

Винахід стосується захисту рослин, зокрема способу мікробіологічного захисту картоплі від П ураження фітопатогенними мікроорганізмами, і може бути використаний для зберігання врожаю картоплі, а також для передпосівної обробки бульб з метою зменшення захворюваності в процесі вегетації.

Найбільш близьким є спосіб захисту картоплі з допомогою препарату "бацифіт" - порошка, який містить синтезований *B. subtilis* антибіотик. Однак спосіб має високу вартість внаслідок високої вартості бацифіту. Спосіб рекомендують використовувати, по цій причині, у первинному насінництві.

В основу винаходу поставлено задачу розробки способу захисту картоплі від фітопатогенних мікроорганізмів обробкою її антимікробним засобом, в якому шляхом заміни одного антимікробного засобу іншим, досягалося би підвищення ефективності способу, зниження його собівартості та забезпечення екологічної безпеки.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі захисту картоплі використовують штам *Bacillus subtilis* 934, який має, у порівнянні з прототипом, вищі антагоністичні властивості до збудників хвороб мікробіологічного походження. Вказаний штам є екологічно безпечним мікроорганізмом, виділеним із органічного добрива - гною великої рогатої худоби. Штам депонований в колекції відділу антибіотиків інституту мікробіології та вірусології-Ім. Д.К. Заболотного АН України під № 934, в колекціях мікроорганізмів Ужгородського держуніверситету та кооперативу "Біос" під номером В 934. Штам має характерні для свого виду фізіолого-біохімічні властивості і є непатогенним для теплокровних.

Суть винаходу полягає в тому, що культура штаму-антагоніста, нанесена на поверхню бульб, здатна запобігти розвитку збудників хвороб у процесі зберігання врожаю картоплі, а також знизити захворюваність під час вегетації. Крім цього, використання живої культури непатогенного для теплокровних штаму *Bacillus subtilis* 934 є значно дешевшим, ніж використання антибіотиковмісного препарату бацифіту.

Приклад 1.

Бульбу картоплі розрізають пополам. На одну поверхню розрізу наносять повну мікробіологічну петлю культури *Bacillus subtilis* 934, вирощеної при 28°C на картопляному агарі за одну добу. Неінокульована частина бульби є контрольною. Обидві частини бульби поміщають у вогу камеру на 5 днів (ексікатор з водою) так, щоб непорушена поверхня бульби була завжди зволожена (бульбу накладають на марлю, складену у кілька разів і замочену по П краям у воду). Пошкодження на обох половинах бульб не розвивається.

Приклад 2.

На пластинки картопляного агару в чашках Петрі засівають штрихами по краям пластинок антагоніст *Bacillus subtilis* 934. Із суспензії у фізіологічному розчині  $9,35 \times 10^8$  кл/мл підсівають перпендикулярними штрихами культури патогенних для картоплі мікроорганізмів (у випадку міцеліальних форм міцелієм Інокулюють центр пластинок). Вирощують при температурі 30°C до появи зон відсутності росту патогенів поблизу макроколоній штаму-антагоніста. Аналогічно досліджують спектр антагоністичної дії бацифіту. Для цього скальпелем стерильно насипають близько 1 г препарату прямими рядками по краям агарових пластинок по два рядки на пластинку, протилежно паралельно один одному. Потім паралельно до рядків із суспензій підсівають культури фітопатогенів, а у випадку міцеліальних форм Інокулюють центр агарових пластинок.

На основі цих дослідів порівнюють спектр антагоністичної дії *B. subtilis* 934 та спектр дії на фітопатогенні мікроорганізми бацифіту. (Таблиця 1).

Таким чином, спектр дії на фітопатогенні мікроорганізми антимікробних речовин *B. subtilis* 934 не є вужчим, ніж спектр дії бацифіту. В окремих випадках штам-антагоніст пригнічує ріст нечутливих до бацифіту мікроорганізмів.

Приклад 3.

Кожну бульбу картоплі розрізають на дві рівні частини. Одні половини накладають поверхню розрізу на газони *B. subtilis* 934. Роблять відбитки, дають підсохнути. Потім на кожну половину по поверхні зрізу (штрихом по діаметру площини розрізу) засівають повну петлю тієї або Іншої культури фітопатогенного мікроорганізму (Таблиця 1). Всі бульби (контролем служать неінокульовані розрізи) поміщають у вищеописаній вогкій камері на 5 діб. В результаті, на необроблених розрізах бульб виростають колонії того чи Іншого патогенного для картоплі мікроорганізму, розвивається ураження бульб. Оброблені *B. subtilis* 934 розрізи не піддаються ураженню. При опудрюванні поверхні розрізів бацифітом нечутливі до нього мікроорганізми здатні розвиватись на розрізах картоплі. При цьому використовують тестмікроорганізми із таблиці 1. Тут і в прикладі 1 вогу камеру витримують при кімнатній температурі.

Приклад 4.

Одну партію картоплі перед посадкою у відкритий ґрунт обробляють шляхом опудрювання бацифітом, а іншу - шляхом опудрювання порошком, отриманим після подрібнення висушеної при 70°C біомаси штаму *B. subtilis* 934. Висаджують у відкритий ґрунт. Контролем служить необ-роблена картопля, яку теж висаджують у відкритий ґрунт.

Восени з ділянок, зайнятих картоплею, обробленою бацифітом, штамом-антагоністом *B. subtilis* 934 і необробленою картоплею, проводять відбір зразків картоплі і на кожні 100 картоплин підраховують кількість уражених хворобами мікробіологічного походження. Дослід проводять у 3-кратній повторності, використовуючи 9 рівноцінних ділянок. Результати дослідів представлені в таблиці 2.

Таким чином, використання для передпосівної обробки дає більший захисний ефект, ніж застосування бацифіту.

Приклад 5.

Перед закладкою бульб на зберігання, одну їх партію обробляють водною суспензією 10 млрд. кл/мл *B. subtilis* 934, а Іншу - водним розчином бацифіту 10 мг/мл. Підсушують шляхом вентиляції і зберігають, як звичайно, в дерев'яних контейнерах по 1000 картоплин в умовах овочесховища. Через 6 місяців із кожного контейнера перебирають картоплю і виявляють пошкоджену фітопатогенними мікроорганізмами. (Таблиця 3).

Таким чином, застосування *B. subtilis* 934 для обробки бульб перед закладкою на зберігання дає кращий профілактичний ефект, ніж прототип - бацифіт.

Приклад 6.

Приготування стандартного препарату для захисту картоплі здійснюють наступним чином.  
 Культуру *B. subtilis* 934 вирощують протягом 7 діб на агаризованому середовищі (сусло-агар) при 37°C. Суспензію штаму-антагоніста *B. subtilis* 934 - 50 млрд. кл/мл готують на захисному сахарозо-желатиновому середовищі наступного складу: NaCl - 0,85 г, желатин - 1 г, сахароза - 4 г, дистильована вода - 100 мл. Одержану суміш розливають в стерильні 10 мл ампули по 2 мл і поміщають при температурі не вище -20°C не менше, ніж на 24 год. Ліофілізацію препарату проводять на протязі 30 год. Режим ліофілізації від -20 до +30°C з поступовим підвищенням температури на 2-3°C.

Таким чином одержують ампули із вмістом 100 млрд. кл *B. subtilis* 934.

Строк зберігання препарату 3 роки при 4-20°C.

Препарати інших концентрацій клітин *B. subtilis* 934 одержують аналогічно.

Таблиця 1

Спектр дії *B. subtilis* 934 та препарату бацифіту на патогенні для картоплі мікроорганізми

| Тест-штами   | Антимікробний агент    |         |
|--|------------------------|---------|
|  | <i>B. subtilis</i> 934 | бацифіт |
| <i>Erwinia carotovora</i><br>subsp. <i>atroseptica</i> :a  |                        |         |
| 1A   | +                      | +       |
| 47A  | +                      | +       |
| 40A  | +                      | +       |
| 36A  | +                      | +       |
| 22A  | +                      | +       |
| G 125  | +                      | +       |
| 5A   | +                      | +       |
| YA7  | +                      | -       |
| YA9  | +                      | -       |
| <i>Erwinia carotovora</i><br>subsp.<br><i>carotovora</i> · |                        |         |
| 45   | +                      | -       |
| 48A  | +                      | +       |
| 75   | +                      | -       |
| 8351   | +                      | +       |
| 8896   | +                      | +       |
| 4A   | +                      | +       |
| 88n  | +                      | +       |
| 27n  | +                      | +       |
| 8897   | +                      | +       |
| 8906   | +                      | +       |
| 67A  | +                      | +       |

Продовження табл. 1

| Тест-штами                           | Антимікробний агент    |         |
|--------------------------------------|------------------------|---------|
|                                      | <i>B. subtilis</i> 934 | бацифіт |
| 13A                                  | +                      | +       |
| 5n                                   | +                      | +       |
| 8898                                 | +                      | +       |
| 258                                  | +                      | +       |
| 8983                                 | +                      | +       |
| 8987                                 | +                      | +       |
| 8895                                 | +                      | +       |
| J2                                   | +                      | +       |
| <i>Pseudomonas solanacearum</i> 8885 |                        |         |
| 8457                                 | +                      | +       |
| 8635                                 | +                      | +       |
| <i>Pseudomonas xanthochlora</i>      |                        |         |
| 8482                                 | +                      | +       |
| 8884                                 | +                      | +       |
| 8946                                 | +                      | +       |
| <i>Bacillus polymyxa</i>             |                        |         |
| Y1                                   | +                      | -       |
| Y4                                   | +                      | +       |
| Y7                                   | +                      | +       |
| Y9                                   | +                      | +       |
| <i>Bacillus subtilis</i>             |                        |         |
| 21                                   | +                      | +       |
| 28                                   | +                      | -       |
| 29                                   | +                      | +       |
| <i>Clostridium puniceum</i>          |                        |         |
| U5                                   | +                      | +       |
| U8                                   | +                      | +       |
| U9                                   | +                      | +       |
| <i>Corynebacterium sepedonicum</i>   |                        |         |
| 211                                  | +                      | +       |
| 313                                  | +                      | +       |
| 402                                  | +                      | +       |

Продовження табл. 1

| Тест-штами                    | Антимікробний агент    |         |
|-------------------------------|------------------------|---------|
|                               | <i>B. subtilis</i> 934 | бацифіт |
| <i>Alternaria solani</i>      |                        |         |
| 126                           | +                      | +       |
| 129                           | +                      | -       |
| <i>Oospora pustulans</i>      |                        |         |
| 1125                          | +                      | +       |
| 1126                          | +                      | +       |
| <i>Phoma solanicola</i>       |                        |         |
| 77                            | +                      | +       |
| 81                            | +                      | +       |
| <i>Phytophthora infestans</i> |                        |         |
| Y1                            | +                      | +       |
| Y2                            | +                      | +       |
| <i>Fusarium sambucinum</i>    |                        |         |
| B10                           | +                      | +       |
| B13                           | +                      | +       |
| <i>Streptomyces scabies</i>   |                        |         |
| S4                            | +                      | -       |
| S7                            | +                      | +       |

"+" – наявність, "-" – відсутність антимікробної дії.

Таблиця 2

Виявлення під час збору врожаю картоплин, уражених хворобами мікробіологічного походження

| Показники<br>обліку          | Варіанти дослідів |         |                        |         |          |         |
|------------------------------|-------------------|---------|------------------------|---------|----------|---------|
|                              | бацифіт           |         | <i>B. subtilis</i> 934 |         | контроль |         |
|                              | 1991 р.           | 1992 р. | 1991 р.                | 1992 р. | 1991 р.  | 1992 р. |
| Всього бульб у зразку хворих | 100               | 100     | 100                    | 100     | 100      | 100     |
|                              | 14                | 13      | 9                      | 7       | 16       | 14      |

Таблиця 3

Виявлення після шести місяців зберігання картоплі бульб, уражених фітопатогенними мікроорганізмами

| Показники<br>обліку   | Варіанти досліду |         |                 |         |          |         |
|-----------------------|------------------|---------|-----------------|---------|----------|---------|
|                       | бацифіт          |         | B. subtilis 934 |         | контроль |         |
|                       | 1991 р.          | 1992 р. | 1991 р.         | 1992 р. | 1991 р.  | 1992 р. |
| Всього бульб у зразку | 1000             | 1000    | 1000            | 1000    | 1000     | 1000    |
| хворих                | 27               | 24      | 13              | 11      | 34       | 31      |

П р и м і т к а: В таблиці 3 представлені середні дані по результатам 3-х визначень.