

УДК 579.26: 633.63

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ БАКТЕРІЙ З АНТАГОНІСТИЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ ДЛЯ ОБМЕЖЕННЯ РОЗВИТКУ БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

Дворак К.П., Саблук В.Т., Буценко Л.М.

Перспективи використання бактерій з антагоністичними властивостями для обмеження розвитку бактеріальних хвороб цукрових буряків. - К.П. Дворак¹, В.Т. Саблук¹, Л.М. Буценко² - Визначено антагоністичну активність ізолятів бактерій, складових епіфітної та ендоефітної мікробіоти насіння цукрових буряків, та бактерій в епіфітному стані, виділених з поверхні листків цукрових буряків та сої. Встановлено, що серед природного комплексу бактерій, ізольованих нами є представники, що проявляють антагонізм відносно збудників бактеріозів цукрових буряків. Деякі з досліджуваних ізолятів можуть бути, після поглибленого дослідження, використані в якості компонентів біологічних препаратів.

Ключові слова: мікробіота, антагоністична активність, цукрові буряки, бактеріальні хвороби

Адреса:¹ Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України, вул. Клінічна, 25, м. Київ, 03141 e-mail: ekaterina-dvorak@rambler.ru

² Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Д03680 ДСП, вул. Заболотного, 154, м. Київ e-mail: plant_path@ukr.net

Prospects for the use of bacteria with antagonistic properties to restrict the development of bacterial diseases of sugar beet. - K. Dvorak¹, V. Sablyk¹, L. Butsenko² - Antagonistic activity of bacteria isolates that are components of epiphytic and endophytic microbiota of sugar beet seeds is determined. Bacteria in epiphytic condition allocated from the surface of sugar beet and soybean leaves is defined. It is found that among the natural complex of bacteria isolated by us there are representatives which demonstrate antagonism concerning bacteriosis pathogens of sugar beet. After in-depth investigation some of the studied isolates may be used as components of biological products.

Keywords: microbiota, antagonistic activity, sugar beets, bacterial diseases

Address: 1- Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet of NAAS of Ukraine, 25 Klinichna Str., Kyiv, 03141 Ukraine, e-mail: ekaterina-dvorak@rambler.ru; 2 - D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU, 154 Zabolotny Str., Kyiv, D03680 Ukraine, e-mail: plant_path@ukr.net

Вступ

Контролювання чисельності шкідників та ураженості хворобами рослин за допомогою хімічних пестицидів у кінцевому рахунку призвело до виникнення серйозних проблем, пов'язаних з порушеннями стану здоров'я людей та навколишнього середовища [2]. Це стає причиною пошуку альтернативних засобів захисту рослин від патогенних організмів. На сьогодні одним з найперспективніших вважають біологічний метод захисту рослин, що ґрунтується на застосуванні мікробних препаратів різної спрямованості. Цей метод розглядається в якості альтернативи або додаткового шляху зменшення використання хімічних речовин в сільському господарстві [10].

У літературі є дані, що численні представники бактерій з родів *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* та *Streptomyces* і грибів родів *Ampelomyces*, *Trichoderma* є організмами, на основі рослинно-

мікробних взаємодій яких можна створювати біопрепарати. Залежно від їх дії отримані препарати можуть бути використані в якості біодобрив, фітостимуляторів та біопестицидів [7].

У різних країнах світу здійснюються також дослідження ендоефітних бактерій, що колонізують внутрішні тканини різних видів рослин-хазяїв і проявляють антагонізм відносно збудників бактеріальних та грибних інфекцій. Це важливий напрямок, який може слугувати основою для створення нових біологічних препаратів або визначення інших сучасних стратегій боротьби із збудниками хвороб рослин [8].

Українські вчені також працюють над створенням біологічних препаратів, зокрема на основі бактерій роду *Bacillus*. Теоретичною основою використання цих бактерій для захисту рослин є унікальне поєднання в них таких якостей, як активна дія на фітопатогенні мікроорганізми, висока біосинтетична активність,

безпечність для теплокровних і аутомікрофлори, висока стійкість до несприятливих умов навколишнього середовища [6].

Під час масового виробництва мікробних препаратів на основі бактерій з антагоністичною активністю необхідним є постійне проведення скринінгу нових штамів-антагоністів, оскільки може відбуватися втрата самих штамів внаслідок фаголізису або зменшення їх антагоністичної дії під час зберігання.

Нами раніше встановлено, що хімічні засоби захисту рослин, залежно від природи діючої речовини проявляють різну антибактеріальну активність, але більшість препаратів, які використовують для обробки насіння та обприскування посівів цукрових буряків, не впливають на патогенні для культури бактерії [5].

Тому, метою наших досліджень є встановлення наявності в складі епіфітної та ендоефітної мікробіоти насіння цукрових буряків та серед бактерій в епіфітному стані, виділених з поверхні листків буряків і сої, ізолятів з антагоністичними властивостями щодо колекційних штамів збудників бактеріальних хвороб цукрових буряків.

Матеріали і методи

Нами досліджувалась антагоністична активність бактерій, які виділяли з насіння цукрових буряків за методикою, описаною К.І. Бельтюковою та ін [1], без попередньої обробки дезинфікуючими засобами. Епіфітні бактерії з поверхні листків цукрових буряків та сої ізолювали використовуючи метод змивів.

Для визначення здатності ізолюваних нами бактерій пригнічувати ріст фітопатогенних для цукрових буряків штамів використовували метод штрихового посіву описаний М.С. Єгоровим [4]. У чашки Петрі по діагоналі засівали потенційні антагоністи - свіжо виділені нами штами, та культивували при 28°C 3 - 5 діб. Потім перпендикулярно центральному штриху підсвали тест-культури - штами з відомою патогенністю для цукрових буряків. Після спільного культивування визначали наявність та величину зон відсутності росту бактерій.

У дослідженнях були використані наступні штами фітопатогенних бактерій: *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (Brown & Jamieson 1913) Yong, Dye & Wilkie 1978 штами 8545 та 8544; *Pseudomonas syringae* van Hall 1902 штами 7921 та 7923; *Xanthomonas axonopodis* Starr & Garces 1950 штами 8715, 10, 7325; *Rhizobium vitis* (Ophel, Kerr 1990) Young et al. 2001 штами 9054, 9052, 8628; *Pectobacterium carotovorum* Thompson et al. 1984 штам 8982. Всі штами зберігаються в колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України і є збудниками смугастості, плямистості листків, раку, туберкульозу

коренеплодів та некрозу судинних пучків цукрових буряків.

Результати досліджень та їх обговорення

У дослідженні для виділення бактерій з антагоністичною активністю використовували насіння та листки цукрових буряків, що пояснюється різноманітністю видового складу їх бактеріальної мікробіоти, в якій наявність бактерій-антагоністів є дуже імовірною. Також нами перевірялася антагоністична активність ізолятів бактерій, виділених з листків сої, що може вирощуватися на полі після цукрових буряків, на рештках яких можуть резервуватися збудники бактеріальних хвороб цієї культури.

У результаті бактеріологічного аналізу з насіння цукрових буряків було виділено 18 різних типів ізолятів бактерій. З поверхні листків цієї культури – 20 ізолятів різних типів та з поверхні листків сої – 10 типів ізолятів. Бактеріальна мікробіота насіння та епіфітна мікробіота листків цукрових буряків характеризувалися наявністю бактерій, що формують колонії різних кольорів (рис. 1).

Виділені нами ізоляти бактерій формували колонії не лише різних кольорів, але й з різними поверхнями та ступенем прозорості: 10% колоній були гладенькими та прозорими, 46% - гладенькими і непрозорими, 14% мали зморшкувату поверхню та були непрозорими та 30% характеризувалися наявністю гладеньких напівпрозорих колоній.

У ході проведення досліджень встановлено, що серед бактерій, виділених з насіння цукрових буряків, антагоністичну активність виявили два ізоляти – Б-32 та Б-40. Ізолят Б-32 спричинявав утворення зони затримки росту збудника туберкульозу коренеплодів *Xanthomonas axonopodis* 6 радіусом 18 мм. Ізолят Б-40 обмежував ріст збудника смугастості жилок листків цукрових буряків *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* 8545, зона затримки складала 30 мм.

Серед бактерій, виділених з поверхні листків цукрових буряків та сої, вдалося виявити наявність трьох ізолятів зі антагоністичними властивостями. Ізолят АН-18, що формує білі, гладенькі колонії з темнішим центром пригнічував ріст збудника туберкульозу коренеплодів цукрових буряків *Xanthomonas axonopodis* 7325, зумовлюючи виникнення зони затримки росту патогенна радіусом 21 мм. Слабку антагоністичну активність проявили ізолят АН-22, що характеризується формуванням блискучих колоній жовтого кольору та АН-29 з жовтими гладенькими непрозорими колоніями. Вони спричинявали виникнення зон затримки росту фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* 8545, що є причиною ураженості листків цукрових буряків смугастістю жилок (табл.1).



Рис. 1. Розподіл ізолятів бактерій виділених нами за кольором колоній

Таблиця 1. Антагоністична активність ізольованих з насіння та листків цукрових буряків і сої бактерій
Table 1. Antagonistic activity of isolated bacteria from the seeds and leaves of sugar beet and soybean

Рослина та орган, з якого ізольовано бактерії	Номер ізоляту	Штам відносно якого виявлено антагонізм	Радіус зони затримки росту, мм
Цукровий буряк, насіння	Б-32	<i>Xanthomonas axonopodis</i> 6	18
Цукровий буряк, насіння	Б-40	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i> 8545	30
Цукровий буряк, листки	АН-18	<i>Xanthomonas axonopodis</i> 7325	21
Соя, листки	АН-22	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i> 8545	16
Соя, листки	АН-29	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i> 8545	18

Нами також було визначено ряд антагоністичну активність відносно відомих морфологічних та культурально-біохімічних збудників бактеріозів цукрових буряків (табл. 2). властивостей ізольованих бактерій, які проявили

Таблиця 2. Морфологічні та культурально-біохімічні властивості ізольованих нами бактерій з антагоністичної активністю
Table 2. Morphological and cultural-biochemical properties of bacteria with antagonistic activity isolated by us

	Ізоляти бактерій виділені з				
	насіння цукрових буряків		листіків цукрових буряків	листіків сої	
	Б-32	Б-40	АН-18	АН-22	АН-29
Забарвлення по Граму	-	-	+	+	-
Рухливість	+	+	+	+	+
Форма клітин	П	П	П	П	П
Спороутворення	-	-	+	+	-
Оксидаза	-	-	-	-	-
Флуоресцентний пігмент	-	+	-	-	+
Пектолітична активність	-	-	-	-	-
Використання джерел вуглецю:					
глюкози:					
анаеробно	-	-	-	-	-
аеробно	+	+	-	-	+

Примітка: «+» - наявність ознаки; «-» - відсутність ознаки; «П» - палички

У результаті проведення тестів було аеробними рухливими паличками, тому ми встановлено, що ізоляти Б-32, Б-40 та АН – 29 є попередньо ідентифікували їх як представників грамнегативними оксидазонегативними роду *Pseudomonas* spp. На основі даних про те, що

ізоляти АН-18 та АН-22 є грамозитивними оксидазонегативними спороутворюючими паличками їх було попередньо віднесено до роду *Bacillus* spp.

Раніше нами також здійснювались дослідження штаму «Фітант-1», що був ізолюваний з фітоплани сої і протягом трьох років зберігання виявляє стабільну антагоністичну дію проти широкого кола бактеріальних фітопатогенів, у тому числі і збудників бактеріальних хвороб цукрових буряків, спричиняючи утворення зон затримки росту патогенних видів, що є представниками різних родів [3].

Отримані нами результати досліджень узгоджуються з даними літератури, які свідчать, що саме різні види бактерій з родів *Pseudomonas* та *Bacillus* частіше інших проявляють антагоністичну дію, впливаючи на ріст чи розмноження патогенних організмів або гальмують їх біохімічні процеси, тому і використовуються як агенти контролю їх чисельності в складі біологічних препаратів [7, 9].

Таким чином, в складі мікробіоти насіння та різноманіття бактерій в епіфітній фазі на поверхні листків цукрових буряків та сої є нечисленні представники з антагоністичними властивостями, які нам вдалося ізолювати.

У зв'язку з тим, що сьогодні масово досліджуються для впровадження у виробництво сучасні біологічні препарати, у тому числі і на основі бактерій-антагоністів, що є безпечними і водночас дієвими важливо накопичувати та всебічно вивчати штами з антагоністичними властивостями відносно патогенних організмів. Враховуючи глобальні зміни клімату, агрохімічного та агрофізичного стану ґрунту, внаслідок антропогенного впливу, зміни в мікробних популяціях розвиток бактеріальних хвороб рослин може бути більш інтенсивним та відчутнішим в економічному плані, тому важливо мати надійний арсенал засобів захисту рослин на забезпечення якого і спрямовані наші дослідження.

1. Бельтюкова К.И. Методы исследований бактериальных болезней растений / К.И.Бельтюкова, М. С. Матышевская, М.Д. Куликовская, С.С.Сидоренко. – К.: Наукова думка, 1968. – 316 с.
2. Васильєва В.Л., Кулініченко В.Л. Світоглядні та методологічні засади мікробіологічного захисту рослин від шкідників і хвороб // Мікроб. журнал. – 1999 – 61, №6. – С. 75 – 84.
3. Дворак К.П. Антагоністична активність штаму «Фітант-1» щодо збудників бактеріозів цукрових буряків / К.П. Дворак, Т.Т. Гнатюк // Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: IX наукова конференція молодих учених, 26 – 27 листопада 2013р. тези доповідей. – Чернігів: Сівер-Друк, 2013. – С.59 – 60.
4. Егоров Н.С. Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности / Н.С. Егоров - М.:Изд-во МГК, 1957. – 182 с
5. Саблук В.Т. Чутливість збудників бактеріозів цукрових буряків до пестицидів / В.Т. Саблук, К.П. Дворак, Н.В. Житкевич, Л. М. Буценко // Цукрові буряки. 2013. – № 4. – С. 20 – 21.
6. Смирнов В.В. Эндوفитные бактерии, использование их в защите растений от болезней / В.В. Смирнов, М.Я. Менликиев, И.Б. Сорокулова, С.В. Лапа, О.Н. Рева // Фитопатогенные бактерии. Фитонцидология. Аллелопатия: сборник статей участников Международной научной конференции (4-6 октября 2005г., Киев). – Житомир: Изд-во «Державний агроекологічний університет», 2005. – С.181 – 185.
7. Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture / G. Berg // Applied microbiology and biotechnology. – 2009. – Т. 84. – №. 1. – P. 11-18.
8. Berg G. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes / G. Berg, J. Hallmann // Microbial root endophytes. – Springer Berlin Heidelberg, 2006. – P. 53 □ 69.
9. Walsh U.F. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation / U.F. Walsh, J.P. Morrissey, F.I. O'Gara // Current Opinion in Biotechnology. – 2001. – Т. 12. – №. 3. – P. 289 – 295.
10. Welbaum, G. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems / G. Welbaum, A.V. Sturz, Z. Dong, J. Nowak // Crit. Rev. Plant Sci. – 2004.–23. – P. 175 – 193.

Отримано: 11 березня 2013 р.

Прийнято до друку: 12 вересня 2013 р.