікробних угруповань.

Методика досліджень. З метою розробки сучасних та екологічно безпечних технологій фітозахисту від комплексу фітофагів і фітопатогенів протягом 2012-2018 рр. вивчаються перспективні штами бактерій р. *Bacillus* – біоагенти мікробних препаратів із робочих колекцій Інституту садівництва (ІС) НААН України та кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України. В роботі використовуються штами бактерій *B. subtilis* (016), *B. pumilus* (097) і нові штами природного типу *B/11*, *B/16*, виділені з ризосфери ґрунту і рослинних зразків яблуні. Оцінку біологічних властивостей перспективних біоагентів р. *Bacillus* проводять з урахуванням селекційних критеріїв відбору та антагоністичної активності до фітопатогенних мікроміцетів, яку визначають за допомогою класичного методу відстроченого антагонізму. Штами з підвищеною антагоністичною активністю відбирають за принципом пригнічення лінійного росту тест-грибів порівняно з контрольним варіантом (без впливу бактерії-антагоніста). Штучний інфекційний фон у лабораторних умовах створюють за оригінальними методиками [5, 6]. Статистичний аналіз проводили, використовуючи програму Statistica 8.0, а для обчислювання даних – Excel.

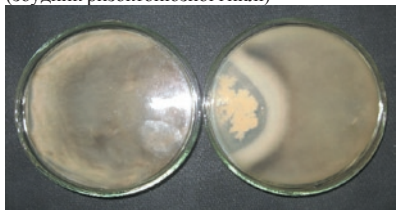
Результати досліджень. При оцінці поліфункціональної дії рідких концентратів штамів *B/11*, *B/16* і підвищення ефективності біоконтролю фітопатогенів в агроценозах першочерговим етапом є встановлення антагоністичної активності по відношенню до збудників небезпечних хвороб рослин (різні форми фузаріозу, плямистості, кореневої гнилі). У процесі досліджень встановлено високу антагоністичну активність щодо тест-грибів *Fusarium* spp., *Bipolaris sorokiniana*, *Rhizoctonia cerealis*, *G. graminis* штаму *B/16*, яка проявлялась у вигляді так званих «зон пригнічення росту» (рис.). Наявність їх свідчить про синтез штамом антибіотичних субстанцій, що потрапляють у поживне середовище та безпосередньо інгібують ріст гриба.



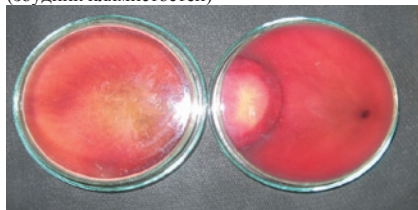
а) тест *R. cerealis*
(збудник ризоктоніозної гнилі)



б) тест *B. sorokiniana*
(збудник плямистостей)



в) біотест *G. graminis*
(фітопатоген зернових культур)



г) *F. graminearum*
(збудник фузаріозів)

Рис. Пригнічення росту фітопатогенних тест-грибів під впливом штаму *B. subtilis* (*B/16*)

Водночас, крім синтезу антибіотичних метаболітів, відомі ще й інші механізми антагоністичного впливу бактерій роду *Bacillus* на гриби-збудники хвороб рослин, зокрема, конкуренція за джерела живлення, колонізація рослинної тканини, індукція стійкості тощо.

Результати свідчать про синтез антибіотичних метаболітів штамом *B. subtilis* (B/16). Штам *B. pumilus* (B/11) при вирощуванні у подвійній культурі з фітопатогенними грибами зон пригнічення не утворював, а інгібував їх ріст за рахунок власного інтенсивного росту на поверхні поживного середовища.

Кількісні показники антагоністичної активності дослідних штамів щодо фітопатогенних грибів (індекси пригнічення) представлені в таблиці 1.

1. Антагоністична активність штамів *B. subtilis*, *B. pumilus* *in vitro* щодо фітопатогенних мікроміцетів

Мікроміцет (тест-гриб)	Індекс пригнічення, %	
	<i>B. subtilis</i> B/16	<i>B. pumilus</i> B/11
<i>Cochliobolus sativus</i> (<i>Bipolaris sorokiniana</i>)	37,5	61,3
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	31,3	40,0
<i>Rhizoctonia cerealis</i> (<i>Ceratobasidium cereale</i>)	58,8	-н/в
<i>Gibberella zeae</i> (<i>Fusarium graminearum</i>)	0	0

Отримані дані свідчать про їх високу антагоністичну активність, проте механізми їх прояву різні. Зазвичай дослідження нових, перспективних штамів розпочинають з виявлення та ідентифікації антибіотичних субстанцій серед метаболітів штаму в його культуральній рідині і проводять з використанням сучасних фізико-хімічних методів аналізу та ін. Однак наявність серед метаболітів дослідного штаму відомих антибіотиків ще не гарантує високу технічну ефективність біопрепарату, створеного на його основі. На практиці як активна субстанція (компонент), яка входить до складу біопрепарату разом з наповнювачем (неактивною субстанцією), використовуються деактивовані клітини штаму, а у препаратах на базі бацил – ендоспори. Перед застосуванням препарат розмішують у воді. При цьому клітини встигають не лише відновити життєдіяльність, але й почати продукувати антибіотичні речовини. Для захисного ефекту необхідно, щоб кількість останніх була достатньою, однак іноді антипатогенна дія може послаблюватися через відсутність інших необхідних властивостей штаму, зокрема, недостатню швидкість колонізації тканин рослин, нестабільність штаму в екосистемі тощо.

Мікроорганізми, що культивуються в лабораторних умовах, можуть змінювати свої біологічні властивості і токсигенність (активність). У зв'язку з цим наступним етапом досліджень стало культивування їх в умовах, наближених до природних. Такі умови, при яких біотичний чинник зазвичай працює у природному середовищі, забезпечуються у модельному вегетаційному досліді, в якому як тест-організм використовується рослина-хазяїн, інфікована фітопатогеном, проти якого і проводиться пошук біологічного засобу захисту. Крім того, важливо було з'ясувати, які фракції (живі клітини чи їх метаболіти) даних штамів р. *Bacillus* діють на листках рослин, що дасть можливість поглибити знання та з'ясувати механізми їх дії (конкуренція, антагонізм, індукція стійкості та ін.).

Незважаючи на те, що активним інгредієнтом біопрепаратів (біофунгіцидів), створених на основі бацил, є спори, колонізація різних органів рослин відбувається неоднаково. Вважається, що штами бацил здатні активно колонізувати корені та прикореневу частину стебла і лише деякі – надземні органи. Зокрема,

такі висновки зроблені японськими ученими Asaka et Shoda [7] щодо штаму *B. subtilis* RB14, який проявив високу ефективність проти кореневої гнилі (збудник *Rhizoctonia solani*) при застосуванні його у вигляді суспензії клітин. Щоправда, цей штам був активним і при використанні як культуральної рідини та його фільтрату. Встановлено, що антипатогенна дія названого штаму зумовлена успішною колонізацією бактерією ризосферного ґрунту і формуванням у ньому ендоспор, які добре зберігаються, легко проростають і, зрештою, продукують антибіотичні речовини. Результати аналогічних досліджень іншого штаму – *B. amyloliquefaciens* RC-2 [6-9] свідчать про високий біологічний ефект метаболітів (культуральної рідини) проти листових хвороб рослин, який, проте, спостерігався лише за профілактичних обробок. Даний штам проявляв супресивну дію проти антракнозу шовковиці (листової хвороби, збудник *Colletotrichum dematium*) тільки в разі використання культуральної рідини або фільтрату. Суспензія клітин була неефективною.

Для визначення ефективності захисту рослин від темно-бурої плямистості (на прикладі стійких і сприйнятливих сортів тест-рослини ячменю у фазі 2-х листків) проведено обробки рослин вихідними суспензіями спор і різними фракціями концентрату штамів *B. subtilis* і *B. pumilus* (рідкий концентрат, отриманий шляхом культивування протягом 96 годин на рідкому середовищі; метаболітний комплекс після центрифугування).

В модельному досліді після обробок листків тест-рослин ячменю вихідною культуральною рідиною (зі спорами) штаму *B. subtilis* B/16 та суспензіями спор (клітин) штамів *B. subtilis* і *B. pumilus* відмічено деяке послаблення розвитку хвороби як на стійкому, так і сприйнятливому сорті, однак воно було незначним. Обробка рослин метаболітним комплексом обох штамів виявилася більш ефективною, що, очевидно, є результатом індукованої стійкості. При цьому ефективність метаболітів більшою мірою проявлялася на сприйнятливому сорті тест-рослини (Себаст'ян), табл. 2.

Встановлено, що на стійкому сорті (Світоч) ефективність спорової суспензії

2. Ефективність штамів *B. subtilis* і *B. pumilus* проти темно-бурої плямистості (модельний дослід, біотест — рослини ячменю)

Варіант досліді	<i>B. subtilis</i> B/16		<i>B. pumilus</i> B/11	
	ураження, бал (0-5)	ефективність, %	ураження, бал (0-5)	ефективність, %
Стійкий сорт Світоч				
Контроль (без обробки)	0,8	-	0,8	-
Культуральна рідина зі спорами	0,65	18,8	-	-
Суспензія спор (10^8 КУО/мл)	0,46	42,5	0,68	15,0
Метаболітний комплекс	0,33	58,8	0,18	77,5
<i>НІР</i> ₀₅	0,83	-	0,83	-
Сприйнятливий сорт Себаст'ян				
Контроль (без обробки)	1,3	-	1,3	-
Культуральна рідина зі спорами	0,95	26,9	-	-
Суспензія спор (10^8 КУО/мл)	1,17	10,0	1,11	14,6
Метаболітний комплекс	0,19	85,5	0,41	68,5
<i>НІР</i> ₀₅	0,77	-	0,77	-

B. subtilis була значно вищою, ніж на сприйнятливому, що може свідчити про вплив сортових особливостей на активність бактерії роду *Bacillus* у філоплані рослини.

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що захисна дія штамів *B. subtilis* і *B. pumilus* включає як прямий антагоністичний вплив на фітопатогенні мікроміцети, так і опосередкований, через індукцію захисних реакцій рослин, що супроводжується підвищенням їх стійкості до фітопатогенів. Індукцію захисних реакцій в рослинах можна ініціювати через кореневу систему шляхом внесення метаболічного комплексу штаму (культуральної рідини) в субстрат (грунт, пісок). Обробка рослин під час вегетації за допомогою обприскування листків суспензією клітин штаму *B. subtilis* B/16 виявилася ефективнішою проти темно-бурої плямистості ячменю на сорті Світоч, ніж на Себастьяні, що, ймовірно, пояснюється сортовими особливостями.

Висновки. Підсумовуючи науково-теоретичні та власні експериментальні дані, слід зазначити, що значна частина комерційно важливих насаджень і посівів щорічно втрачається внаслідок ураження фітофагами та хворобами. На сьогодні актуальними є дослідження в напрямку застосування мікробіологічного методу захисту рослин з метою розробки та впровадження сучасних біотехнологій контролю шкідливих організмів за участю мікроорганізмів р. *Bacillus*. Такі дослідження спрямовані на відновлення та підтримку біоценотичної рівноваги ценозів. Поєднання сучасних методологічних підходів і методів аналізу дає можливість на новому рівні науково обґрунтовано оцінити бактеріальне різноманіття природних біоагентів р. *Bacillus* з якісними показниками, що обумовлює успішне практичне використання як потенційних продуцентів мікробних препаратів (враховуючи головні показники: технологічність штамів, здатність продукувати біологічно активні метаболіти, тривале збереження життєздатності біоагентів у середовищі, висока селективність і різнобічна дія на фітопатогенні організми, фітофаги).

Список використаної літератури

1. Гадзало Я.М. Агробіологія ризосфери рослин: монографія / [Я.М. Гадзало, Н.В. Патыка, А.С. Заришняк]. – К.: Аграрна наука, 2015. – 386 с.
2. Кандыбин Н.В. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis* / Н.В. Кандыбин, Т.И. Патыка, В.П. Ермолова, В.Ф. Патыка. – Санкт-Петербург-Пушкин: Инновационный центр защиты растений, 2009. – 254 с.
3. Kriuchkova L. Biological control of leaf disease of barley with *Bacillus strain* / L. Kriuchkova // *Biologija*, V. 63 (3). – 2017. – P. 221-225.
4. Андреюк К. І. Функціонування мікробних ценозів ґрунту в умовах антропогенного навантаження / К. І. Андреюк, Г. О. Іутинська, А. Ф. Антипчук та ін. – К.: Обереги, 2001. – 239 с.
5. De Vleeschauwer D. Absciscic acid-induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling / D. De Vleeschauwer, Y. Yang, C.V. Cruz, M. Höfte // *Plant Physiology*. – 2010. – 152. – P. 2036-2052.
6. Yoshida S. Antimicrobial activity of cultural filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves / S. Yoshida, S. Hiradate, T. Tsukamoto et al. // *Phytopathology*. – 2001. – 91. – P. 181-187.

7. Asaka O. Biocontrol of Rhizoctonia solani damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14 /O. Asaka, M. Shoda // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – 62(11). – P. 4081-4085.
8. Cawoy H. *Bacillus* – based biological control of plant diseases / H. Cawoy, W. Bettiol, P. Fickers, M. Ongena // Pesticides in the modern world - Pesticides use and management / M. Stoycheva, ed. – 2011. – P. 273-302.
9. Chen X.H. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease / X.H. Chen, R. Scholz, M. Borris et al. // J. Biotech. – 2009. – 140. – P. 38-44.

PHYTOPATHOGENIC ORGANISMS CONTROL IN THE AGROCOENOSES USING BACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS*

T.I. PATYKA, Doc Agr Sci, Professor

L.A. KRYUCHKOVA, Doc Biol Sci, Professor

N.V. PATYKA, Doc Agr Sci, Professor, Corresponding Member of NAAS of Ukraine
National University of Life and Environmental Sciences,
03041, Kyiv, 13, Heroi Oborony st., e-mail: patykatatyana@gmail.com

The authors have considered the problems of the biological control of the phytopathogenic organisms using the genus B. subtilis and B.pumilus which are able to initiate natural mechanisms and influence the formation of the rhizospheric microbial communities. The antagonistic activity of the strains B/11, B/16 in relation to pathogens of various forms of fusariosis, spots, root rot with an index of inhibition of micromycetes from 31 to 61 % has been determined as well as different action mechanisms.

Key words: bacteria of the genus *Bacillus*, phytopathogens, antagonism, infectious background.

КОНТРОЛЬ ФИТОПАТОГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ В АГРОЦЕНОЗАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Т.И. ПАТЫКА, доктор с.-х. наук, профессор

Л.А. КРЮЧКОВА, доктор биол. наук, профессор

Н.В. ПАТЫКА, доктор с.-х. наук, профессор, член-корреспондент НААН Украины
Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
03041, Киев, ул. Героев обороны, 13, e-mail: patykatatyana@gmail.com

Рассмотрены вопросы биоконтроля фитопатогенов с участием бактерий B. subtilis и B. pumilus, способных инициировать природные механизмы и влиять на состав ризосферных микробных сообществ. Установлена антагонистическая активность штаммов B/11, B/16 по отношению к возбудителям различных форм фузариоза, пятнистостей, корневых гнилей с индексом подавления микромицетов от 31 до 61% и разными механизмами действия.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, фитопатогены, антагонизм, инфекционный фон.

Одержано редколегією 12.02.18