

Strains of soil microorganisms promising for the creation of a complex plant protection product against mycoses and harmful insects

O. A. Drehval, A. A. Dreus, N. V. Cherevach, T. V. Sklyar

Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 17.01.2018

Received in revised form
12.02.2018

Accepted 26.02.2018

*Oles Honchar Dnipro
National University,
Gagarin ave., 72,
Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-056-760-85-14.
E-mail: microviro@ukr.net*

Drehval, O. A., Dreus, A. A., Cherevach, N. V., & Sklyar, T. V. (2018). Strains of soil microorganisms promising for the creation of a complex plant protection product against mycoses and harmful insects. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(1), 69–74. doi: 10.15421/021809

We evaluated the antagonistic activity of 23 strains of *Bacillus* spp. against phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus niger*. The antagonistic activity was tested by agar diffusion (the method of blocks). For determining the influence of bacteria on barley plants, ardent seeds were treated by cultural liquid (dilution 1 : 10) for 2 hours and germinated in Petri dishes on moist filter paper. The fungistatic effect of *Bacillus* spp. separately and in combination with entomopathogens (in equal ratio) was determined by the level of inhibition of the fungi *Fusarium* spp. on a solid nutrient medium with 5% of the culture liquid. Insecticidal activity of microorganisms was determined in the model experiments by the percentage of death of the caterpillar *Archips podana* Scop. Strains of *Bacillus* sp. KMB-3 and *Bacillus* sp. KMB-6 inhibited the growth of all test cultures (zones of growth inhibition 11.4–30.6 and 11.5–29.4 mm, respectively). We established the absence of antagonism between selected strains and entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* IMB-7186, fungi *Beauveria bassiana* IMB-F-100043. We found that treatment of barley seeds with culture liquids of *Bacillus* sp. KMB-3 and *Bacillus* sp. KMB-6 didn't have a negative effect on the morphometric indices and dry weight of seedlings. We established that the highest percentage of growth inhibition of *F. culmorum* IMB-F-50716 was provided by a complex of *Bacillus* sp. KMB-3, *B. bassiana* IMB-F-100043 and *B. thuringiensis* IMB-7186, whose action was at the same level as the action of monoculture *Bacillus* sp. KMB-3 (85.4% and 84.7%, respectively). The highest percentage inhibition of growth of *F. oxysporum* IMB-F-54201 was provided by a complex of strains of *Bacillus* sp. KMB-3 and *B. bassiana* IMB-F-100043, whose effect was slightly inferior to that of the monoculture *Bacillus* sp. KMB-3 (68.4% and 75.1%, respectively). The insecticidal activity of complexes *Bacillus* sp. KMB-3, *B. bassiana* IMB-F-100043, *B. thuringiensis* IMB-7186 or *Bacillus* sp. KMB-6, *B. bassiana* IMB-F-100043, *B. thuringiensis* IMB-7186 insignificantly differed from that of the complex entomopathogens *B. bassiana* IMB-F-100043 and *B. thuringiensis* IMB-7186 (71.1%, 73.3% death versus 80.0%). The selected microbial complexes can be considered as promising for the development of a preparation for the protection of plants against fungal diseases and harmful insects.

Keywords: antifungal action; *Bacillus* sp.; biocontrol; plant diseases; phytotoxicity; insecticidal activity

Штами ґрунтових мiкроорганiзмiв, перспективнi для створення комплексного препарату захисту рослин вiд мiкозiв та шкiдливих комах

О. А. Дрегваль, А. А. Дреус, Н. В. Черевач, Т. В. Скляр

Днiпровський нацiональний унiверситет iменi Олеса Гончара, Днiпро, Україна

Оцiнено антагонiстичну активнiсть 23 штамiв *Bacillus* spp. вiдносно фiтопатогенних грибiв *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata* та *Aspergillus niger*. Антагонiстичну активнiсть перевiряли методом дифузiї в агар за дiаметром зон затримання росту навколо блокiв. Для визначення впливу бактерiї на рослини ярого ячменю насiння обробляли культуральною рiдиною (розведення 1 : 10) упродовж двох годин i пророщували в чашках Петрi на зволоженому фiльтрувальному паперi. Фунгiстатичну дiю *Bacillus* spp. окремо та в комплексi з ентомопатогенами (в однаковому спiввiдношеннi) визначали за рiвнем пригнiчення грибiв *Fusarium* spp. на щiльному живильному середовищi, до складу якого входило 5% культуральної рiдини. Инсектицидну активнiсть мiкроорганiзмiв визначали в модельних експериментах за вiдсотком загибелi гусениць *Archips podana* Scop. Вiдiбрано штами *Bacillus* sp. KMB-3 та *Bacillus* sp. KMB-6, що пригнiчували рiст усiх дослiджуваних тест-культур. Установлено вiдсутнiсть антагонiзму мiж вiдiбраними штамами та ентомопатогенними бактерiями *Bacillus thuringiensis* IMB-7186 i грибами *Beauveria bassiana* IMB-F-100043. Показано, що обробка насiння ярого ячменю культуральними рiдинами *Bacillus* sp. KMB-3 та *Bacillus* sp. KMB-6 негативно не впливала на морфометричнi показники та суху вагу проросткiв. Найбiльший вiдсоток iнгiбування росту *F. culmorum* IMB-F-50716 забезпечив комплекс *Bacillus* sp. KMB-3, *B. bassiana* IMB-F-100043, i *B. thuringiensis* IMB-7186, для якого була на рiвнi дiї монокультури *Bacillus* sp. KMB-3 (85,4% та 84,7% вiдповiдно). Найбiльше пригнiчення росту *F. oxysporum* 54201 забезпечив комплекс *Bacillus* sp. KMB-3 i *B. bassiana* IMB-F-100043, для якого незначно поступалася дiї

монокультури (68,4% та 75,1% відповідно). У модельних досліджах інсектицидна активність комплексів *Bacillus* sp. КМВ-3, *B. bassiana* ІМВ-F-100043, *B. thuringiensis* ІМВ-7186 або *Bacillus* sp. КМВ-6, *B. bassiana* ІМВ-F-100043, *B. thuringiensis* ІМВ-7186 відносно гусениць *Archips podana* Scop. незначно відрізнялася від дії ентомопатогенів *B. bassiana* ІМВ-F-100043 і *B. thuringiensis* ІМВ-7186 (71,1% та 73,3% загибелі проти 80,0%). Підібрані мікробні комплекси можуть бути використані для розроблення біопрепарату захисту рослин від грибкових хвороб і шкідників.

Ключові слова: антифунгальна дія; *Bacillus* spp.; біоконтроль; хвороби рослин; фітотоксичність; інсектицидна активність

Вступ

Хімічні пестициди широко застосовують для захисту сільськогосподарських рослин від збудників захворювань і комах-шкідників. Це один із найважливіших елементів інтенсивних сільськогосподарських технологій, спрямованих на отримання високих і стабільних врожаїв рослин (Lutynska & Ponomarenko, 2010). Проте хімічні препарати екологічно небезпечні, оскільки повільно розкладаються, продукти їх розпаду потрапляють у ґрунт і негативно впливають на біоту (Meena & Kanwar, 2015). У результаті інтенсивного застосування пестицидів знижується чисельність і життєздатність ґрунтових сапрофітних мікроорганізмів, і навпаки, підвищується вміст шкідливих організмів, що викликає поступове зниження родючості ґрунтів та зменшення виробництва сільськогосподарської продукції. Необхідність отримання екологічно чистої продукції вимагає розширення досліджень, пов'язаних із розробленням систем біологічного захисту, що не порушують екологічної рівноваги ґрунту, сприяють поліпшенню його фітосанітарного стану (Lutynska & Ponomarenko, 2010; Hollensteiner et al., 2017).

Серед антагоністів фітопатогенних мікроорганізмів слід відмітити представників роду *Bacillus*, які продукують різні антимікробні речовини, такі як циклічні ліпопептиди, а також літичні ферменти та хітинази (Alvarez et al., 2012; Ji et al., 2013; Meena & Kanwar, 2015; Yamamoto et al., 2015; Bodhankar et al., 2017; Dimkić et al., 2017; Molinatto et al., 2017; Rishad et al., 2017). Ліпопептиди, які продукуються *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* (міко-субтилін, фенгіцини А і В, ітурин), проявляють антифунгальну дію, тоді як сурфактин має широкий спектр антибактеріальної дії (Ji et al., 2013; Khong et al., 2013; Meena & Kanwar, 2015). Крім того, широко розповсюджені у ґрунті бактерії *B. amyloliquefaciens* синтезують амілолізин, який не належить до ліпопептидів і пригнічує ріст переважно грампозитивних бактерій (Chen et al., 2016).

Переваги циклічних ліпопептидів порівняно з хімічними засобами захисту рослин – низька токсичність, високий ступінь біодеградації та безпечність для навколишнього середовища (Meena & Kanwar, 2015; Chen et al., 2016). Серед інших представників роду *Bacillus* слід відмітити широко відомий ентомопатогенний мікроорганізм *B. thuringiensis*, деякі штами якого здійснювали антагоністичний вплив на фітопатогенні гриби роду *Verticillium*. Автори припускають, що значний внесок в антифунгальну дію, крім вторинних метаболітів, вносять міколітичні хітинази, які продукуються цими штамами (Hollensteiner et al., 2017). Із ризосфери кукурудзи нещодавно виділено штаму *Lysinibacillus sphaericus*, який крім ларвіцидних метаболітів продукував 2-пентил-4-хінолінкарбоную кислоту, що проявляє антифунгальну дію різного ступеня проти фітопатогенних грибів *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus* sp., *Sclerotinia* sp., *Bipolaris spicifera*, *Trichophyton* sp. (Naureen et al., 2017). Ґрунтові штами бацил входять до складу ризосфери та не тільки захищають кореневу систему від збудників хвороб, а і продукують біологічно-активні речовини, що стимулюють ріст і розвиток рослин, такі як індолілоцтова кислота, сприяють солібілізації фосфатів і силікатів, а також індують підвищення резистентності рослин до збудників мікозів (Khong et al., 2013; Yamamoto et al., 2015; Hollensteiner et al., 2017; Naureen et al., 2017). На їх основі розробляються біологічні препарати для захисту та поліпшення живлення сільськогосподарських рослин. Більшість розроблених мікробних препаратів для захисту рослин від хвороб і шкідників створено на основі монокультур мікроорганізмів. Останнім часом зусилля науковців спрямовані на створення мікробних препаратів комплексної дії на основі асоціацій мікроорганізмів (Srivastava et al., 2010; Egamberdieva et al., 2016, 2017).

Автори статті розробили комплексний інсекто-акарицидний мікробний препарат Бактофунгін-LS на основі ентомопатогенних

мікроорганізмів *B. thuringiensis* ІМВ-7186 та *Beauveria bassiana* ІМВ-F-100043, який показав високу активність проти широкого спектра комах-шкідників (Drehval et al., 2015). Враховуючи потреби сільськогосподарського виробництва щодо збереження врожаю, доцільно розширити сфери застосування цього препарату не тільки проти шкідників, а і проти збудників грибних хвороб.

Мета цієї статті – виділення бактерій роду *Bacillus* – антагоністів фітопатогенних грибів, перевірка відсутності фітотоксичності виділених культур, визначення взаємовідносин бактерій-антагоністів з ентомопатогенними мікроорганізмами, що входять до складу бактофунгіну, дослідження фунгістатичної дії комплексів антагоністів фітопатогенів та ентомопатогенів відносно грибів роду *Fusarium*, а також інсектицидної активності відносно гусениць *Archips podana* Scop.

Матеріал і методи досліджень

Антагоністичну активність штамів ґрунтових бактерій відносно фітопатогенних грибів перевіряли методом дифузії в агар за діаметром зон затримання росту навколо блоків. Як тест-культури використано штами фітопатогенних грибів із колекції відділу фізіології та систематики мікроміцетів ІМВ НАН України *Fusarium oxysporum* ІМВ-F-54201, *F. culmorum* ІМВ-F-50716, *Cladosporium herbarum* ІМВ-F-16878, а також штами з колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ДНУ імені Олеся Гончара, виділені зі зразків ґрунту, ураженого насіння та плодів: *F. oxysporum* КМВ-F-12, *F. moniliforme* КМВ-F-23, *Alternaria alternata* КМВ-F-16, *Aspergillus niger* КМВ-F-25. Фітопатогенні гриби вирощували на картопляному агарі з 1% глюкози. Взаємовідносини бактерій-антагоністів з ентомопатогенними мікроорганізмами визначали вищезгаданим методом дифузії в агар.

Для перевірки відсутності фітотоксичної дії штамі на рослини ярого ячменю сорту Кристалія бактерії вирощували у м'ясопептонному бульйоні (МПБ) на мікробіологічній качалці (200 об./хв) за 29 °С три доби. Насіння ячменю (100 насінин) обробляли культуральною рідиною у розведенні 1 : 10 упродовж двох годин і пророщували в чашках Петрі на зволоженому фільтрувальному папері. На четверту добу досліду визначали відсоток пророслого насіння, довжину та суху масу коренів і надземної частини рослин. Як контроль використовували насіння, оброблене стерильною водопровідною водою.

Для визначення фунгістатичної дії антагоністів та ентомопатогенів окремо кожного та в комплексі (у рівних співвідношеннях) культуральні рідини мікроорганізмів вносили у розплавлене живильне середовище Чапека (5% від об'єму) в чашки Петрі, на поверхню якого після застигання розміщували блок 10-добової культури грибів *F. oxysporum* ІМВ-F-54201 або *F. culmorum* ІМВ-F-50716. Визначали відсоток інгібування росту грибів на шосту добу порівняно з контролем (середовищем без культуральної рідини).

Інсектицидну активність культуральних рідин мікроорганізмів (розведення 1 : 10) визначали у модельних досліджах за відсотком загибелі гусениць *Archips podana* Scop. Контролем слугували комахи, корм яких обробляли водопровідною водою. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Statistica 6 (StatSoft Inc., USA). Достовірність відмінностей результатів визначали із застосуванням ANOVA.

Результати

Зі зразків ґрунту чорнозему звичайного виділено 23 ізоляти грампозитивних аеробних і факультативно-анаеробних споротвірних бактерій, які попередньо віднесено до роду *Bacillus*, та досліджено на антагоністичну активність відносно штамів фітопатоген-

них грибів – збудників фузаріозу (*F. oxysporum* КМВ-F-12, *F. oxysporum* ІМВ-F-54201, *F. culmorum* ІМВ-F-50716, *F. moniliforme* КМВ-F-23), альтернاریозу (*A. alternata* КМВ-F-16), чорної цвіль (*A. niger* КМВ-F-25), кладоспоріозу (*C. herbarum* ІМВ-F-16878). Із 23 ізолятів 14 проявили фунгістатичну дію (табл. 1).

Найперспективнішими за спектром дії виявилися штами КМВ-3 та КМВ-6, які пригнічували ріст усіх перевірених тест-культур, також із дещо меншим спектром високу антагоністичну дію проявили штами КМВ-5 та КМВ-8. Серед перевірених тест-культур найчутливішими до дії виділених штамів бактерій виявилися *A. alternata* КМВ-F-16, *A. niger* КМВ-F-25 та *C. herbarum* ІМВ-F-16878, найстійкішими – *F. oxysporum* КМВ-F-12 і *F. oxysporum* ІМВ-F-54201 (рис. 1).

Таблиця 1

Антагоністична активність штамів бактерій роду *Bacillus* до фітопатогенних грибів (n = 8)

Штамі бактерій	Діаметр зони пригнічення росту тест-культур, мм						
	<i>Fusarium oxysporum</i> КМВ-F-12	<i>Fusarium oxysporum</i> ІМВ-F-54201	<i>Fusarium culmorum</i> ІМВ-F-50716	<i>Fusarium moniliforme</i> КМВ-F-23	<i>Alternaria alternata</i> КМВ-F-16	<i>Aspergillus niger</i> КМВ-F-25	<i>Cladosporium herbarum</i> ІМВ-F-16878
КМВ-1	0	13,2 ± 0,3	0	11,2 ± 0,3	0	0	0
КМВ-2	0	0	20,6 ± 1,0	20,4 ± 0,8	24,0 ± 0,7	20,2 ± 0,5	26,1 ± 1,1
КМВ-3	13,3 ± 0,3	11,4 ± 0,3	18,5 ± 0,7	21,5 ± 0,6	30,6 ± 1,2	24,2 ± 0,7	28,3 ± 2,0
КМВ-4	12,4 ± 0,4	0	13,3 ± 0,5	0	0	0	15,2 ± 0,8
КМВ-5	0	17,5 ± 0,7	21,4 ± 1,2	19,6 ± 0,5	28,5 ± 0,9	25,1 ± 0,9	27,4 ± 1,0
КМВ-6	11,5 ± 0,2	15,2 ± 0,9	23,2 ± 1,5	20,5 ± 0,7	27,2 ± 0,6	29,4 ± 0,6	23,5 ± 0,9
КМВ-7	15,3 ± 0,8	15,1 ± 0,6	0	19,3 ± 0,2	27,3 ± 0,8	19,5 ± 0,3	26,5 ± 0,5
КМВ-8	0	18,5 ± 0,8	20,0 ± 0,9	20,7 ± 0,3	25,5 ± 0,4	25,5 ± 0,8	28,1 ± 0,6
КМВ-9	16,2 ± 0,9	0	10,5 ± 0,1	0	0	0	0
КМВ-10	12,0 ± 0,3	0	0	0	0	0	0
КМВ-11	0	0	0	0	12,5 ± 0,2	9,5 ± 0,2	13,2 ± 0,3
КМВ-12	10,5 ± 0,2	10,3 ± 0,2	14,5 ± 0,6	0	12,0 ± 0,5	0	0
КМВ-13	0	11,2 ± 0,3	0	12,0 ± 0,4	0	10,4 ± 0,1	0
КМВ-14	12,2 ± 0,4	12,4 ± 0,5	13,3 ± 0,5	10,0 ± 0,6	0	0	13,3 ± 0,4

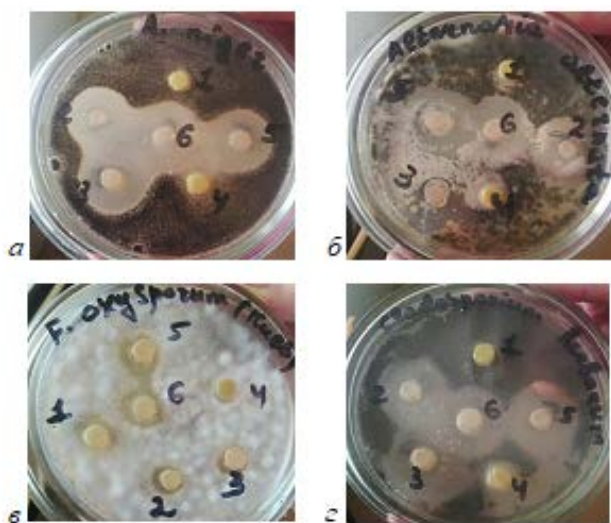


Рис. 1. Вплив штамів бактерій роду *Bacillus* на ріст фітопатогенних грибів: а – *Aspergillus niger* КМВ-F-25; б – *Alternaria alternata* КМВ-F-16; в – *Fusarium oxysporum* ІМВ-F-54201; г – *Cladosporium herbarum* ІМВ-F-16878; 1–6 – номери штамів-антагоністів

Таблиця 2

Вплив штамів бактерій-антагоністів на формування проростків ярого ячменю сорту Кристалія (n = 100)

Варіант обробки	Частка пророслого насіння, %	Середня довжина пагонів, мм	Середня довжина коренів, мм
<i>Bacillus</i> sp. КМВ-3	91,0 ± 1,9	38,8 ± 2,0	261,0 ± 6,3
<i>Bacillus</i> sp. КМВ-6	84,0 ± 6,6	38,3 ± 2,8	246,7 ± 18,4
Контроль	95,0 ± 2,2	43,1 ± 2,9	264,7 ± 26,4

Розробляючи біопрепарати для захисту рослин, необхідно здійснювати випробування на фітотоксичність мікробних культур. Наші дослідження на рослинах ячменю ярого сорту Кристалія показали відсутність фітотоксичної дії *Bacillus* sp. КМВ-3 та *Bacillus*

Оскільки основна мета дослідження – пошук мікробів-антагоністів для створення комплексного біопрепарату для захисту рослин від шкідників і хвороб, здійснено перевірку взаємодіювання відібраних вищезгаданих штамів антагоністів та ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* ІМВ-7186 та грибів *B. bassiana* ІМВ-F-100043 – компонентів біопрепарату Бактофунгін-LS (рис. 2).

Усі досліджені штамі не пригнічували ріст *B. thuringiensis* ІМВ-7186, три штамі (КМВ-3, КМВ-5, КМВ-6) також не пригнічували ріст *B. bassiana* ІМВ-F-100043, штамі КМВ-8 показав незначне інгібування росту *B. bassiana*. Враховуючи активність і спектр дії виділених антагоністів, для подальшої роботи обрано два штамі баціл (КМВ-3 та КМВ-6).

сп. КМВ-6 за морфометричними показниками та сухою вагою проростків. Незначні різниці відсотка пророслого насіння, довжини пагонів і коріння проростків та їх сухої ваги статистично не достовірні (табл. 2, рис. 3).

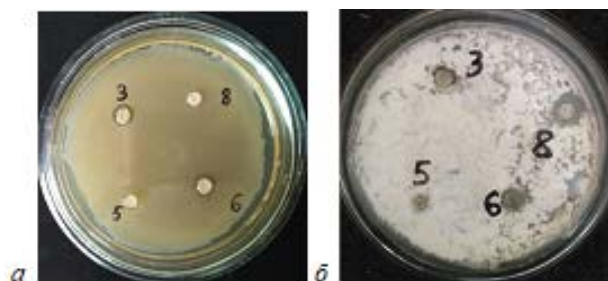


Рис. 2. Вплив найактивніших штамів-антагоністів фітопатогенних грибів на ріст ентомопатогенних мікроорганізмів: а – *Bacillus thuringiensis* ІМВ-7186; б – *Beauveria bassiana* ІМВ-F-100043; 3, 5, 6, 8 – номери штамів-антагоністів

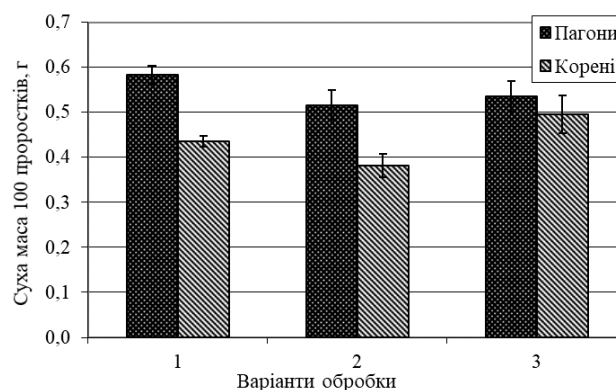


Рис. 3. Суха маса коренів та пагонів ярого ячменю сорту Кристалія за обробки культуральною рідиною бактерій: 1 – *Bacillus* sp. КМВ-3; 2 – *Bacillus* sp. КМВ-6; 3 – контроль (n = 100)

Для створення комплексного препарату важливо дослідити спільну дію всіх компонентів мікробного комплексу на збудників грибних хвороб рослин. Випробовано дію комплексів на гриби роду *Fusarium*, оскільки, з одного боку, вони завдають найбільших збитків сільськогосподарському виробництву, з іншого – ці гриби виявилися менш чутливими до дії виділених антагоністів.

Попередня перевірка антагоністичних властивостей ентомопатогенних мікроорганізмів показала відсутність фунгістатичної дії *B. thuringiensis* IMB-7186 і, навпаки, суттєве інгібування росту фузаріїв культурою *B. bassiana* IMB-F-100043. Тому дію мікроб-

них комплексів, що склалися зі штаму-антагоніста та ентомопатогена *B. bassiana* IMB-F-100043 і штаму-антагоніста та штамів *B. bassiana* IMB-F-100043 і *B. thuringiensis* IMB-7186 порівнювали з дією монокультур штамів-антагоністів (табл. 3, 4).

Найбільший відсоток інгібування росту *F. culmorum* IMB-F-50716 забезпечив комплекс *Bacillus* sp. KMB-3, *B. bassiana* IMB-F-100043 і *B. thuringiensis* IMB-7186, дія якого була на рівні дії монокультури *Bacillus* sp. KMB-3. Найбільше пригнічення росту *F. oxysporum* IMB-F-54201 забезпечив комплекс *Bacillus* sp. KMB-3 і *B. bassiana* IMB-F-100043, дія якого дещо поступалася дії монокультур.

Таблиця 3

Комплексна дія штамів-антагоністів та *B. thuringiensis* IMB-7186 і *B. bassiana* IMB-F-100043 на лінійний ріст *F. culmorum* 50716 (n = 8)

Варіант досліджу	Діаметр колонії, мм		Інгібування росту, %	
	третя доба	шоста доба	третя доба	шоста доба
Контроль	29,7 ± 1,4	78,5 ± 1,9	–	–
<i>Bacillus</i> sp. KMB-3	12,0 ± 0,3**	12,0 ± 0,3**	59,6	84,7
<i>Bacillus</i> sp. KMB-6	11,4 ± 0,3**	11,1 ± 0,2***	61,6	85,9
<i>B. thuringiensis</i> IMB-7186	30,1 ± 1,5	83,2 ± 1,1	0,0	0,0
<i>B. bassiana</i> IMB-F-100043	10,7 ± 0,3***	15,5 ± 1,3*	64,0	80,3
<i>Bacillus</i> sp. KMB-3 + <i>B. bassiana</i> IMB-F-100043	11,3 ± 0,3**	11,5 ± 0,3***	62,0	85,4
<i>Bacillus</i> sp. KMB-6 + <i>B. bassiana</i> IMB-F-100043	14,2 ± 0,9*	13,7 ± 0,3*	52,2	82,5
<i>Bacillus</i> sp. KMB-3 + <i>B. bassiana</i> IMB-F-100043 + <i>B. thuringiensis</i> IMB-7186	11,3 ± 0,7**	11,3 ± 0,2***	62,0	85,6
<i>Bacillus</i> sp. KMB-6 + <i>B. bassiana</i> IMB-F-100043 + <i>B. thuringiensis</i> IMB-7186	15,2 ± 0,4*	14,8 ± 1,2*	48,8	81,1

Примітка: * – P < 0,05, ** – P < 0,01, *** – P < 0,001 відносно контролю – ростом гриба за відсутності культуральних рідин мікроорганізмів у середовищі.

Таблиця 4

Комплексна дія штамів-антагоністів та *B. thuringiensis* IMB-7186 і *B. bassiana* IMB-F-100043 на лінійний ріст *F. oxysporum* IMB-F-54201 (n = 8)

Варіант досліджу	Діаметр колонії, мм		Інгібування росту, %	
	третя доба	шоста доба	третя доба	шоста доба
Контроль	44,3 ± 0,6	85,4 ± 0,4	–	–
<i>Bacillus</i> sp. KMB-3	23,4 ± 2,6*	21,3 ± 1,3***	47,2	75,1
<i>Bacillus</i> sp. KMB-6	23,9 ± 1,7*	25,6 ± 1,6**	46,1	70,0
<i>B. thuringiensis</i> IMB-7186	45,3 ± 2,3	87,5 ± 1,2	0,0	0,0
<i>B. bassiana</i> IMB-F-100043	18,9 ± 0,7**	21,2 ± 3,3**	57,3	75,2
<i>Bacillus</i> sp. KMB-3 + <i>B. bassiana</i> IMB-F-100043	25,5 ± 2,9*	27,0 ± 2,7*	42,4	68,4
<i>Bacillus</i> sp. KMB-6 + <i>B. bassiana</i> IMB-F-100043	29,8 ± 1,4*	29,4 ± 2,0*	22,7	65,6
<i>Bacillus</i> sp. KMB-3 + <i>B. bassiana</i> IMB-F-100043 + <i>B. thuringiensis</i> IMB-7186	33,2 ± 0,9*	31,4 ± 1,3*	25,1	63,2
<i>Bacillus</i> sp. KMB-6 + <i>B. bassiana</i> IMB-F-100043 + <i>B. thuringiensis</i> IMB-7186	35,2 ± 1,1*	35,4 ± 1,5*	20,6	58,5

Примітка: див. табл. 3.

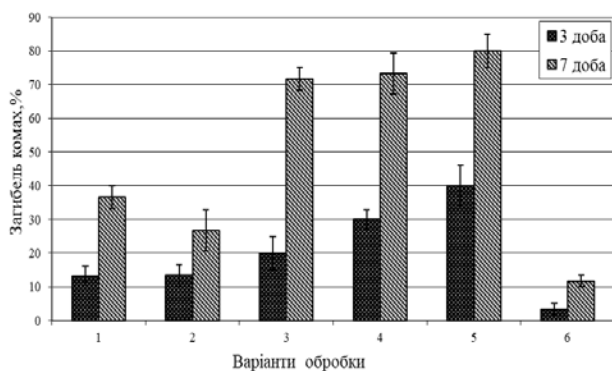


Рис. 4. Інсектицидна активність мікробних культур та їх комплексів відносно гусениць *Archips podana* Scop.:

1 – *Bacillus* sp. KMB-3; 2 – *Bacillus* sp. KMB-6; 3 – *Bacillus* sp. KMB-3 + *B. bassiana* IMB-F-100043 + *B. thuringiensis* IMB-7186; 4 – *Bacillus* sp. KMB-6 + *B. bassiana* IMB-F-100043 + *B. thuringiensis* IMB-7186; 5 – *B. bassiana* IMB-F-100043 + *B. thuringiensis* IMB-7186; 6 – контрольні (незаражені) комахи (n = 8)

Розробляючи склад поліфункціонального мікробного препарату, доцільно перевірити інсектицидну активність комплексів ентомопатогенів із *Bacillus* sp. KMB-3 або *Bacillus* sp. KMB-6. Дію комплексів порівнювали з інсектицидною активністю *B. bassiana*

IMB-F-100043 + *B. thuringiensis* IMB-7186 (Бактофунгін-LS) та дією штамів бацил відносно гусениць листовійки всеїдної (рис. 4).

Інсектицидна активність комплексів *Bacillus* sp. KMB-3, *B. bassiana* IMB-F-100043, *B. thuringiensis* IMB-7186 та *Bacillus* sp. KMB-6, *B. bassiana* IMB-F-100043, *B. thuringiensis* IMB-7186 незначно відрізнялася від дії ентомопатогенів *B. bassiana* IMB-F-100043 + *B. thuringiensis* IMB-7186. Невисоку інсектицидну дію встановлено також для штаму *Bacillus* sp. KMB-3 (36,7% загибелі личинок, P < 0,01 порівняно з контролем).

Обговорення

Ґрунтові штами *Bacillus* spp. характеризувалися різним ступенем і спектром антифунгальної дії. Із даних літератури відомо, що бактерії роду *Bacillus* здатні продукувати різні антимікробні речовини, наприклад, циклічні ліпопептиди, які пригнічують ріст міцелію грибів і проростання конідій мікроміцетів. Зокрема, *B. amyloliquefaciens* CNU114001 продукував ліпопептид ітурин, який характеризувався активністю проти широкого спектра фітопатогенних грибів *Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum orbiculare*, *Penicillium digitatum*, *Pyricularia grisea* та *Sclerotinia sclerotiorum* (Ji et al., 2013). В іншому дослідженні показано, що бактерії того самого виду бацил продукують циклічні ліпопептиди сурфактин С, фенгіцини А і В, які пригнічували ріст *S. sclerotiorum*. Штами *B. amyloliquefaciens* пропонується використовувати для біоконтролю склеротиніального захворювання стовбуровою гниль-

лю (Alvarez et al., 2012). Бактерії, які продукують сурфактин, зазвичай характеризуються антибактеріальною дією. Так, *B. subtilis* 6051 пригнічував ріст *Pseudomonas syringae*, а *B. amyloliquefaciens* KPS46 – *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Meena & Kanwar, 2015). У цьому дослідженні широкий спектр антифунгальної дії показали штами *Bacillus* sp. КМВ-3 і *Bacillus* sp. КМВ-6, які пригнічували ріст усіх протестованих культур фітопатогенів та не проявляли фітотоксичності.

Останнім часом у рослинництві замість препаратів на основі монокультур дослідники пропонують використовувати комплекс різних мікроорганізмів із додатковими або синергічними властивостями. Передпосівна інокуляція комплексом, що складався із симбіотичного азотфіксатора *Mesorhizobium ciceri* IC53 та ендодітного штаму *B. subtilis* NUU4, ефективніше стимулювала ріст бобової рослини *Cicer arietinum* L., а також утворення бульбочок, формування стручків та урожаю порівняно з інокуляцією одним азотфіксатором. Позитивний вплив мікробного комплексу автори пояснюють такими додатковими властивостями *B. subtilis* NUU4 як здатність до утворення індолілоцтової кислоти, солнобілізація фосфатів і зменшення прояву інфекції, спричиненої фітопатогенним грибом *Fusarium solani* (Egamberdieva et al., 2017). Egamberdieva et al. (2016) повідомили про синергетичний вплив комбінованої інокуляції *Mesorhizobium* sp. та *Pseudomonas extremorientalis* TSAU20 на ростові показники лікарської бобової рослини *Glycyrrhiza uralensis* Fish. за сольового стресу. В іншому дослідженні сумісне застосування *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum* і ендомікоризних грибів краще знижувало інфікування томатів *F. oxysporum* f. *lycopersici*, ніж інокуляція одним із цих мікроорганізмів. Комбінована інокуляція знизилася важкість захворювання на 74% у польових умовах, урожайність культури при цьому підвищилася на 20% порівняно з контролем (Srivastava et al., 2010). У нашому дослідженні підібрані комплекси мікроорганізмів проявили фунгістатичну та інсектицидну дію та можуть застосовуватись для захисту рослин від грибових хвороб і комах-шкідників.

Перевірка антагоністичних властивостей ентомопатогенних мікроорганізмів показала відсутність фунгістатичної дії досліджуваного штаму *B. thuringiensis* ІМВ-7186 і, навпаки, суттєве інгібування росту фузаріїв культурою *B. bassiana* ІМВ-F-100043. З даних літератури відомо, що деякі штами *B. thuringiensis*, крім інсектицидної дії, характеризуються високою антагоністичною активністю щодо фітопатогенних мікроміцетів родів *Venturia*, *Verticillium* тощо. Це зумовлено синтезом протигрибових речовин (бацилібактину, цвітерміцину А), а також міколітичних хітиназ, що спричиняють лізис, зміни щільності, товщини та напрямку росту міцелію (Hollensteiner et al., 2017; Palyuka et al., 2017). Внесений у щільне живильне середовище очищений препарат ендохітинази *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM-2803 пригнічував радіальний ріст *Colletotrichum gloeosporioides*, збудника антракнозу рослин. Автори спостерігали пряму кореляцію між концентрацією ендохітинази та рівнем інгібування росту фітопатогену (De la Fuente-Salcido et al., 2016). Крім хітинази штаму *B. thuringiensis* HD1 утворював хітинзв'язувальний білок, локалізований в оболонках спор. Цей білок посилював інсектицидну дію кристалічного білка Cry ІАс та інгібував ріст грибів *Culvularia oryzae*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus*, *Verticillium dahliae*. Хітинзв'язувальний білок діє як синергіст хітинази, внаслідок чого відбувається інтенсивніше пригнічення росту грибів (Agoa et al., 2013). Також відомо, що *B. bassiana*, крім активності проти комах, може виступати антагоністом відносно збудників хвороб рослин. Механізм антагоністичної дії цього гриба дослідники пов'язують зі здатністю продукувати антибіотичні речовини, а також конкуренцією за субстрат та індукцією системної резистентності рослин проти збудників захворювань рослин (Shahid et al., 2012). Отримані нами дані підтверджують здатність штаму *B. bassiana* ІМВ-F-100043 пригнічувати ріст фітопатогенних грибів, проте використаний нами штаму *B. thuringiensis* ІМВ-7186 не пригнічував досліджувані гриби роду *Fusarium*.

Дані наших досліджень свідчать про невисоку інсектицидну активність культуральних рідин *Bacillus* sp. КМВ-3. Із літератур-

них джерел відомо, що деякі антагоністи фітопатогенних грибів, що продукують хітинолітичні ферменти, характеризуються ентомоцидною дією. Rishad et al. (2017) повідомили про виділення та очищення хітинази із *B. pumilus* МСВ-7, що проявляла міколітичну активність відносно *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Ceratophyllum hydrophilum* та *Fusarium oxysporum*. Цей фермент показав також ентомоцидну активність відносно личинок *Scirpophaga incertulas* Walker (Lepidoptera: Pyralidae), шкідника рису. Meena & Kanwar (2015) також встановили, що супернатанти культуральних рідин штаму *B. subtilis*, що продукують ліпопептид сурфактин, показали високу смертність личинок і пупарів комарів видів *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*.

Висновки

Зі зразків ґрунту чорнозему звичайного виділено 23 ізоляти бактерій, віднесених до роду *Bacillus*. Найвищу антагоністичну активність відносно фітопатогенних грибів *Fusarium culmorum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternate* показали штами *Bacillus* sp. КМВ-3 та *Bacillus* sp. КМВ-6. Установлено відсутність антагонізму між відібраними штамами та ентомопатогенними бактеріями *Bacillus thuringiensis* ІМВ-7186 та грибами *Beauveria bassiana* ІМВ-F-100043. Обробка насіння ярого ячменю культуральними рідинами *Bacillus* sp. КМВ-3 та *Bacillus* sp. КМВ-6 негативно не впливала на морфометричні показники та суху вагу проростків. Підібрано мікробні комплекси, до складу яких входять один із відібраних штамів-антагоністів та ентомопатогени *B. thuringiensis* ІМВ-7186 і *B. bassiana* ІМВ-F-100043, що проявляють фунгістатичну дію до фітопатогенних грибів роду *Fusarium* та інсектицидну активність відносно гусениць *Archips podana* Scop.

References

- Alvarez, F., Castro, M., Principe, F., Boroli, G., Fischer, S., Mori, G., & G. Jofre, E. (2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP2 18 and ARP2 3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 159–174.
- Arora, N., Sachdev, B., Gupta, R., Vimala, Y., & Bhatnagar, R. K. (2013). Characterization of a chitin-binding protein from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *PLOS ONE*, 8(6), e66603.
- Bodhankar, S., Grover, M., Hemanth, S., Reddy, G., Rasul, S., Yadav, S. K., Desai, S., Mallappa, M., Mandapaka, M., & Srinivasarao, C. (2017). Maize seed endophytic bacteria: Dominance of antagonistic, lytic enzyme-producing *Bacillus* spp. *3 Biotech*, 7(4), 232.
- Chen, J. N., Wei, C. W., Liu, H. C., Chen, S. Y., Chen, C., Juang, Y. M., Lai, C. C., & Yiang, G. T. (2016). Extracts containing CLPs of *Bacillus amyloliquefaciens* JN68 isolated from chicken intestines exert antimicrobial effects, particularly on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Molecular Medicine Reports*, 14(6), 5155–5163.
- De la Fuente-Salcido, N. M., Casados-Vazquez, L. E., Garcia-Perez, A. P., Barboza-Perez, U. E., Bideshi, D. K., Salcedo-Hernandez, R., Garcia-Almendarez, B. E., & Barboza-Corona, J. E. (2016). The endochitinase ChiA Btt of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM-2803 and its potential use to control the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *MicrobiologyOpen*, 5(5), 819–829.
- Dimkic, I., Stankovic, S., Nisavic, M., Petkovic, M., Ristivojevic, P., Fira, D., & Beric, T. (2017). The profile and antimicrobial activity of *Bacillus lipopeptide* extracts of five potential biocontrol strains. *Frontiers in Microbiology*, 8, 925.
- Drehval, O. A., Vlasenko, O. G., Cherevach, N. V., & Vinnikov, A. I. (2015). Vplyv mikrobnogo preparatu "Baktofungin-LS" na persykovu popelycju u kontrolovanyh umovah [Influence of microbial preparation "Baktofungin-LS" on peach aphid in controlled conditions]. *Agroekologichnyj Zhurnal*, 4, 85–89 (in Ukrainian).
- Egamberdieva, D., Li, L., Lindström, K., & Räsänen, L. A. (2016). A synergistic interaction between salt-tolerant *Pseudomonas* and *Mesorhizobium* strains improves growth and symbiotic performance of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.) under salt stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6), 2829–2841.
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Shurigin, V. V., Hashem, A., & Abd Allah, E. F. (2017). Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1887.

- Hollensteiner, J., Wemheuer, F., Harting, R., Kolarzyk, A. M., Diaz Valerio, S. M., Poehlein, A., Brzuszkiewicz, E. B., Neseemann, K., Braus-Stromeier, S. A., Braus, G. H., Daniel, R., & Liesegang, H. (2017). *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* inhibit the growth of phytopathogenic *Verticillium* species. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2171.
- Iutynska, G. O., & Ponomarenko, S. P. (eds.). (2010). Bioreguljacija mikrobno-rastitel'nyh sistem [Bioregulation of microbial-plant systems]. Nichlava, Kiev (in Russian).
- Ji, S. H., Paul, N. C., Deng, J. X., Kim, Y. S., Yun, B. S., & Yu, S. H. (2013). Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. *Mycobiology*, 41(4), 234–242.
- Khong, N. G., Randoux, B., Deravel, J., Tisserant, B., Tayeh, Ch., Coutte, F., Bourdon, N., Jacques, P., & Reignault, P. (2013). Induction of resistance in wheat by bacterial cyclic lipopeptides. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 78(3), 479–487.
- Meena, K. R., & Kanwar, S. S. (2015). Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: Applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International*, 2015, 473050.
- Molinatto, G., Franzil, L., Steels, S., Puopolo, G., Pertot, I., & Ongena, M. (2017). Key impact of an uncommon plasmid on *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* S499 developmental traits and lipopeptide production. *Frontiers in Microbiology*, 8, 17.
- Naureen, Z., Rehman, N. U., Hussain, H., Hussain, J., Gilani, S. A., Al Housni, S. K., Mabood, F., Khan, A. L., Farooq, S., Abbas, G., & Harrasi, A. A. (2017). Exploring the potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for plant growth promotion and biocontrol activities against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1477.
- Patyka, T. I., Bojko, M. V., & Patyka, M. V. (2017). Biotechnologichna polifunkcional'nist' metabolitnogo sporo-krystalichnogo kompleksu ta osoblyvosti kul'tyvuvannja *Bacillus thuringiensis* [Biotechnological polyfunctionality of the metabolic spore-crystalline complex and *Bacillus thuringiensis* cultivation features]. *Mikrobiologichnyj Zhurnal*, 79(2), 78–85 (in Ukrainian).
- Rishad, K. S., Rebello, S., Shabanamol, P. S., & Jisha, M. S. (2017). Biocontrol potential of halotolerant bacterial chitinase from high yielding novel *Bacillus pumilus* MCB-7 autochthonous to mangrove ecosystem. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 137, 36–41.
- Shahid, A. A., Rau, A. Q., Bakhsh, A., & Husnain, T. (2012). Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biological Sciences*, 64(1), 21–42.
- Srivastava, R., Khalid, A., Singh, U. S., & Sharma, A. K. (2010). Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biological Control*, 53(1), 24–31.
- Yamamoto, S., Shiraiishi, S., & Suzuki, S. (2015). Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*? *Letters in Applied Microbiology*, 60(4), 379–386.