

DOI 10.29254/2077-4214-2017-4-3-141-264-268

УДК: 577.151.52:579.222.3:632.93

Гришко Р. В., Кириченко А. І., Соколова І. Є., Дрегваль О. А., Скляр Т. В.

АНТАГОНІСТИЧНА, ЛІТИЧНА ТА ЦЕЛЮЛАЗНА АКТИВНОСТІ БАЦИЛ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ҐРУНТУ

Дніпровський національний університет ім. О. Гончара (м. Дніпро)

microviro@ukr.net

Робота виконана на базі кафедри мікробіології та вірусології Дніпровського національного університету ім. О. Гончара у рамках держбюджетної теми «Структурно-функціональні особливості природних мікробіоценозів та механізми біологічної дії антимікробних препаратів», № державної реєстрації – 0115U002385.

Вступ. Загальні втрати сільськогосподарської продукції від шкідників та хвороб рослин грибкової та мікробної етіології становлять 33-40% та за оцінками експертів у світі перевищують 200 млрд. доларів на рік [4]. Тому актуальною є розробка ефективних засобів, спрямованих на захист агрокультур від фітопатогенів. Найбільш поширеним є хімічний метод захисту рослин. Однак, накопичуючись у ґрунтах, водоймах, рослинній продукції, гербіциди та пестициди негативно впливають на здоров'я людей, а також викликають розвиток резистентності у фітопатогенів. Тому в останні роки зросла роль біологічного методу захисту рослин як екологічно безпечної альтернативи хімічним препаратам [8].

Одними з найбільш перспективних і широко використовуваних для створення мікробіологічних препаратів є бактерії роду *Bacillus*. Це – одна з основних груп мікробного співтовариства ґрунту і ризосфери рослин, представники якої здатні продукувати ряд біологічно активних сполук (антибіотики, токсини, літичні ферменти, сідерофори, фітогормони та вітаміни) і виявляють високий рівень антагоністичної активності до багатьох фітопатогенних грибів та мікроорганізмів [1].

На кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології ДНУ на основі *Bacillus thuringiensis* та *Beauveria bassiana* розроблено комплексний біоінсектицидний препарат Бактофунгін [6] з широким спектром дії проти комах різних систематичних груп. Дане дослідження спрямоване на підбір додаткових мікробних компонентів бациллярної природи для надання препарату нових властивостей.

Метою роботи було виявлення антагоністичної, літичної та целюлазної активностей у бактерій роду *Bacillus*, виділених з ґрунту, та порівняння їх з властивостями штаму *Bacillus thuringiensis* IMB-7186, що входить до складу комплексного препарату Бактофунгін.

Об'єкт і методи дослідження. В роботі досліджувались 15 штамів бацил, що були виділені з ґрун-

тів Полтавської області (*Bacillus sp.* 1 – 15) та штаму *Bacillus thuringiensis* IMB-7186 (компонент Бактофунгін).

Дослідні штами вирощували при +28°C на качалці (200 об/хв.) у рідкому синтетичному середовищі, яке містило (у г/л): цитрат натрію – 1,29; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4,75; KH_2PO_4 – 9,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,18. Як джерела вуглецю додавали натрієву сіль карбоксиметилцелюлози (Na-KMЦ), як індуктор синтезу целюлаз, або глюкозу (з кінцевою концентрацією 0,5%).

Антагоністичну активність штамів бацил визначали методом агарових блоків [5] відносно бактеріальних тест-культур фітопатогенів, отриманих з Колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного: *Erwinia amylovora* IMB 9057, *Pseudomonas syringae pv. lachrymans* IMB 7595, *Pseudomonas syringae pv. atrofaciens* IMB 8254, *Xanthomonas campestris* IMB 80036, *Pectobacterium carotovorum* IMB 8982.

Біомасу відділяли на фільтрах марки Filtrak і після висушування визначали у г/л ваговим методом. Фільтрат культуральної рідини зберігали при 4°C і застосовували для визначення ферментативних активностей.

Літичну активність фільтратів культуральної рідини досліджуваних бацил визначали турбідиметричним методом [7] за зниженням оптичної щільності суспензій інтактних або прогрітих (100°C, 10 хв.) тест-культур в процесі інкубації з ферментним розчином. В якості тест-культур використовували штами фітопатогенів *Pseudomonas syringae pv. atrofaciens* IMB 8254, *Erwinia amylovora* IMB 9057. За одиницю літичної активності приймали таку кількість ферменту, яка забезпечує глибину лізису на 25-30% за 1 хв. Питому активність розраховували на 1 мг білку.

Білок визначали спектрофотометричним методом за формулою:

$A_{\text{білка}} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$ (мг/мл), де A_{280} і A_{260} – екстинкція відповідно білків та нуклеїнових кислот при 280 нм та 260 нм [3].

Целюлазну активність визначали за кількістю відновлювальних цукрів, які утворюються в результаті гідролізу целюлози під дією ферментів целюлолітичного комплексу [2]. Як субстрат застосовували хроматографічний папір (Watman №1). Колориме-

тричну реакцію проводили з гексаціанофератом у 0,1 М ацетатному буфері (рН 4,7).

Питому целюлозну активність розраховували на 1 мг білка.

Всі досліди проводились у трьох повторях. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Microsoft Excel.

Результати досліджень та їх обговорення. Антагоністичну активність ізолятів, виділених із ґрунтів степової зони Полтавської області, та для порівняння штаму *Bacillus thuringiensis* IMB-7186 визначали методом агарових блоків відносно тест-культур, які відомі як збудники різних захворювань сільськогосподарських культур.

Основним принципом відбору перспективного штаму бацил були: відсутність або низька антагоністична активність до основного компонента препарату Бактофунгін – *Bacillus thuringiensis* IMB-7186, а також висока антагоністична активність по відношенню до фітопатогенних бактерій.

Антагоністичну активність досліджуваних штамів бацил оцінювали за діаметрами зон пригнічення росту фітопатогенів (табл. 1). З отриманих даних видно, що чотири штами (25% від усіх досліджених), а саме *Bacillus sp.* 3, 5, 6, 14 проявили антагонізм до всіх вище зазначених фітопатогенних бактерій, а також до *Bacillus thuringiensis* IMB-7186.

Всі перелічені вище культури незалежно пригнічували ріст *B. thuringiensis*. Штами 7, 9, 10 і 15 зовсім не виявляли антагонізму відносно *Bacillus thuringiensis*, проте рівнем антагонізму до фітопатогенів відрізнялись. Слід відмітити, що при високій інсектицидній активності *B. thuringiensis* IMB-7186 проявляв антагоністичну дію тільки відносно *Pseudomonas syringae pv. atrofaciens* IMB 8254., що і було підставою для пошуку додаткового компонента, який би ефективно пригнічував ріст фітопатогенів.

В результаті аналізу отриманих даних для подальшого дослідження літичної та целюлазної активності нами були відібрані чотири штами: 3-й, 8-й, 9-й і 10-й. Перші два (3-й і 8-й) були обрані на підставі найбільш широкого антагоністичного спектру і, в тому числі, проти фітопатогенних грибів (за попередніми даними), штами 9 і 10 – через відсутність у них антагоністичної активності відносно *B. thuringiensis* IMB-7186.

В таблиці 2 відображені дані про накопичення біомаси та білку в культуральній рідині бацил в процесі їх глибинного культивування у середовищах з глюкозою або Na-KMЦ. Для більшості досліджених

Таблиця 1.

Антагоністична активність виділених штамів бацил до *P. syringae*, *X. campestris*, *P. carotovorum* та *B. thuringiensis*

Штами досліджуваних бацил	<i>B. thuringiensis</i> IMB-7186	<i>P. syringae pv. lachrymans</i> IMB-7595	<i>X. campestris</i> IMB-80036	<i>P. syringae pv. atrofaciens</i> IMB-8254	<i>P. carotovorum</i> IMB-8982
	Діаметри зон пригнічення росту (мм)				
<i>Bacillus sp.</i> 1	22,3 ± 1,5	-	30,2 ± 2,0	-	-
<i>Bacillus sp.</i> 2	10,4 ± 0,3	-	28,3 ± 1,8	13,2 ± 0,7	-
<i>Bacillus sp.</i> 3	12,0 ± 0,5	25,4 ± 1,3	22,0 ± 1,4	16,5 ± 0,9	13,4 ± 0,3
<i>Bacillus sp.</i> 4	13,2 ± 0,6	21,0 ± 1,0	33,5 ± 2,2	19,6 ± 0,8	-
<i>Bacillus sp.</i> 5	13,5 ± 0,4	30,2 ± 1,9	29,1 ± 1,9	12,1 ± 0,2	14,5 ± 0,5
<i>Bacillus sp.</i> 6	10,2 ± 0,2	22,1 ± 0,8	30,3 ± 2,1	15,4 ± 0,6	15,3 ± 0,6
<i>Bacillus sp.</i> 7	-	-	12,4 ± 0,3	20,3 ± 0,9	-
<i>Bacillus sp.</i> 8	9,5 ± 0,3	20,5 ± 0,7	31,0 ± 1,8	10,0 ± 0,2	-
<i>Bacillus sp.</i> 9	-	22,3 ± 1,1	12,5 ± 0,4	15,5 ± 0,7	-
<i>Bacillus sp.</i> 10	-	22,0 ± 0,8	30,0 ± 0,8	16,2 ± 0,5	15,2 ± 0,8
<i>Bacillus sp.</i> 11	-	-	-	-	10,3 ± 0,2
<i>Bacillus sp.</i> 12	11,4 ± 0,7	-	11,0 ± 0,2	-	-
<i>Bacillus sp.</i> 13	9,6 ± 0,1	-	10,5 ± 0,1	-	-
<i>Bacillus sp.</i> 14	11,5 ± 1,1	12,2 ± 0,3	10,2 ± 0,3	10,2 ± 0,2	12,5 ± 0,3
<i>Bacillus sp.</i> 15	-	10,4 ± 0,2	11,4 ± 0,5	-	-
<i>B. thuringiensis</i> IMB-7186	-	-	-	9,0 ± 0,1	-

Примітка: зона затримки росту більше 25 мм – тест-об'єкти високочутливі, 15-24 мм – помірночутливі, 10-14 мм – малочутливі, «-» – зона пригнічення росту відсутня – стійкі.

Таблиця 2.

Накопичення біомаси та білку в культуральній рідині продуцентів

Штам	Біомаса г/л		Білок мг/мл	
	Глюкоза	Na-KMЦ	Глюкоза	Na-KMЦ
<i>Bacillus sp.</i> 3	1,93 ± 0,12	0,59 ± 0,09	0,34 ± 0,02	0,17 ± 0,05
<i>Bacillus sp.</i> 8	1,40 ± 0,20	0,59 ± 0,08	0,58 ± 0,03	0,68 ± 0,07
<i>Bacillus sp.</i> 9	2,41 ± 0,70	0,10 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,22 ± 0,05
<i>Bacillus sp.</i> 10	2,32 ± 0,33	0,30 ± 0,05	0,34 ± 0,01	0,14 ± 0,01
<i>B. thuringiensis</i> IMB-7186	1,16 ± 0,21	0,21 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,25 ± 0,04

штамів показники біомаси були значно нижчі при використанні Na-KMЦ порівняно з глюкозою. Щодо концентрації білку у культуральній рідині, то у штамів *Bacillus sp.*3, 9 і 10 вона була суттєво більшою на середовищах з глюкозою, а для *Bacillus sp.*8 і *B. thuringiensis* IMB-7186 – на середовищах з Na-KMЦ (відповідно 0,68 і 0,25 мг/мл), що вірогідно пов'язано з індукуванням синтезу екстрацелюлярних білків під дією Na-KMЦ.

Літичну активність визначали по відношенню до граманегативних фітопатогенних бактерій, що викликають хвороби рослин – *Pseudomonas syringae pv. atrofaciens* та *Erwinia amylovora*. Оскільки літична активність ґрунтових штамів бацил відносно живих культур *Pseudomonas syringae* практично не проявлялась, у статті наведені дані тільки відносно прогрітих клітин псевдомонад.

З рисунку 1 видно, що штами *Bacillus sp.*3, *Bacillus sp.*8, *Bacillus sp.*9, *Bacillus sp.*10 проявляють

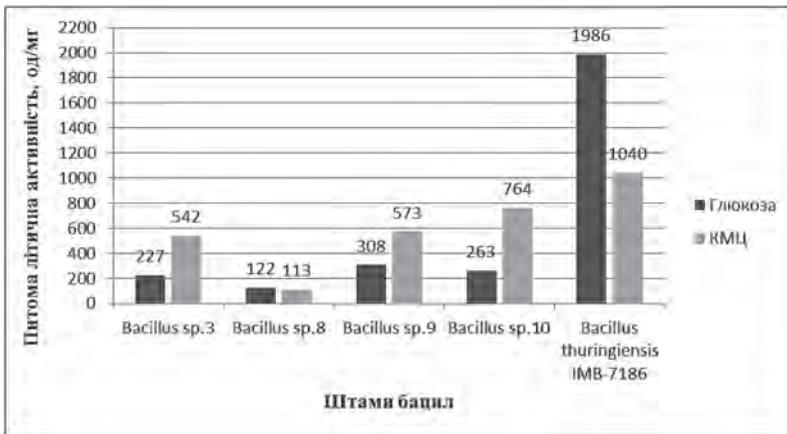


Рис. 1. Питомі літична активність бацил, вирощених на середовищах з різними джерелами вуглецю (глюкозою або Na-KMЦ), по відношенню до прогрітих клітин *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* IMB 8254

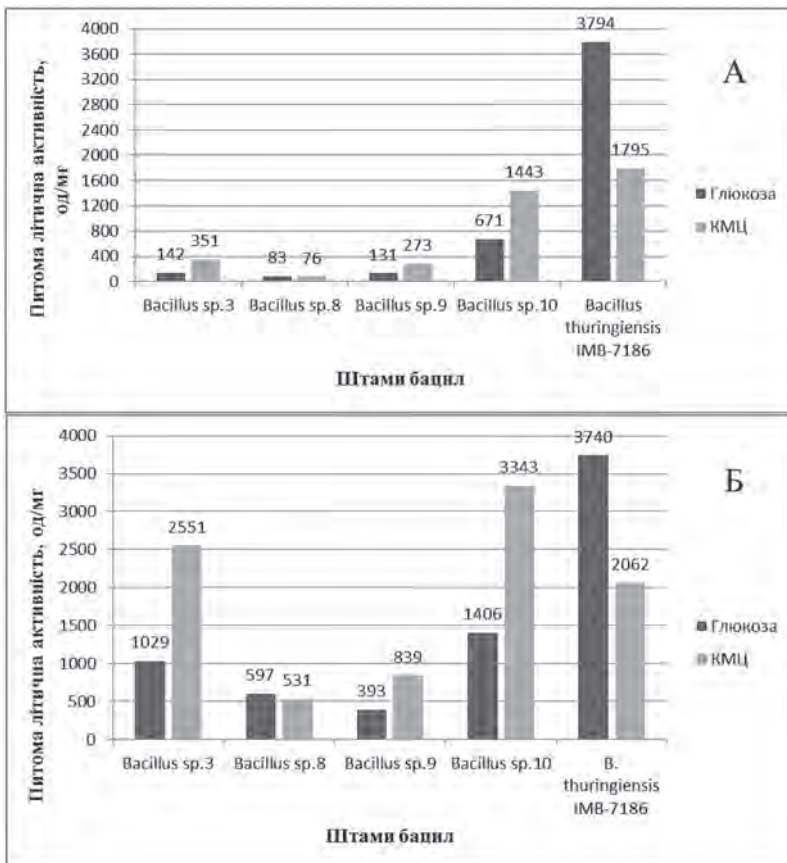


Рис. 2. Питомі літична активність бацил, вирощених на середовищах з різними джерелами вуглецю (глюкозою або КМЦ), по відношенню до нативних (А) та прогрітих (Б) клітин *Erwinia amylovora* IMB 9057.

низьку літичну активність до *Pseudomonas syringae*. Проте питома літична активність у перелічених штамів (за виключенням *Bacillus sp.8*) при вирощуванні на середовищі з Na-KMЦ була у 1,9 – 2,9 разів вищою, ніж на середовищі з глюкозою. Найбільшу літичну активність серед всіх досліджених штамів проявив *B. thuringiensis*, причому найвищий показник питомої активності (1986 од/мг) був отриманий при додаванні в живильне середовище глюкози.

У подальших експериментах визначали літичну активність досліджуваних штамів бацил на тест-культури *Erwinia amylovora* IMB 9057, як на нативних, так і на прогрітих клітинах. Як видно з **рисунку 2 А**, штами *Bacillus sp. 3, 8 і 9* виявляли низьку літичну активність відносно нативних клітин ервіній. Найбільшу питому активність продемонстрували *Bacillus sp. 10* на середовищі з Na-KMЦ (1443 од/мг) та *B. thuringiensis* IMB-7186 на середовищі з глюкозою (3794 од/мг), що більше, ніж у двічі перевищувало активність на середовищі з Na-KMЦ (1795 од/мг).

Літична активність всіх досліджуваних штамів бацил була значно вищою відносно прогрітих клітин *Erwinia amylovora* (у 2-7 разів) порівняно з лізисом нативних клітин (**рисунк 2 Б**). Найбільші показники питомої активності були отримані для штамів *Bacillus sp.3* і *Bacillus sp. 10* на середовищі з Na-KMЦ (відповідно 2551 і 3343 од/мг) і для *B. thuringiensis* IMB-7186 на середовищі з глюкозою (3740 од/мг).

Слід відмітити, що саме *B. thuringiensis* IMB-7186, що входить до складу біоінсектицидного препарату Бактофунгін, суттєво відрізнявся від диких штамів ґрунтових бацил більш високим рівнем літичної активності, а також здатністю практично з однаковою ефективністю лізувати нативні та прогріті клітини ервіній, що дуже важливо для практичного застосування препарату.

При визначенні целюлазної активності в культуральній рідині бацил було встановлено, що тільки 2 природних штами бацил *Bacillus sp.3* та *Bacillus sp.8* продукували целюлази з невисоким рівнем активності, яка коливалася в межах від 0,086 до 0,25 од/мг білку (**таблиця 3**).

Всупереч очікуваному, рівень целюлазної активності при вирощуванні штамів на синтетичному середовищі з глюкозою був значно більшим, ніж на середовищі з Na-KMЦ. У додатково проведеному експерименті було показано, що *Bacillus thuringiensis* IMB-7186 проявляв целюлолітичну активність тільки на МПБ (за наявності Na-KMЦ), яка дорівнювала 0,32 од/мг. На синтетичному середовищі дана культура не синтезувала целюлаз.

При порівнянні показників целюлолітичної активності та біомаси у бактерій роду *Bacillus* виявлена зворотна кореляція між накопиченням маси клітин та активністю целюлаз, тобто, якщо культури знахо-

Целюлолітична активність фільтратів культуральної рідини штамів роду *Bacillus*

Штам	Целюлазна активність од/мл		Питома активність од/мг	
	Глюкоза	КМЦ	Глюкоза	КМЦ
<i>Bacillus sp.3</i>	0,053 ± 0,013	0,012 ± 0,001	0,16 ± 0,050	0,086 ± 0,02
<i>Bacillus sp.8</i>	0,140 ± 0,004	0,083 ± 0,020	0,25 ± 0,005	0,121 ± 0,02
<i>Bacillus sp.9</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus sp.10</i>	0	0	0	0
<i>B. thuringiensis</i> IMB-7186	0	0	0	0

дяться у стадії активного росту, біосинтез позаклітинних ензимів гальмується.

Висновки. Більшість штамів бацил, виділених з ґрунту, проявили достатньо високий рівень антагонізму відносно бактерій фітопатогенів. Так, ріст *X. campestris* IMB-80036 пригнічували 14 штамів бацил (із 15 виділених), *P. syringae* pv. *atofaciens* IMB-8254 – 10, *P. syringae* pv. *lachrymans* IMB-7595 – 9, *P. carotovorum* IMB-8982 – 6 штамів.

Антагонізм відносно *Bacillus thuringiensis* IMB-7186 (компоненту препарату Бактофунгін) проявляли 10 штамів.

Встановлено, що найбільшу літичну активність відносно бактерій фітопатогенів – *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* IMB 8254 і *Erwinia amylovora* IMB 9057 проявив *B. thuringiensis* IMB-7186 (компонент Бактофунгину), причому найвищі показники питомої активності (відповідно 1986 і 3794 од/мг) були отримані при додаванні в живильне середовище глюкози. Більшість штамів *Bacillus*, виділених з ґрунту, проявляла низьку літичну активність до фітопатогенів, проте їх питома активність при вирощуванні на середовищі з Na-KMЦ була дещо вищою, ніж на середовищі з глюкозою.

Целюлазна активність була виявлена тільки у двох ґрунтових штамів бацил *Bacillus sp.3* та *Bacillus sp.8* і коливалася в межах від 0,012 до 0,14 од/мл. Причому, всупереч очікуваному, рівень целюлазної активності при вирощуванні штамів на синтетич-

ному середовищі з глюкозою був значно більшим, ніж на середовищі з Na-KMЦ. Виявлена зворотна кореляція між накопиченням біомаси та активністю целюлолітичних ферментів, а саме, якщо культури знаходяться у стадії активного росту, біосинтез позаклітинних ензимів гальмується.

Перспективи подальших досліджень. Планується створення комплексного мікробного препарату з широким спектром дії проти комах та фітопатогенних бактерій і грибів. Оскільки антагоністичні властивості більше виражені у штамів бацил, а літична активність – у *B. thuringiensis* IMB-7186, то перспективним може бути введення додаткових бацилярних компонентів у склад комплексного препарату з біоінсектицидною та антибактеріальною дією.

Література

1. Baubekova D.G. Roststimuliruyuschaya aktivnost mikroorganizmov roda Bacillus / D.G. Baubekova // Universum: Himiya i biologiya: elektron. nauchn. zhurn. – 2014. – № 7.
2. Borzova N.V. Tselyulozodehradyuchi systemy mikroorhanizmv: biosyntezy, vlastyvostry ta strukturno-funktsionalni osoblyvostry / N.V. Borzova, L.D. Varbanets // Biotekhnolohiya. – T. 2, № 2. – 2009. – S. 23-41.
3. Varbanets L.D. Peptydazy mikroorhanizmv i metody yikh doslidzhennya / L.D. Varbanets, O.V. Matselyukh. – K.: Naukova dumka, 2014. – 328 s.
4. Govorushko S.M. Mlekopitayushchie i ptitsy – selskohozyaystvennyye vrediteli: globalnaya situatsiya / S.M. Govorushko // Selskohozyaystvennaya biologiya. – 2014. – № 6. – S. 15-25.
5. Egorov N.S. Osnovnyye ucheniya ob antibiotikah / N.S. Egorov. – M.: Izd-vo MGU, 2004. – 785 s.
6. Pat. № 94457 Ukrayiny, MPK C12N 1/14, C12R 1/6455, A01N 63/04, A01P 7/04 Kompleksnyy insektoakarytsydnnyy preparat «Baktofunhin-LS» ta sposib yoho otrymannya / A.I. Vinnikov, N.V. Cherevach, O.A. Drehval; zayavnyk i patentovlasnyk Dnipropetrovskyy natsionalnyy un-t.; zayavl. 03.12.2008; opubl. 10.05.11, Byul № 9.
7. Safronova L.A. Biologicheskaya aktivnost probioticheskikh shtammov batsill – osnovnyy preparata endosporina / L.A. Safronova // Dopovidy Natsionalnoyi akademiyi nauk Ukrayiny. – 2015. – № 6. – S. 138-146.
8. Shternshis M.V. Tendentsii razvitiya biotekhnologii mikrobnyykh sredstv zaschityi rasteniy v Rossii / M.V. Shternshis // Vestnik tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya. – 2012. – № 2. – S. 92-100.

АНТАГОНІСТИЧНА, ЛІТИЧНА ТА ЦЕЛЮЛАЗНА АКТИВНОСТІ БАЦИЛ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ҐРУНТУ

Гришко Р. В., Кириченко А. І., Соколова І. Є., Дрегваль О. А., Скляр Т. В.

Резюме. Дослідження проводились в плані розробки нових мікробних препаратів проти фітопатогенів. У 15 штамів бактерій роду *Bacillus*, виділених з ґрунту, виявлено антагонізм відносно бактеріальних фітопатогенів: *X. campestris*, *P. carotovorum*, *P. syringae* pv. *atofaciens*, *P. syringae* pv. *lachrymans*. Відібрані 4 штами *Bacillus sp.* (3-, 8-, 9- і 10-й), у яких перевіряли літичну та целюлазну активності, порівнюючи їх з *Bacillus thuringiensis* IMB-7186 (компонент препарату Бактофунгін). Найбільшу питому літичну активність відносно тест-культури фітопатогенів (*Pseudomonas syringae* і *Erwinia amylovora*) проявив *B. thuringiensis* (1986 і 3740 од/мг відповідно) при культивуванні на синтетичному середовищі з глюкозою. У ґрунтових бацил показники літичної активності були більш високими при додаванні в середовище Na-KMЦ, проте їх абсолютні значення були у 2-20 разів нижчими, ніж у *B. thuringiensis*. Целюлазна активність була виявлена тільки у двох ґрунтових штамів (3-го та 8-го) і коливалася в межах від 0,012 до 0,14 од/мл. Всупереч очікуваному, рівень целюлазної активності при вирощуванні на синтетичному середовищі з глюкозою був значно більшим, ніж на середовищі з Na-KMЦ.

Ключові слова: бацили, мікробні препарати, фітопатогени, антагонізм, літичні ферменти, целюлози.

АНТАГОНІСТИЧЕСКАЯ, ЛИТИЧЕСКАЯ И ЦЕЛЛЮЛАЗНАЯ АКТИВНОСТИ БАЦИЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВЫ**Гришко Р. В., Кириченко А. И., Соколова И. Е., Дрегваль О. А., Скляр Т. В.**

Резюме. Исследования проводились в плане разработки новых микробных препаратов против фитопатогенов. У 15 штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из почвы, выявлен антагонизм в отношении бактериальных фитопатогенов: *X. campestris*, *P. carotovorum*, *P. syringae* pv. *atropaciens*, *P. syringae* pv. *lachrymans*. Отобраны 4 штамма *Bacillus* sp. (3-, 8-, 9- и 10-й), у которых проверяли литическую и целлюлазную активности, сравнивая их с *Bacillus thuringiensis* IMB-7186 (компонент препарата Бактофунгин). Наибольшую удельную литическую активность относительно тест-культур фитопатогенов (*Pseudomonas syringae* и *Erwinia amylovora*) проявил *B. thuringiensis* (1986 i 3740 ед/мг соответственно) при культивировании на синтетической среде с глюкозой. У почвенных бацилл показатели литической активности были более высокими при добавлении в среду Na-КМЦ, хотя их абсолютные значения были в 2-20 раз ниже, чем у *B. thuringiensis*. Целлюлазная активность была обнаружена только у двух почвенных штаммов (3-го и 8-го) и колебалась в пределах от 0,012 до 0,14 ед/мл. Вопреки ожиданиям, уровень целлюлазной активности при выращивании на среде с глюкозой был выше, чем на среде с Na-КМЦ.

Ключевые слова: бациллы, микробные препараты, фитопатогены, антагонизм, литические ферменты, целлюлазы.

ANTAGONISTIC, LYTIC AND CELLULASE ACTIVITY BACILLUS, ISOLATED FROM SOIL**Grishko R. V., Kirichenko A. I., Sokolova I. Ye., Dregval' O. A., Sklyar T. V.**

Abstract. The different groups of agents are used for biological protection of agricultural crops. Some of the most promising and widely used to create microbial preparations are bacteria of the genus *Bacillus*, which have pathogenic properties regarding harmful insects and phytopathogens. Representatives of the genus *Bacillus* are one of the main groups of the microbial community of soil and rhizosphere of plants that can produce a number of biologically active compounds (antibiotics, siderophors, lytic enzymes, toxins, phytohormones and vitamins) and have high levels of antagonistic activity to many phytopathogenic fungi and microorganisms.

A complex bioinsecticidal preparation Bactofungin with a wide spectrum of action against insects of various systematic groups was developed on basis of *Bacillus thuringiensis* and *Beauveria bassiana* on the Microbiology, virology and biotechnology department of the Dnipro National University, O. Honchar.

The aim of the work was to compare the antagonistic, lytic and cellulase activities of bacilli isolated from the soil, as well as the strain *Bacillus thuringiensis* IMV-7186, which is part of the complex preparation Bactofungin.

The 15 strains of bacilli isolated from the soils of the Poltava region (*Bacillus* sp. 1 – 15) and deposited strain *Bacillus thuringiensis*, which was isolated from body of the deceased insect and included in the complex preparation Bactofungin, were investigated.

Experimental strains were grown by deep cultivation in synthetic nutrient medium with the addition of 0.5% glucose or Na-CMC as a carbon source.

The lytic activity of the culture fluid filtrate of bacilli was determined by turbidimetric method by decreasing of suspensions optical density of live or warmed (100°C, 10 min) test cultures of *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*, *Erwinia amylovora* in the process of incubation with an enzyme solution.

A chromatographic paper (Watman No. 1) was used as a substrate to determine the cellulase activity. The method is based on quantitative determination of reducing sugars, which are formed as a result of cellulose hydrolysis under the influence of cellulolytic enzymes.

In 15 strains of bacteria of the genus *Bacillus*, isolated from the soil, antagonistic activity was detected in relation to bacterial phytopathogens: *X. sampestris*, *P. syringae* pv. *atrophaciens*, *P. syringae* pv. *lachrymans*, *P. carotovorum*, as well as with respect to *Bacillus thuringiensis*, which is part of the bioinsecticide preparation Bactofungin. As a result, 4 strains of bacilli (3rd, 8th, 9th and 10th) were selected, in which the liquid culture was checked for the presence of lytic activity in relation to phytopathogens (*Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* and *Erwinia amylovora*) and cellulase activity. In parallel, the same fermentative activity was also determined in *B. thuringiensis*.

It was found that the greatest lytic activity was shown by *B. thuringiensis* (Bactofungin component), with the highest rates of specific lytic activity being obtained when glucose was added to the nutritional medium. In strains of bacilli isolated from the soil, the activity indicators on the contrary were higher adding to the medium Na-CMC, but their absolute values were 2-20 times lower than that of *B. thuringiensis*.

The cellulase activity was detected only in two soil strains of *Bacillus* sp. 3 and *Bacillus* sp. 8 and ranged from 0.012 to 0.14 units/ml. Moreover, contrary to the expected, the level of cellulase activity in growing strains in a synthetic medium with glucose was significantly greater than that of the Na-CMC medium. The inverse correlation between the accumulation of biomass and the activity of cellulolytic enzymes is revealed, namely, if the cultures are in the stage of active growth, the extracellular enzyme biosynthesis is inhibited.

It is planned to create a complex microbial preparation with a wide spectrum of action against insects and phytopathogenic bacteria and fungi.

Keywords: bacilli, microbial preparation, phytopathogens, antagonism, lytic enzymes, cellulases.

Рецензент – проф. Зайцева І. О.

Стаття надійшла 13.11.2017 року