

Изобретение относится к микробиологии, в частности к штамму антагонисту бактериального ожога плодовых, и может быть применено в защите растений.

Известен штамм-продуцент антибиотического вещества, активного против возбудителя ожога плодовых [2]. Однако данный микроорганизм не проявляет свойств патогенности к вредителям плодовых культур и разносчикам заболевания - насекомым.

Известно также решение, в котором в качестве антагониста возбудителя ожога плодовых используют *Bacillus subtilis* [1]. Однако, данный микроорганизм также не обладает энтомопатогенными свойствами.

Таким образом, оба решения не могут быть использованы для комплексной защиты растений.

Цель изобретения - расширение защитных свойств штамма-антагониста возбудителя ожога плодовых.

Указанная цель достигается тем, что в качестве штамма-антагониста возбудителя ожога плодовых используют *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto* ВКМ-453 - типовой штамм вида, хранящийся во Всесоюзной коллекции непатогенных микроорганизмов под номером БКС В-453 [1].

Сущность изобретения состоит в том, что у предлагаемого штамма выявлена способность к подавлению возбудителя бактериального ожога и, одновременно с этим, штамм обладает энтомопатогенными свойствами.

Пример 1. На пластинки картофельного агара в чашках Петри засевают штрихом антагонист *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto* ВКМ-453 и культивируют при 28°C в течение 2 суток. Затем к выросшим макроколониям штрихами из суспензий в физиологическом растворе $9,35 \times 10^8$ кл/мл перпендикулярно подсевают культуру *Erwinia amylovora* 595a и выращивают далее при 30°C 3 суток. Зона отсутствия роста возбудителя ожога плодовых составляет от 29 до 34мм по радиусу.

Пример 2. Аналогично примеру 1, но в качестве тест-культуры используют штамм *Erwinia amylovora* 2024.

Зоны подавления роста составляют от 26 до 38мм по радиусу.

Пример 3. Незрелые плоды дикой груши протирают медицинским этиловым спиртом и слегка прокалывают стерильной иглой кулис. На место прокола наносят каплю взвеси культуры антагониста (приготавливают взвесь на физрастворе, доводя концентрацию до $9,35 \times 10^8$ кл/мл). Обработанные таким образом плоды инкубируют при 28°C 3 суток. Поражения плодов не наблюдается.

Пример 4. Аналогично примеру 3, но на поверхность груш в местах проколов наносят каплю взвеси антагониста в культуральной жидкости - картофельном бульоне, а затем, после высыхания капли, на ее место наносят каплю взвеси тест-штамма в культуральной жидкости - картофельном бульоне *Erwinia amylovora* - 595a или *Erwinia amylovora* 2024 концентрацией от $1,6 \times 10^8$ до $4,67 \times 10^8$ кл/мл и после высыхания откладывают на 3 суток в термостат.

Часть груш обрабатывают лишь возбудителем ожога плодовых, остальную часть представляют интактные плоды. По истечении 3 суток инкубации при 30°C на плодах, обработанных лишь возбудителем ожога плодовых, отмечают выделение экссудата, а остальные груши не поражаются.

Пример 5. Исследование энтомопатогенного

действия предлагаемого штамма на грушевый пилильщик - *Neurotoma flaviventris* Retz 1983 осуществляли в полевых условиях, поскольку данный вредитель чувствует себя хорошо лишь на свежих листьях и не способен выживать без гнезда в лаборатории. Методом отпечатка с 2-суточной газоновой культуры, выращенной при 28°C, обрабатывают поверхность листьев веточки, соседней с гнездом вредителя, и привязывают ее с помощью нитки к гнезду, предварительно осторожно удалив большую часть пригодных для поедания гусеницами листьев из гнезда. Сверху, для предотвращения попадания посторонней флоры, а также налета птиц, гнездо обвязывали марлей и накрывали полиэтиленовым колпаком. Кроме защиты от хищников это обеспечивало и то, что погибшие гусеницы не выпадали из гнезда. Контролем служили микробиологически необработанные гнезда. В каждом гнезде оставляли по 40 гусениц, лишние и отстающие в развитии особи из гнезда удалялись.

Животные вначале поедали необработанные листья, а затем и обработанные предлагаемым штаммом-антагонистом.

Гибель животных наблюдалась после поедания ими обработанных листьев через 3 суток и составляла до 100% взятых в обработку антагонистом животных. При этом в контроле гибель животных не наблюдается.

Пример 6. Исследователи действие штамма на вредителя дуба и ряду других культур - *Lymantia dispar*.

В трех садках помещали гусениц. Один садок использовали как контрольный, а два опытные. В одном опытном садке использовали как корм листья, обработанные аналогично примеру 5, а другой содержал животных, поедавших листья, обработанные порошком, применяемого в сельском хозяйстве битоксибациллина.

При применении предлагаемого штамма из 100 инфицированных животных через 3 дня после поедания ими микробиологически обработанных листьев живыми осталось лишь двое, а при использовании битоксибациллина - девять. В контрольном садке животные не погибали.

Пример 7. Для исследования ростовых свойств предлагаемого штамма и его способности подавлять возбудителя ожога в жидкой среде использовали картофельный бульон аэрируемый путем покачивания в 16мл пробирках с заполнением 8мл, 100 движений в минуту.

При концентрации стартовой $0,05$ кл/мл, уже через 1 сутки концентрация клеток достигает 7×10^{14} кл/мл; на 2 сутки - 10×10^{16} кл/мл при температуре 23°C, у *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto* ВКМ-453. При совместном культивировании в аналогичных условиях, а также при температуре 30°C с возбудителем ожога плодовых, превышающем по концентрации клеток концентрацию клеток бацилл в 2, 4, 6 и 8 порядков, в течение суток наблюдалась полная элиминация клеток *Erwinia amylovora* с помощью антимикробных субстанций, выделяемых в среду культивирования предлагаемым антагонистом. Так что при совместном культивировании антагониста и возбудителя ожога, последний не высевается из инкубируемой среды уже к 18 - 24 часам выращивания.

Таким образом, предлагаемый антагонист продуцирует антимикробные вещества, активные в отношении *Erwinia amylovora* и как типовой штамм бактерий *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto* обладает патогенным действием на насекомых (*Bombux mori*

[1], *Neurotoma flaviventris* Retz, *Lymantria dispar* и др.), могущих являться разносчиками бактериального ожога плодовых. Это свидетельствует о том, что предлагаемый микроорганизм имеет более широкие защитные свойства по сравнению с известными штаммами-антагонистами.