

УДК 635.11:632.937.1.05(476.6)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ-АНТАГОНИСТОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ ОТ БОЛЕЗНЕЙ ПРИ ХРАНЕНИИ

А.В. Свиридов¹, С.С. Зенчик¹, О.С. Кильчевская², Н.И. Гирилович²,
Э.И. Коломиец²

¹ Гродненский государственный аграрный университет, Беларусь

² Институт микробиологии НАН Беларуси, Беларусь

*Проведена оценка антагонистической активности штаммов бактерий *Bacillus subtilis*, перспективных в качестве агентов биологического контроля патогенов столовой свеклы. Нарботаны опытные образцы жидких биопрепаратов с высоким титром клеток и спор. Показано, что при обработке ими корнеплодов свеклы перед закладкой на хранение распространенность и развитие заболевания значительно снижаются, причем наибольший фитозащитный эффект достигается при использовании разбавленного до 10%-ной концентрации биопрепарата на основе *B. subtilis* М-22, биологическая эффективность действия которого составляет 77,8%, а хозяйственная - 83,3%.*

Ключевые слова: антагонистическая активность, *Bacillus subtilis*, бактерии, бактериальный штамм, биологические препараты, столовая свекла, фитопатогенные грибы.

ВВЕДЕНИЕ

Столовая свекла (*Beta vulgaris* L.) выращивается человеком с древних времен и до сих пор является распространенным в меню продуктом питания. Проблема сохранности выращенного урожая является одной из важнейших составляющих повышения эффективности овощеводства. В период хранения порче от болезней, вызываемых фитопатогенными грибами и бактериями, подвергаются значительные объемы продукции. Перспективным способом защиты корнеплодов свеклы в период зимнего хранения является биологический контроль возбудителей болезней с использованием бактерий-

антагонистов, что обеспечивает эффективную защиту и получение экологически безопасной продукции.

В литературе приводятся данные о применении против возбудителей гнилей овощей бактерий-антагонистов рода *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea*. Российские биопрепараты Алирин-Б, Бактофит, Фитоспорин-М, Фитоп, созданные на основе штаммов бактерий *Bacillus subtilis*, предназначены для защиты ряда культур от возбудителей грибных заболеваний (кагатная гниль сахарной свеклы, альтернариоз, фузариоз, серая гниль овощных культур, фомоз картофеля и свеклы и др.), а также возбудителей болезней, вызываемых фитопатогенными бактериями (бактериозы капусты и картофеля, мокрые гнили овощных культур и др.) [1, 2, 3]. Исследования белорусских ученых показали целесообразность использования бактерий *B. subtilis* для биологической защиты сахарной свеклы в процессе хранения [4, 5, 6], что явилось основой для разработки отечественного микробного препарата и способа защиты сахарной, столовой и кормовой свеклы от кагатной гнили, обеспечивающих снижение потерь и качества продукции при хранении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовались штаммы бактерии *Bacillus subtilis*, выделенные в лаборатории средств биологического контроля Института микробиологии НАН Беларуси: *B. subtilis* 7/14, *B. subtilis* 10/19, *B. subtilis* М-22, а также *B. subtilis* Гр.Ю, выделенный сотрудниками кафедры энтомологии и биологической защиты растений Гродненского государственного аграрного университета.

Основными тест-культурами для оценки антифунгальной активности исследуемых культур бактерий служили фитопатогенные грибы: *Fusarium redolens*, *Fusarium culmorum*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Gliocladium catenulatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria tenuis*, *Phoma betae*, изолированные из пораженных тканей корнеплодов свеклы и идентифицированные в Гродненском государственном аграрном университете.

Бактерии-антагонисты выращивали в колбах на качалке (200 об./мин) на среде Мейнелла, содержащей в качестве источника углерода мелассу [7]. Титр колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий устанавливали методом предельных разведений [8]. Для определения титра спор (ТС) проводили термическую обработку разведений бактериальной суспензии при 80°C в течение 10 мин с последующим высевом на МПА. Антагонистическую активность исследуемых бактерий оценивали методом реплик и лунок [9] по диаметру зоны задержки роста фитопатогенов.

Испытания антагонистической активности опытных образцов бактериальных препаратов в отношении возбудителей заболеваний столовой свёклы были проведены на сорте Прыгажуня в лабораторных условиях Гродненского государственного аграрного университета и производственных условиях хранилищ «Горплодоовощсервиса» г. Гродно.

Эффективность препаратов в лабораторных условиях определяли по шкале, представленной в таблице 1.

Таблица 1 - Шкала учета степени пораженности ткани ломтика корнеплода

Степень пораженности ткани ломтика корнеплода, балл	Симптомы проявления заболевания при разрезе ломтика корнеплода ;
0	Заражение ломтика корнеплода не наблюдается
1	Поражено до 10% ткани ломтика корнеплода
2	Поражено до 25% ткани ломтика корнеплода
3	Поражено до 50% ткани ломтика корнеплода ;
4	Поражено до 75% ткани ломтика корнеплода
5	Полная мацерация ткани ломтика корнеплода

Обработку корнеплодов препаратами проводили перед закладкой на хранение. Норма расхода биопрепаратов составляла 0,5 л/т, при расходе рабочего состава 5,0 л/т. Контролем служили необработанные корнеплоды. Распространенность и развитие заболевания корнеплодов, а также эффективность действия биопрепаратов рассчитывали по общепринятым в фитопатологии методикам [10]. Полученные данные обрабатывали методом дисперсионного анализа [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам первичного тестирования методом реплик в качестве перспективных антагонистов фитопатогенных грибов-возбудителей болезней столовой свеклы были выбраны четыре штамма бактерий *Bacillus subtilis*.

При дальнейшем изучении отобранных культур в опытах *in vitro* установлено, что штаммы *B. subtilis* М-22 и *B. subtilis* 7/14 характеризуются не только высокой антифунгальной активностью, оцененной методом лунок (таблица 2), но и холодостойкостью. Бактерии *B. subtilis* 10/19 и *B. subtilis* Гр.10, активно подавляя рост фитопатогенных грибов, чувствительны к действию пониженных температур, что может негативно отразиться на их эффективности при закладке обработанных корнеплодов свеклы на зимнее хранение.

Таблица 2 - Антифунгальная активность исследуемых штаммов бактерий

Вариант	Диаметр зоны задержки роста тест-культур*, мм							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>B. subtilis</i> 11 \ A	22,0	29,5	17,0	46,0	36,5	25,0	24,0	29,0
<i>B. subtilis</i> 10/19	30,0	24,0	32,0	46,0	38,5	37,0	29,0	47,0
<i>B. subtilis</i> М-22	26,0	27,5	27,0	38,0	37,0	40,0	24,0	41,0
<i>B. subtilis</i> ГрЛО	30,5	30,0	33,0	56,0	40,0	56,0	25,5	37,0
НСР ₀₅	2,3	1,1	2,0	1,7	1,5	4,1	1,5	1,8

Примечание. * тест-культуры: 1- *F. redolens*, 2- *F. culmorum*, 3- *P. expansum*, 4-5. *cinerea*, 5-*G. catenulatum*, 6-5. *sclerotiorum*, 1-*Al. tenuis*, 8-*P/β. betae*

Для подтверждения полученных данных были наработаны опытные образцы биопрепаратов на основе исследуемых культур бактерий с титрами КОЕ и спор бактерий $1,3-2,8 \cdot 10^9$ и $1,0-2,1 \cdot 10^9$ соответственно (таблица 3) для дальнейшего испытания в лабораторных условиях и в опытах *in vivo* в условиях хранилищ «Горплодоовощсервиса» г. Гродно.

Таблица 3 - Характеристика опытных образцов бактериальных препаратов на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus*

Вариант	Титр КОЕ/мл	Титр спор, п/мл
<i>B. subtilis</i> !/U	$1,6 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^9$
<i>B. subtilis</i> 10/19	$1,3 \cdot 10^*$	$1,0 \cdot 10^9$
<i>B. subtilis</i> M-22	$2,8 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^9$
<i>B. subtilis</i> ТрЛО	$1,7 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^9$

Для определения влияния препаратов, приготовленных на основе различных бактерий-антагонистов, на развитие возбудителей кагатной гнили корнеплодов столовой свеклы в лабораторных условиях препараты разводили до 1%, 3% и 5%-ной концентрации. Выявлено, что лучше всего сдерживали развитие культур фитопатогенных грибов биопрепараты, разведенные до 5%-ной концентрации (таблица 4).

Таблица 4 - Влияние биопрепаратов в различной концентрации на развитие чистых культур патогенов - возбудителей заболеваний корнеплодов столовой свеклы

Вариант	Концентрация препарата, %	Развития мицелия в чистой культуре, мм		
		<i>Sc. sclerotiorum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. equiseti</i>
<i>B. subtilis</i> 7/14	1	13	15	8
	3	9	12	3
	5	5	8	2
<i>B. subtilis</i> 10/19	1	8	15	10
	3	5	13	8
	5	4	7	3
<i>B. subtilis</i> M 22	1	10	12	13
	3	7		7
	5	3	3	4
<i>B. subtilis</i> Гр.10	1	15	18	8
	3	10	10	5
	5	4	5	4
Изар	1	0	10	15
	3	0	5	8
	5	0		0

Продолжение таблицы 4.

Фундазол	1	0	0	0
	3	0	0	0
	5	0	0	0
Дитан М 45	1	0	10	12
	3	0	0	5
	5	0	0	0
Контроль	без обработки	80	28	34

Для изучения влияния биопрепаратов в различной концентрации на степень мацерации тканей обрабатывали ломтики корнеплодов столовой свеклы биологическими и химическими препаратами в лабораторных условиях. Оценку степени мацерации тканей проводили на 10 сутки (таблица 5).

Таблица 5 - Влияние биопрепаратов различной концентрации на степень мацерации ткани ломтиков корнеплодов столовой свеклы

Вариант	Концентрация препарата, %	Степень мацерации ткани, балл		
		<i>Sc. sclerotiorum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. equiseti</i>
<i>B. subtilis</i> 11 \A	1	0.33	3.33	1.67
	3	0.33	2.67	1.33
	5	0.33	2.00	0.33
<i>B. subtilis</i> 10/19	1	0.33	3.67	0.33
	3	0.33	2.67	0.33
	5	0	2.00	0
<i>B. subtilis</i> М 22	1	0.33	3.00	0.33
	3	0	2.33	0
	5	0	1.67	0
<i>B. subtilis</i> Гр.Ю	1	0.33	3.00	1.33
	3	0	2.33	0.67
	5	0	1.33	0.33
Изар	1	0.67	1.33	0.67
	3	0.33	0.67	0.67
	5	0	0.33	0.33
Фундазол	1	0.33	0.67	0.67
	3	0	0.33	0.33
	5	0	0	0
Дитан М 45	1	0	0.33	0.33
	3	0	0	0
	5	0	0	0
Контроль		1.00	3.33	2.33

Проведенные исследования позволили выявить, в каких концентрациях препараты наиболее эффективно сдерживают патологические процессы, вызываемые фитопатогенными грибами.

Установлено, что препараты на основе бактерий *B. subtilis* 10/19 и *B. subtilis* М 22 в 5%-ной концентрации лучше препятствуют заражению растительных тканей. Наиболее эффективным оказался препарат на основе культуры бактерий *B. subtilis* М 22, который даже при разведении до 3%-ной концентрации препятствовал заражению корнеплодов грибами *Sc. sclerotiorum* и *F. equiseti*.

При проведении производственных испытаний (таблица 6) корнеплоды столовой свеклы обрабатывали биопрепаратами, предварительно разведенными до 5 и 10%-ной концентрации, или химическими фунгицидами и закладывали в контейнеры по 350 кг. Контейнера размещали в три яруса. Корнеплоды хранились на протяжении шести месяцев.

Таблица 6 - Сравнительная оценка эффективности действия биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* и химических фунгицидов против возбудителей кагатной гнили столовой свеклы

Вариант	Концентрация, %	Распространенность заболевания, %	Развитие заболевания, %	Биологическая эффективность, %	Хозяйственная эффективность, %
<i>B. subtilis</i> 7/14	5		12,1	7,9	52,8
<i>B. subtilis</i> 11 \4	10	28,1	9,6	27,0	60,8
<i>B. subtilis</i> 10/19	5	23,1	6,7	49,2	69,8
<i>B. subtilis</i> 10/19	10	19,4	4,8	63,5	75,9
<i>B. subtilis</i> М-22	5	21,9	6,0	54,0	71,7
<i>B. subtilis</i> М-22	10	13,8	2,9	77,8	83,8
<i>B. subtilis</i> ТрЛО	5	20,5	8,3	36,5	74,0
<i>B. subtilis</i> ТрЛО	10	15,0	3,3	74,6	82,3
Изар	5	22,5	6,0	54,0	71,0
Фундазол	5	18,8	4,7	64,3	76,9
Дитан М 45	5	9,4	2,5	81,0	89,6
Контроль		45,6	13,1		

Согласно полученным данным, распространенность и развитие кагатной гнили корнеплодов столовой свеклы при обработке их перед хранением 10%-ным биопрепаратом на основе *B. subtilis* М-22 характеризуются более низкими показателями, чем при использовании химических фунгицидов изар и фундазол. Соответственно, эффективность указанного биопрепарата превышает или находится на уровне эффективности химических средств защиты. Другие испытанные бактериальные культуры в опытах *in vivo* показали худшие результаты, что может быть обусловлено низкой конкурентоспособностью

интродуцируемых штаммов в микробоценозах, в том числе вследствие чувствительности к пониженным температурам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная оценка антагонистической активности штаммов бактерий рода *Bacillus* в культуре *in vitro* и *in vivo* показала перспективность использования в качестве агента биологического контроля патогенов столовой свеклы штамма *Bacillus sub tHis* М-22. Биологическая и хозяйственная эффективность биопрепарата на его основе достигает 77,8 и 83,8% соответственно. Рекомендуемая рабочая концентрация препарата - 10%.

Литература

1. Король И.Т. Биопрепараты для борьбы с болезнями растений / Микробиологическая защита растений / Король И.Т. - М.: Колос, 1993. - С. 72-73.
2. Биологическая защита растений / Под ред. М.В.Штерншис. М.: Колос, 2004. - 264 с.
3. Широков, А.В. Возбудители кагатных гнилей сахарной свеклы и меры борьбы с ними / А.В. Широков, Р.А. Кудаярова, В.И. Кузнецов / Успехи медицинской микологии: материалы V Всерос. конгр. по медиц. микологии. Т. IX.-М., 2007.-С. 120-121.
4. Эффективность бактерий рода *Bacillus* против кагатной гнили корнеплодов сахарной свеклы / Э.И. Коломиец [и др.] // Совр. состояние и перспективы развития микробиол. и биотехнол: материалы междунар. науч. конф. 1-2 июля 2006 г. - Минск-Раков, 2006. - С. 338-341.
5. Научные и практические основы создания биопрепарата для защиты сахарной свеклы от кагатной гнили / Э.И. Коломиец [и др.] // Биоценолич. регуляция - основа совр. фитосанитарных технологий: материалы междунар. конф. 22-23 мая 2007 г. - С.-Петербург, 2007. - С. 145-147.
6. Бактерии-антагонисты как агенты биологического контроля кагатной гнили сахарной свеклы / Э.И. Коломиец [и др.] // Микробные биотехнологии: функциональные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. ИНМИ. Т. 1. - Минск, 2007.-С. 170-176.
7. Мейнелл, Дж. Экспериментальная микробиология / Дж. Мейнелл, Э. Мейнелл. - М.: Мир, 1967. - 320 с.
8. Методы почвенной микробиологии и биохимии. / Под ред. Д.Г. Звягинцева. - М.: МГУ, 1991. - 304 с.
9. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. -М.: Колос, 1983. - 296 с.
10. Поляков, И.Я. Прогноз развития вредителей и болезней сельскохозяйственных культур (с практикумом) / И.Я. Поляков, М.П. Персов, В.А. Смирнов. - Л.: Колос, 1984. - 318 с.

11. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б.А. Доспехов. - М: Агропромиздат, 1985.-351с.

A.V. SVIRIDOV¹, S.S. ZENCHIK¹, O.S. KILCHEVSKAYA \
N.I. GIRILOVICH², E.I. KOLOMIETS²

The evaluation of antagonistic activity of bacterial strains Bacillus subtilis in perspective as biological control agents against the pathogens of red beet was defined. The test specimens of biological preparations were prepared. It was shown that prevalence and development of diseases decrease rapidly during root treatment before clamp storage with biological preparations in 10% concentration. It was revealed that the best biopreparation on the basis of B. subtilis M-22 had biological efficiency of it's attains 77,3% and economic efficiency 83,3%.

Key words: antagonistic activity, Bacillus subtilis, bacteria, bacterial strain, biological preparation, red beet, phytopathogenic fungi, Belarus.