

УДК 632.911.2

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНТРОДУКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ИЗМЕНЕНИЯ СВОЙСТВ КОМПОСТОВ

Л.Р. Бикташева, Н.В. Белоногова, С.Ю. Селивановская, П.Ю. Галицкая
Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Использование супрессивных компостов, обладающих одновременно удобрительными свойствами по отношению к растениям и ингибирующей способностью по отношению к возбудителям заболеваний, в качестве альтернативы пестицидам представляет все больший научный и практический интерес. В работе была исследована возможность получения супрессивного компоста с помощью внесения биопрепарата, а также проведена оценка выживаемости внесенных штаммов биопрепарата методом ПЦР в реальном времени. Компост готовили на основе отходов соломы, куриного помета и навоза КРС. Компостная смесь была разделена на две части, в одну из которых на 120-е и 180-е сутки вносили биопрепарат, состоящий из четырех штаммов микроорганизмов (*Trichoderma asperellum* T203, *Pseudomonas putida* PCL1760, *Pseudomonas fluorescence* WCS365 и *Streptomyces* spp.). Данные штаммы обладают четырьмя различными механизмами подавления фитопатогена *Fusarium oxysporum*, другая часть использовалась в качестве контроля. Однократное внесение биопрепарата увеличило супрессивность компоста по сравнению с инокулированным в 1.4 раза. Однако было отмечено быстрое снижение супрессивных свойств – на 60-е сутки. Повторное внесение привело к более значительному повышению супрессивности – в 8.5 раз, а также увеличению ее длительности проявления – до 90 сут. Повышение супрессивности сопровождалось увеличением численности двух из четырех микроорганизмов биопрепарата – *P. fluorescence* WCS365 и *T. asperellum* T203.

Ключевые слова: компост, супрессивность, биопрепарат, инокуляция, *Fusarium oxysporum*

Введение

Урожайность в сельском хозяйстве является одной из наиболее актуальных проблем современности, что связано с ростом численности населения и нехваткой плодородных земель. Показано, что до 20% потенциальных урожаев гибнет из-за заболеваний растений, большая часть которых вызывается микроскопическими грибами [1]. К патогенам растений относят огромное количество видов микромицетов, одним из наиболее распространенных заболеваний является фузариоз, вызываемый грибами рода *Fusarium* [2].

Для борьбы с патогенами современное сельскохозяйственное производство традиционно использует химические средства защиты растений (пестициды). Однако в связи с тем, что применение традиционных пестицидов ведет к нега-

тивными воздействиями на окружающую среду, в настоящее время широко изучаются новые экологически безопасные методы подавления патогенов [3].

Одним из таких методов является применение так называемых супрессивных компостов – компостов, которые обладают одновременно удобрительными свойствами по отношению к растениям и ингибирующими свойствами по отношению к фитопатогенным микроорганизмам [4]. Однако получение компостов со стабильными супрессивными свойствами не всегда возможно [5]. В зависимости от характеристик процесса компостирования и состава исходных субстратов компоста супрессивность может колебаться в широких пределах [6, 7]. Распространенным приемом, обеспечивающим усиление супрессивных свойств компоста, является внесение в компосты микроорганизмов [8, 9]. В качестве биопрепаратов широко используются бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus* и грибы – *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* [10, 11]. Их внесение в целом увеличивает урожай растений, а также эффективно подавляет фитопатогены [7].

Супрессивная активность микроорганизмов может быть обусловлена различными механизмами. К ним относится хищничество или паразитизм по отношению к патогену, индукция системной устойчивости растений, конкурентное вытеснение фитопатогена, а также выделение антибиотиков [12–17]. Совместное использование микроорганизмов с различными механизмами супрессивности позволит подавить более широкий спектр фитопатогенов.

В настоящей работе были оценены свойства биопрепарата, состоящего из четырех штаммов микроорганизмов, обладающих различными механизмами подавления фузариоза. Биопрепарат вносили в компост с целью придания ему свойств супрессивности и оценивали выживаемость микроорганизмов биопрепарата в нем. Кроме того, изучали ингибирующие свойства полученного компоста по отношению к фитопатогенным микромицетам.

1. Материалы и методы

1.1. Подготовка компостных смесей. Компост готовили из отходов соломы, куриного помета и навоза КРС в соотношении 8 : 6 : 6 кг. Соотношение субстратов обусловлено тем, что содержание $C_{орг} : N_{общ}$ должно находиться в оптимальном для микроорганизмов диапазоне от 10 до 30 [18–21]. В используемом компосте $C_{орг} : N_{общ}$ составило 13 : 1. Компостирование проводили в пластиковых контейнерах объемом 50 л при комнатной температуре, при ежедневном перемешивании в четырех повторностях. Влажность смеси поддерживали на уровне 55–60%. Биопрепарат вносили в компост на 120-е и на 180-е сутки компостирования, по 909 мл /кг (две повторности) – так называемый инокулированный компост. В качестве контроля использовали компост без биопрепарата (две повторности) – так называемый неинокулированный компост.

1.2. Подготовка и внесение биопрепарата. Для приготовления биопрепарата использовали четыре штамма микроорганизмов, подавляющих развитие фитопатогенных грибов с помощью четырех различных механизмов: *Trichoderma asperellum* T203 (хищничество), *Pseudomonas fluorescence* WCS365 (индукция системной устойчивости растений), *Pseudomonas putida* PCL1760 (конкуренция) и *Streptomyces* spp. (выделение антибиотиков) [16, 22–24]. Микроорганизмы были

получены из музея кафедры биохимии и биотехнологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Для оценки возможности совместного внесения каждый из четырех штаммов микроорганизмов проверяли на наличие антагонистической активности относительно трех других штаммов, используя четыре метода определения антагонистической активности на чашках Петри: 1) метод перпендикулярных штрихов [25], 2) метод капель по Н.А. Глушанову [26], 3) метод блоков [27], 4) метод лунок [27, 28].

Бактерии рода *Pseudomonas* использовались в наиболее активной фазе роста, *T. asperellum* и *Streptomyces* spp. – в период наиболее активного спорообразования. Предварительно, все штаммы микроорганизмов наращивали на L-бульоне при (28 ± 2) °С, *P. fluorescence* WCS365 – в течение 12 ч, *P. putida* PCL1760 – в течение 8 ч, *T. asperellum* T.203 и *Streptomyces* spp. – в течение 7 сут. При составлении биопрепарата доля культуральной жидкости каждого штамма была рассчитана таким образом, чтобы численность бактерий рода *Pseudomonas* составила по 10^6 КОЕ/г, а численность *T. asperellum* T.203 и *Streptomyces* spp. – 10^4 спор/г.

1.3. Оценка супрессивных свойств компостов. Оценка супрессивности проводилась с помощью теста с растениями томатов (*Solanum lycopersicum*), которые выращивали на почве, зараженной *Fusarium oxisporum* (10^6 спор/кг) за 7 сут до начала эксперимента. Тестируемый компост вносили в почву в количестве 20% по массе, далее почву распределяли по пластиковым контейнерам по 2000 г, в каждый контейнер засевали по 24 семени томата сорта «Сибирский скороспелый». Инкубировали при режиме освещенности 16 : 8, температуре (24 ± 2) °С, поддерживая влажность почвы на уровне 60% максимальной полевой влагоемкости. Через 21 сут оценивали количество здоровых и нездоровых (погибших и поврежденных) растений. В качестве позитивного почвенного контроля использовали чистую почву, в качестве негативного почвенного контроля – почву, зараженную спорами *F. oxisporum*, без внесения компоста.

1.4. Оценка выживаемости микроорганизмов биопрепарата. Выживаемость штаммов биопрепарата, внесенных в компост, оценивали методом ПЦР в реальном времени. На 120-е, 150-е, 180-е, 210-е и 240-е сутки из компостов отбирали по 10 образцов массой 0.3 г, из которых выделяли тотальную геномную ДНК с помощью набора FastDNA®SPIN Kit for Soil (Bio101, Qiogene). Полученные образцы ДНК использовали при проведении ПЦР в реальном времени – в 3 повторностях для каждого образца, с использованием праймеров, представленных в табл. 1. Амплификацию в реальном времени проводили на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Реакционная смесь содержала 1 мкл ДНК, 1 мкл каждого праймера (10 мкМ), 5 мкл буфера 10x Buffer, содержащего краситель SYBR Green, 2.5 мкл dNTP (10 мМ), 0.5 мкл полимеразы SynTaq Polymerase (5 U/мкл), 16 мкл стерильной воды. Программа амплификации для видов *P. fluorescence* WCS365, *P. putida* PCL1760 и общеклеточных праймеров включала: 10 мин при 95 °С; 40 циклов:

Табл. 1

Последовательность праймеров для ПЦР в реальном времени	
Штамм	Последовательность праймеров 5'-3'
<i>P. fluorescence</i> WCS365	F: TGATYGTGTCCAACCTGCTGCTGGC R: GAAVAGGCTGTCTGAGCAA
<i>P. putida</i> PCL1760	F: CTGCTGCCCGACAACCAC R: TCACGAACTCCAGCAGGAC
<i>T. asperellum</i> T203	F: GCTTTGCCAGTCTACCTACC R: AACTTGCAGGCAATGTGG
<i>Streptomyces</i> spp.	F: GCCGATTGTGGTGAAGTGGA R: GTACGGGCCCGCCATGAAA

15 с при 95 °С, 15 с при 58 °С, 30 с при 72 °С. Режим амплификации для вида *Streptomyces* spp. включал: 15 мин при 95 °С и 40 циклов: 1 мин при 95 °С, 40 с при 60 °С, 2 мин при 72 °С, 1 с при 85.5 °С и 7 мин при 72 °С. Режим амплификации для вида *T. asperellum* T203 и общегрибных праймеров включал: 3 мин при 95 °С и 40 циклов: 15 с при 95 °С, 20 с при 54 °С, 20 сек при 72 °С.

Стандартные кривые представляли собой амплификацию серии разведений ДНК соответствующих видов. Результаты получали в виде пороговых циклов, характеризующих резкое увеличение количества ампликонов в реакционной смеси. Значения пороговых циклов переводили в количество копий ДНК, относящихся к тому или иному таксону, по калибровочной кривой, которую получали при амплификации ДНК, выделенной из отдельных видов, в различных разведениях. В качестве референтного вида для оценки общего количества бактериальных копий использовали *P. fluorescence* WCS365, грибных – *T. asperellum* T203.

1.4. Статистическая обработка результатов. Все исследования проводили не менее чем в трех повторностях. Полученные данные были обработаны с использованием программы Origin 8.5 (Originlab). Для оценки достоверности различий был использован критерий Фишера при $\alpha = 0.05$.

2. Результаты и их обсуждения

2.1. Антагонистическая активность микроорганизмов биопрепарата. Важным фактором создания комплексного биопрепарата является взаимодействие штаммов друг с другом [29]. Для оценки возможности совместного внесения четырех штаммов в составе одного биопрепарата, каждый из них проверяли на наличие антагонистической активности относительно трех других. Для оценки антагонистической активности нами были выбраны четыре метода: метод перпендикулярных штрихов, метод капель по Н.А. Глушанову, метод блоков и метод лунок. Использование данных методов *in vitro* позволяет быстро и достаточно просто проверить большое количество штаммов микроорганизмов. Так, метод перпендикулярных штрихов позволяет судить о наличии и степени антагонистической активности по величине зоны ингибирования тест-культур на границе со штрихом роста исследуемого штамма. На одной чашке Петри к штамму можно подсеять несколько тест-культур и, таким образом, выявить

Табл. 2

Оценка антагонистической активности штаммов

Исследуемые штаммы	Влияние на тест-штаммы			
	<i>P. fluorescens</i> WCS365	<i>P. putida</i> PCL1760	<i>Streptomyces</i> spp.	<i>T. asperellum</i> T203
<i>P. fluorescens</i> WCS365		1) отсутствует 2) отсутствует 3) отсутствует 4) отсутствует	1) отсутствует 2) отсутствует 3) отсутствует 4) отсутствует	1) отсутствует 2) отсутствует 3) отсутствует 4) отсутствует
<i>P. putida</i> PCL 1760	1) отсутствует 2) отсутствует 3) отсутствует 4) отсутствует		1) отсутствует 2) отсутствует 3) отсутствует 4) отсутствует	1) отсутствует 2) отсутствует 3) отсутствует 4) отсутствует
<i>Streptomyces</i> spp.	1) отсутствует 2) отсутствует 3) отсутствует 4) отсутствует	1) отсутствует 2) отсутствует 3) отсутствует 4) отсутствует		1) отсутствует 2) отсутствует 3) отсутствует 4) отсутствует
<i>T. asperellum</i> T203	1) отсутствует 2) отсутствует 3) отсутствует 4) отсутствует	1) отсутствует 2) отсутствует 3) отсутствует 4) отсутствует	1) отсутствует 2) отсутствует 3) отсутствует 4) отсутствует	

1) Метод перпендикулярных штрихов, 2) метод капель по Н.А. Глушанову, 3) метод блоков, 4) метод лунок.

спектр антагонистического действия исследуемого штамма [25, 30]. Использование метода лунок позволяет определять антагонистическую активность чистых и смешанных культур микроорганизмов [27, 28]. Метод блоков, в отличие от других, позволяет использовать разные питательные среды: одну (блок) – для исследуемого штамма, другую – для данного тест-штамма. Преимуществом метода капель по Н.А. Глушанову является непосредственное взаимодействие исследуемых микроорганизмов [31].

Согласно четырем проведенным тестам (табл. 2) ни один из исследуемых штаммов не проявлял антагонистической активности по отношению к трем другим. Результаты оценки антагонистической активности позволяют совместно вносить выбранные штаммы в составе биопрепарата.

2.2. Оценка влияния биопрепарата на супрессивные свойства компоста. На следующем этапе работы биопрепарат был внесен в компост, изготовленный из отходов соломы, куриного помета и навоза КРС. Поскольку показано, что наибольшая эффективность внесения биопрепарата наблюдается после того, как пик саморазогрева компостной смеси прошел, но еще не произошла существенная реколонизация мезофильными микроорганизмами [32], биопрепарат вносили в компост на 120-е сутки компостирования, во время фазы остывания. Через каждые 30 сут сравнивали супрессивность инокулированного и неинокулированного компостов. Для оценки эффективности повторного внесения биопрепарат также вносили на 180 сутки компостирования. Результаты представлены на рис. 1.

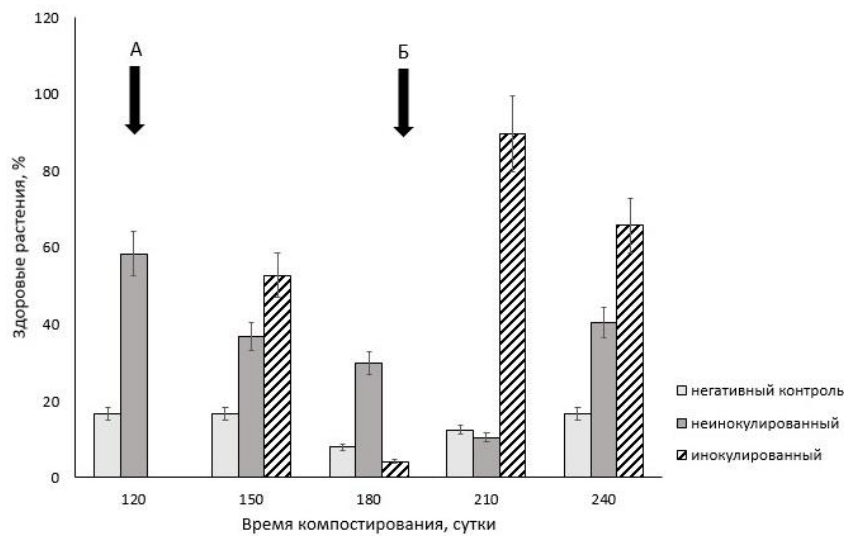


Рис. 1. Супрессивность инокулированного и неинокулированного компоста (А – первая инокуляция, 120-е сутки; Б – вторая инокуляция, 180-е сутки)

Как видно из рис. 1, доля здоровых растений в почве с неинокулированным компостом колебалась от 10.5% до 40.4% в течение эксперимента. Высокие колебания способности компостов ингибировать фитопатогены были отмечены ранее [6]. Колебания супрессивности могут быть обусловлены динамикой микробного сообщества компостов. Следует отметить, что супрессивность почв с неинокулированным компостом была выше, чем зараженной почвы без компоста. По мнению Фестберг с соавторами [33], супрессивными считаются компосты, процент здоровых растений в которых значительно отличается от контроля (при $p < 0.05$). Исходя из этого, в нашей работе неинокулированный компост возрастом 120, 150, 180, 240 сут следует называть супрессивным, а 210 сут – нет.

Инокуляция компостов биопрепаратом вызвала значимые изменения супрессивности. Так, при внесении инокулированных компостов возрастом 150, 210 и 240 сут доля здоровых растений в почве была соответственно на 30%, 88% и 38% выше, а в случае 180-суточного компоста – на 85% ниже, чем в почве с неинокулированным компостом. Описанные изменения, вероятно, связаны со сменой состава микробного сообщества компостов под влиянием интродуцированных видов и с последующей сменой протекающих в компосте биохимических реакций. Полученные результаты согласуются с данными литературы. Так, Камилова с соавторами [23] наблюдали, что применение биопрепарата, содержащего штамм *P. fluorescence* WCS365, повышало супрессивность на 30–38%. В работе [34] было отмечено, что применение биопрепаратов на основе штаммов, относящихся к роду *Trichoderma*, позволяет увеличить супрессивность компоста на 74–87% по сравнению с неинокулированным.

Следует отметить, что внесение биопрепарата вызывало лишь временное увеличение степени супрессивности компоста. Так, значительное превышение над неинокулированным аналогом отмечено через 30 сут после первого внесения, а также через 30 и 60 сут после второго внесения. Интересно, что второе

внесение биопрепарата вызвало не только более длительный, но и более выраженный эффект [35–37]. Эффективность от многократной инокуляции была описана и ранее, однако исследования касались других направленных изменений свойств микробиомов: так, Шварц с соавтором [35] продемонстрировали улучшение биодegradации фенантрена после двойного и тройного внесения биопрепарата в загрязненную почву по сравнению с однократным. Гилберт с соавтором [36] наблюдали аналогичный эффект при внесении штаммов-деструкторов в почву, загрязненную бифенилами. Эффект от многократного внесения может быть объяснен тем, что интродуцированные штаммы плохо приживаются в новом сообществе из-за стресса в связи с изменением условий обитания, а также в связи с конкуренцией со стороны видов аборигенного сообщества. Многократное же внесение усиливает популяции интродуцированных ранее штаммов, уже построивших отношения с видами-аборигенами, тем самым помогая им победить в конкурентной борьбе [37].

2.3. Оценка выживаемости микроорганизмов биопрепарата в компосте. Далее было проверено, связаны ли изменения супрессивности компостов после внесения биопрепарата с выживаемостью отдельных входящих в него штаммов. Выживаемость оценивали методом ПЦР в реальном времени с использованием видоспецифичных праймеров. Данный метод позволяет достоверно определить количество тех или иных микробных видов в сообществе [38, 39]. Согласно результатам, представленным на рис. 2, штамм *P. fluorescence* WCS365 увеличивает свою численность по сравнению с исходным уровнем этого вида в компосте. После первой инокуляции количество *P. fluorescence* WCS365 увеличилось до $6.0 \cdot 10^4$ копий генов/г компоста. Однако вторая инокуляция не оказала существенного влияния на количество данного штамма, и после 180 сут его численность колебалась в диапазоне от $4.8 \cdot 10^4$ до $5.5 \cdot 10^4$ копий генов/г. Для штамма *T. asperellum* T203 можно отметить прямое влияние инокуляции на общую численность в компостной смеси. Так, после первой инокуляции количество *T. asperellum* T203 увеличилось с $3.7 \cdot 10^4$ в исходном компосте до $9.4 \cdot 10^4$ копий генов/г. Однако она оказала кратковременный эффект, и уже к 180-м суткам численность этого штамма снизилась до $4.5 \cdot 10^4$ копий генов/г. Повторная инокуляция вновь привела к увеличению численности микроорганизмов данного вида – до $4.3 \cdot 10^5$ копий генов/г.

Два других штамма, несмотря на дополнительное внесение в компостную смесь, не увеличивали свою численность по сравнению с фоновыми значениями в компосте. Отсутствие роста и снижение численности штаммов *Streptomyces* spp. и *P. putida* PCL1760 могут быть вызваны конкуренцией с аборигенными видами компоста или неблагоприятными для данных штаммов условиями компоста [40].

Поскольку в компостах после внесения биопрепарата наблюдалось достоверное увеличение супрессивности, можно сделать два предположения: во-первых, активностей штаммов *P. fluorescence* WCS365 и *T. asperellum* T203, являющихся известными агентами биоконтроля [11, 23], достаточно для обеспечения супрессивности компостов; во-вторых, попадая в компост, *Streptomyces* spp.

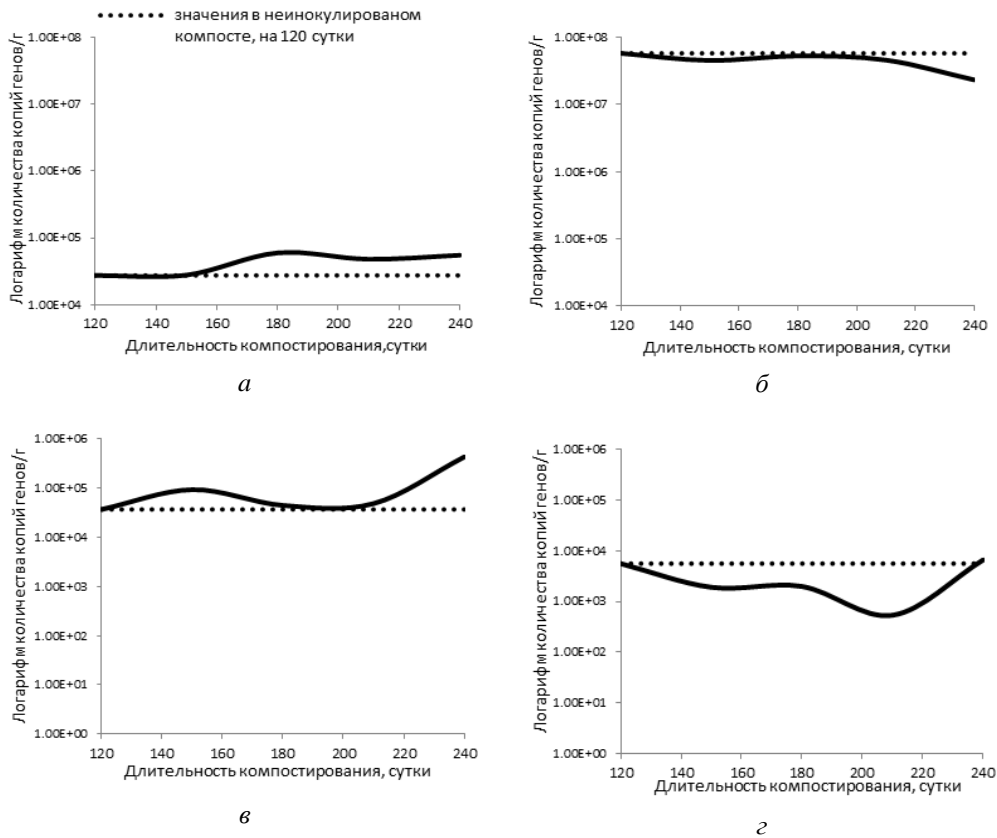


Рис. 2. Выживаемость штаммов биопрепарата, внесенных в компост (а – *P. fluorescence* WCS365, б – *P. putida* PCL1760, в – *T. asperellum* T.203, г – *Streptomyces* spp.)

и *P. putida* PCL1760 меняют микробное сообщество таким образом, что оно становится более антагонистичным по отношению к *F. oxysporum*, например, за счет интенсивного развития других видов. Обе описанные причины могут действовать одновременно. Для понимания эффекта действия биопрепарата необходимы более глубокие исследования изменений, происходящих в микробном сообществе компостов после внесения биопрепарата, в частности, с использованием методов секвенирования нового поколения.

Заключение

Таким образом, в работе впервые продемонстрирована возможность применения биопрепарата, состоящего из четырех штаммов микроорганизмов, обладающих четырьмя различными механизмами подавления фитопатогена растений *F. oxysporum*, для придания компостам свойств супрессивности. Показано отсутствие антагонистических взаимоотношений микроорганизмов биопрепарата. Установлено, что двукратное внесение биопрепарата является более целесообразным, чем однократное, с точки зрения как усиления супрессивных свойств, так и длительности эффекта. Выявлена связь между выживаемостью двух штаммов микроорганизмов биопрепарата в компосте (*P. fluorescence* WCS365 и *T. asperellum* T203) и увеличением его супрессивности.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств субсидии Министерства образования и науки РФ на выполнение прикладных научных исследований (проект RFMEFI57814X0089).

Литература

1. Rao S. Principles of weed science. – N. Y.: Sci. Publ., 2000. – 526 p.
2. Liu J., Gilardi G., Sanna M., Gullino M.L., Garibaldi A. Biocontrol of Fusarium crown and root rot of tomato and growth-promoting effect of bacteria isolated from recycled substrates of soilless crops // *Phytopathol. Mediterr.* – 2010. – V. 49. – P. 163–171. – doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-3095.
3. Lopez-Lopez N., Segarra G., Vergara O., López-Fabal A., Trillas M.I. Compost from forest cleaning green waste and *Trichoderma asperellum* strain T34 reduced incidence of *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings // *Biol. Control.* – 2016. – V. 95. – P. 31–39. – doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.12.014.
4. Xin X., Zhang J., Zhu A., Zhang C. Effects of long-term (23 years) mineral fertilizer and compost application on physical properties of fluvo-aquic soil in the North China Plain // *Soil Tillage Res.* – 2016. – V. 156. – P. 166–172. – doi: 10.1016/j.still.2015.10.012.
5. Galitskaya P., Beru F., Kuryntseva P., Selivanovskaya S. Suppressive properties of composts are determined by their raw materials // *Indian J. Sci. Technol.* – 2015. – V. 8, No 30. – P. 1–7. – doi: 10.17485/ijst/2015/v8i30/81875.
6. Markakis E.A., Fountoulakis M.S., Daskalakis G.Ch., Kokkinis M., Ligoxigakis E.K. The suppressive effect of compost amendments on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* in cucumber and *Verticillium dahliae* in eggplant // *Crop Prot.* – 2016. – V. 79. – P. 70–79. – doi: 10.1016/j.cropro.2015.10.015.
7. Zhang N., He X., Zhang J., Raza W., Yang X.-M., Ruan Y.-Z., Shen Q.-R., Huang Q.-W. Suppression of Fusarium wilt of banana with application of bio-organic fertilizers // *Pedosphere.* – 2014. – V. 24, No 5. – P. 613–624. – doi: 10.1016/S1002-0160(14)60047-3.
8. Chen M.-H., Jack A.L.H., McGuire I.C., Nelson E.B. Seed-colonizing bacterial communities associated with the suppression of Pythium seedling disease in a municipal biosolids compost // *Phytopathology.* – 2012. – V. 102, No 5. – P. 478–489. – doi: 10.1094/PHYTO-08-11-0240-R.
9. Wei Z., Huang J., Yang C., Xu Y., Shen Q., Chen W. Screening of suitable carriers for *Bacillus amyloliquefaciens* strain QL-18 to enhance the biocontrol of tomato bacterial wilt // *Crop Prot.* – 2015. – V. 75. – P. 96–103. – doi: 10.1016/j.cropro.2015.05.010.
10. Gilardi G., Demarchi S., Gullino M.L., Garibaldi A. Evaluation of the short term effect of nursery treatments with phosphite-based products, acibenzolar-S-methyl, pelleted *Brassica carinata* and biocontrol agents, against lettuce and cultivated rocket fusarium wilt under artificial inoculation and greenhouse conditions // *Crop Prot.* – 2016 – V. 85 – P. 23–32. – doi: 10.1016/j.cropro.2016.03.011.
11. Viterbo A., Landau U., Kim S., Chernin L., Chet I. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203 // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2010. – V. 305, No 1. – P. 42–48. – doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01910.
12. Desaki Y., Miya A., Venkatesh B., Tsuyumu S., Yamane H., Kaku H. Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells // *Plant Cell Physiol.* – 2006. – V. 47, No 11. – P. 1530–1540. – doi: 10.1093/pcp/pcl019.
13. Bolwerk A., Lagopodi A.L., Lugtenberg B.J.J., Bloemberg G.V. Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2005. – V. 18, No 7. – P. 710–721.

14. Benitez M.-S., Gardener B.B.M. Linking sequence to function in soil bacteria: Sequence-directed isolation of novel bacteria contributing to soilborne plant disease suppression // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 75, No 4. – P. 915–924. – doi: 10.1128/AEM.01296-08.
15. Haas D., Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2005. – V. 3, No 4. – P. 307–319.
16. Validov S.Z., Kamilova F., Lugtenberg B.J.J. *Pseudomonas putida* strain PCL1760 controls tomato foot and root rot in stonewool under industrial conditions in a certified greenhouse // *Biol. Control.* – 2009. – V. 48, No 4 – P. 6–11. – doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.09.010.
17. Galitskaya P., Biktasheva L., Kuryntseva P., Selivanovskaya S. Suppressive properties of composts may be improved by microbial inoculation // *Indian J. Sci. Technol.* – 2016. – V. 7, No 2. – P. 773–783.
18. Iqbal M.K., Shafiq T., Ahmed K. Characterization of bulking agents and its effects on physical properties of compost // *Biores. Technol.* – 2010. – V. 101, No 6. – P. 1913–1919. – doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.030.
19. Kumar M., Ou Y.-L., Lin J.-G. Co-composting of green waste and food waste at low C/N ratio // *Waste Manage.* – 2010. – V. 30, No 4. – P. 602–609. – doi: 10.1016/j.wasman.2009.11.023.
20. Li Z., Lu H., Ren L., He L. Experimental and modeling approaches for food waste composting: A review // *Chemosphere.* – 2013. – V. 93, No 7. – P. 1247–1257. – doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.064.
21. Sasaki N., Suehara K., Kohda J., Nakano Y., Yang T. Effects of C/N ratio and pH of raw materials on oil degradation efficiency in a compost fermentation process // *J. Biosci. Bioeng.* – 2003. – V. 96, No 1. – P. 47–52.
22. Kim T.G., Knudsen G.R. Quantitative real-time PCR effectively detects and quantifies colonization of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. // *Appl. Soil Ecol.* – 2008. – V. 40, No 1. – P. 100–108. – doi: 10.1016/j.apsoil.2008.03.013.
23. Kamilova F., Lamers G., Lugtenberg B. Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores // *Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 10, No 9. – P. 2455–2461. – doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01638.x.
24. Kinkel L.L., Schlatter D.C., Bakker M.G., Arenz B.E. Streptomyces competition and co-evolution in relation to plant disease suppression // *Res. Microbiol.* – 2012. – V. 163, No 8. – P. 490–499. – doi: 10.1016/j.resmic.2012.07.005.
25. Петрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
26. Заборских Е.И. Антагонистическая активность мезофильных молочнокислых стрептококков и их экспериментальная селекция: Дис. ... канд. биол. наук. – Иркутск, 1976. – 120 с.
27. Аникиев В.В., Лукомская К.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: Просвещение, 1977. – 128 с.
28. Червинец Ю.В., Бондаренко В.М., Шабанова Н.А., Самоукина А.М., Червинец В.М. Бактериоциногенные высокоантагонистические штаммы лактобацилл // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии* – 2006. – Вып. 7. – С. 78–81.
29. Бухарин О.В., Семенов А.В., Черкасов С.В. Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий при их взаимодействии // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* – 2010. – Т. 12, Вып. 4. – С. 347–352.
30. Семенов А.В., Черкасов С.В. Влияние ассоциативных микроорганизмов на антагонистическую активность бактерий // *Вестн. НГУ. Сер. Биология, клиническая медицина.* – 2011. – Т. 9, Вып. 3. – С. 20–26.

31. *Ирkitова А.Н., Каган Я.Р., Соколова Г.Г.* Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий // Изв. Алт. гос. ун-та. – 2012. – № 3. – С. 41–44.
32. *Hoitink H.A.J., Fahy P.C.* Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts // Annu. Rev. Phytopathol. – 1986. – V. 24. – P. 93–114.
33. *Vestberg M., Kukkonen S., Rantala S., Prochazka P., Tuohimetsä S., Setälä H., Romantshuk M., Kurola J., Yu D., Parikka P.* Suppressiveness of Finnish commercial compost against soil borne disease // Acta Hort. – 2011. – V. 891. – P. 59–65. – doi: 10.17660/ActaHortic.2011.891.5.
34. *Carrero-Carron I., Trapero-Casas J.L., Olivares-Garcia C., Monte E., Hermosa R., Jimenez-Diaz R.M.* *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of *Verticillium wilt* in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahlia* // Crop Prot. – 2016. – V. 88 – P. 45–52. – doi: 10.1016/j.cropro.2016.05.009.
35. *Schwartz E., Scow K.M.* Repeated inoculation as a strategy for the remediation of low concentrations of phenanthrene in soil // Biodegradation. – 2001. – V. 12, No 3. – P. 201–207.
36. *Gilbert E.S., Crowley D.E.* Repeated application of carvone-induced bacteria to enhance biodegradation of polychlorinated biphenyls in soil // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – V. 50, No 4. – P. 489–494.
37. *Newcombe D.A., Crowley D.E.* Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – V. 51, No 6. – P. 877–882.
38. *Myszka K., Schmidt M.T., Olejnik-Schmidt A.K., Leja K., Czaczuk K.* Influence of phenolic acids on indole acetic acid production and on the type III secretion system gene transcription in food-associated *Pseudomonas fluorescens* KM05 // J. Biosci. Bioeng. – 2014. – V. 118, No 6. – P. 651–656. – doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.05.029.
39. *Larena I., Vazquez G., De Cala A., Melgarejo P., Magan N.* Ecophysiological requirements on growth and survival of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum* 212 in different sterile soils // Appl. Soil Ecol. – 2014. – V. 78. – P. 18–27. – doi: 10.1016/j.apsoil.2014.02.003.
40. *Schlatter D.C., Samac D.A., Tesfaye M., Kinkel L.L.* Rapid and specific method for evaluating *Streptomyces* competitive dynamics in complex soil communities // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – V. 76, No 6. – P. 2009–2012. – doi: 10.1128/AEM.02320-09.

Поступила в редакцию
26.09.16

Бикташева Лилия Рамилевна, аспирант кафедры прикладной экологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: biktasheval@mail.ru

Белоногова Надежда Викторовна, младший научный сотрудник НИЛ «Биоконтроль» Института экологии и природопользования

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: nadezhda-belonogova@yandex.ru

Селивановская Светлана Юрьевна, доктор биологических наук, профессор кафедры прикладной экологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru

Галицкая Полина Юрьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры прикладной экологии
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: gpolina33@yandex.ru

ISSN 1815-6169 (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2016, vol. 158, no. 4, pp. 493–506

On the Efficiency of Introduction of Microbial Strains Used for Adjusted Changes of the Compost Properties

L.R. Biktasheva^{*}, N.V. Belonogova^{**}, S.Y. Selivanovskaya^{***}, P.Y. Galitskaya^{****}

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: ^{*}biktasheval@mail.ru, ^{**}nadezhda-belonogova@yandex.ru,

^{***}svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru, ^{****}gpolina33@yandex.ru

Received September 26, 2016

Abstract

The use of suppressive composts, which exhibit fertilizing properties towards plants and inhibiting properties towards phytopathogens, instead of traditional pesticides is of growing practical and scientific importance. In this work, we have studied the possibility to obtain suppressive compost by introducing the microbial biopreparation and estimated the survival rate of the biopreparation microbial strains in the compost by means of the real-time PCR method. The biopreparation consisted of four microbial strains (*Trichoderma asperellum* T203, *Pseudomonas putida* PCL1760, *Pseudomonas fluorescence* WCS365, and *Streptomyces* spp.) characterized by four different mechanisms of plant pathogen inhibition. The compost was prepared using straw waste, chicken and cow manures. The compost has been inoculated with the biopreparation twice, on the 120th and 180th days of composting. Suppressiveness towards *Fusarium oxysporum* pathogen has been measured. Non-inoculated compost has been used as control. It has been found that single inoculation of the biopreparation increased suppressiveness by 1.4 times for up to 60 days. Repeated inoculation resulted in a more significant increase of suppressiveness with longer duration – by 8.5 times for up to 90 days. The peaks of suppressiveness coincided with the increased abundance of two of four biopreparation microbial strains – *P. fluorescence* WCS365 and *T. asperellum* T203.

Keywords: compost, suppressiveness, biopreparation, inoculation, *Fusarium oxysporum*

Acknowledgments. This study was supported by the subsidy of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation for applied research (project no. RFMEFI57814X0089).

Figure Captions

Fig. 1. Suppressiveness of the inoculated and non-inoculated compost (A – first inoculation, 120th day; B – second inoculation, 180th day).

Fig. 2. Survival rate of the biopreparation strains inoculated in the compost (*a* – *P. fluorescence* WCS365, *b* – *P. putida* PCL1760, *c* – *T. asperellum* T.203, *d* – *Streptomyces* spp.).

References

1. Rao S. Principles of Weed Science. Ed. 2. New York, Sci. Publ., 2000. 526 p.
2. Liu J., Gilardi G., Sanna M., Gullino M.L., Garibaldi A. Biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato and growth-promoting effect of bacteria isolated from recycled substrates of soilless crops. *Phytopathol. Mediterr.*, 2010, vol. 49, pp. 163–171. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-3095.

3. Lopez-Lopez N., Segarra G., Vergara O., López-Fabal A., Trillas M.I. Compost from forest cleaning green waste and *Trichoderma asperellum* strain T34 reduced incidence of *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. *Biol. Control*, 2016, vol. 95, pp. 31–39. doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.12.014.
4. Xin X., Zhang J., Zhu A., Zhang C. Effects of long-term (23 years) mineral fertilizer and compost application on physical properties of fluvo-aquic soil in the North China Plain. *Soil Tillage Res.*, 2016, vol. 156, pp. 166–172. doi: 10.1016/j.still.2015.10.012.
5. Galitskaya P., Beru F., Kuryntseva P., Selivanovskaya S. Suppressive properties of composts are determined by their raw materials. *Indian J. Sci. Technol.*, 2015, vol. 8, no. 30, pp. 1–7. doi: 10.17485/ijst/2015/v8i30/81875.
6. Markakis E.A., Fountoulakis M.S., Daskalakis G.Ch., Kokkinis M., Ligoigakis E.K. The suppressive effect of compost amendments on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* in cucumber and *Verticillium dahliae* in eggplant. *Crop Prot.*, 2016, vol. 79, pp. 70–79. doi: 10.1016/j.cropro.2015.10.015.
7. Zhang N., He X., Zhang J., Raza W., Yang X.-M., Ruan Y.-Z., Shen Q.-R., Huang Q.-W. Suppression of Fusarium wilt of banana with application of bio-organic fertilizers. *Pedosphere*, 2014, vol. 24, no. 5, pp. 613–624. doi: 10.1016/S1002-0160(14)60047-3.
8. Chen M.-H., Jack A.L.H., McGuire I.C., Nelson E.B. Seed-colonizing bacterial communities associated with the suppression of Pythium seedling disease in a municipal biosolids compost. *Phytopathology*, 2012, vol. 102, no. 5, pp. 478–489. doi: 10.1094/PHTO-08-11-0240-R.
9. Wei Z., Huang J., Yang C., Xu Y., Shen Q., Chen W. Screening of suitable carriers for *Bacillus amyloliquefaciens* strain QL-18 to enhance the biocontrol of tomato bacterial wilt. *Crop Prot.*, 2015, vol. 75, pp. 96–103. doi: 10.1016/j.cropro.2015.05.010.
10. Gilardi G., Demarchi S., Gullino M.L., Garibaldi A. Evaluation of the short term effect of nursery treatments with phosphite-based products, acibenzolar-S-methyl, pelleted *Brassica carinata* and biocontrol agents, against lettuce and cultivated rocket fusarium wilt under artificial inoculation and greenhouse conditions. *Crop Prot.*, 2016, vol. 85, pp. 23–32. doi: 10.1016/j.cropro.2016.03.011.
11. Viterbo A., Landau U., Kim S., Chernin L., Chet I. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2010, vol. 305, no. 1, pp. 42–48. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01910.
12. Desaki Y., Miya A., Venkatesh B., Tsuyumu S., Yamane H., Kaku H. Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells. *Plant Cell Physiol.*, 2006, vol. 47, no. 11, pp. 1530–1540. doi: 10.1093/pcp/pcl019.
13. Bolwerk A., Lagopodi A.L., Lugtenberg B.J.J., Bloemberg G.V. Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2005, vol. 18, no. 7, pp. 710–721.
14. Benitez M.-S., Gardener B.B.M. Linking sequence to function in soil bacteria: Sequence-directed isolation of novel bacteria contributing to soilborne plant disease suppression. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, vol. 75, no. 4, pp. 915–924. doi: 10.1128/AEM.01296-08.
15. Haas D., Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, vol. 3, no. 4, pp. 307–319.
16. Validov S.Z., Kamilova F., Lugtenberg B.J.J. *Pseudomonas putida* strain PCL1760 controls tomato foot and root rot in stonewool under industrial conditions in a certified greenhouse. *Biol. Control*, 2009, vol. 48, no. 4, pp. 6–11. doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.09.010.
17. Galitskaya P., Biktasheva L., Kuryntseva P., Selivanovskaya S. Suppressive properties of composts may be improved by microbial inoculation. *Indian J. Sci. Technol.*, 2016, vol. 7, no. 2, pp. 773–783.
18. Iqbal M.K., Shafiq T., Ahmed K. Characterization of bulking agents and its effects on physical properties of compost. *Biores. Technol.*, 2010, vol. 101, no. 6, pp. 1913–1919. doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.030.
19. Kumar M., Ou Y.-L., Lin J.-G. Co-composting of green waste and food waste at low C/N ratio. *Waste Manage.*, 2010, vol. 30, no. 4, pp. 602–609. doi: 10.1016/j.wasman.2009.11.023.
20. Li Z., Lu H., Ren L., He L. Experimental and modeling approaches for food waste composting: A review. *Chemosphere*, 2013, vol. 93, no. 7, pp. 1247–1257. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.064.
21. Sasaki N., Suehara K., Kohda J., Nakano Y., Yang T. Effects of C/N ratio and pH of raw materials on oil degradation efficiency in a compost fermentation process. *J. Biosci. Bioeng.*, 2003, vol. 96, no. 1, pp. 47–52.
22. Kim T.G., Knudsen G.R. Quantitative real-time PCR effectively detects and quantifies colonization of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. *Appl. Soil Ecol.*, 2008, vol. 40, no. 1, pp. 100–108. doi: 10.1016/j.apsoil.2008.03.013.
23. Kamilova F., Lamers G., Lugtenberg B. Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in tomato root exudate as well as subsequent

- formation of new spores. *Environ. Microbiol.*, 2008, vol. 10, no. 9, pp. 2455–2461. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01638.x.
24. Kinkel L.L., Schlatter D.C., Bakker M.G., Arenz B.E. Streptomyces competition and co-evolution in relation to plant disease suppression. *Res. Microbiol.*, 2012, vol. 163, no. 8, pp. 490–499. doi: 10.1016/j.resmic.2012.07.005.
 25. Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. Handbook of Microbiology. Moscow, Akademiya, 2005. 608 p. (In Russian)
 26. Zaborskih E.I. The antagonistic activity of mesophilic lactic streptococci and their experimental selection. *Cand. Biol. Sci. Diss. Irkutsk*, 1976. 120 p. (In Russian)
 27. Anikiev B. B., Lukomskaya K.A. Handbook for Practical Training in Microbiology. Moscow, Prosveshchenie, 1977. 128 p. (In Russian)
 28. Chervinets Yu.V., Bondarenko V.M., Shabanova Yu.A., Samoukina A.M., Chervinets V.M. Bacteriocinogenic highly antagonistic strains of lactobacilli. *Zh. Microbiol., Epidemiol., Immunobiol.*, 2006, no. 7, pp. 78–81. (In Russian)
 29. Bukharin O.V., Semenov A.V., Cherkasov S.V. Antagonistic activity of probiotic bacteria during their interaction. *Klin. Mikrobiol. Antimikrobn. Khimioter.*, 2010, vol. 12, no. 4, pp. 347–352. (In Russian)
 30. Semenov A.V., Cherkasov S.V. The impact of associative microorganisms on antagonistic activity of bacteria. *Vestn. NGU, Ser. Biol., Klin. Med.*, 2011, vol. 9, no. 3, pp. 20–26. (In Russian)
 31. Irkitova A.N., Kagan Ya.R., Sokolova G.G. Comparative analysis of methods for determining of the antagonistic activity of lactic bacteria. *Izv. Altai. Gos. Univ.*, 2012, no. 3, pp. 41–44. (In Russian)
 32. Hoitink H.A.J., Fahy P.C. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1986, vol. 24, pp. 93–114.
 33. Vestberg M., Kukkonen S., Rantala S., Prochazka P., Tuohimetsä S., Setälä H., Romantschuk M., Kurola J., Yu D., Parikka P. Suppressiveness of Finnish commercial compost against soil borne disease. *Acta Hort.*, 2011, vol. 891, pp. 59–65. doi: 10.17660/ActaHortic.2011.891.5.
 34. Carrero-Carron I., Trapero-Casas J.L., Olivares-García C., Monte E., Hermosa R., Jimenez-Diaz R.M. *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of *Verticillium wilt* in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahlia*. *Crop Prot.*, 2016, vol. 88, pp. 45–52. doi: 10.1016/j.cropro.2016.05.009.
 35. Schwartz E., Scow K.M. Repeated inoculation as a strategy for the remediation of low concentrations of phenanthrene in soil. *Biodegradation*, 2001, vol. 12, no. 3, pp. 201–207.
 36. Gilbert E.S., Crowley D.E. Repeated application of carvone-induced bacteria to enhance biodegradation of polychlorinated biphenyls in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, vol. 50, no. 4, pp. 489–494.
 37. Newcombe D.A., Crowley D.E. Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, vol. 51, no. 6, pp. 877–882.
 38. Myszká K., Schmidt M.T., Olejník-Schmidt A.K., Leja K., Czaczyk K. Influence of phenolic acids on indole acetic acid production and on the type III secretion system gene transcription in food-associated *Pseudomonas fluorescens* KM05. *J. Biosci. Bioeng.*, 2014, vol. 118, no. 6, pp. 651–656. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.05.029.
 39. Larena I., Vazquez G., De Cala A., Melgarejo P., Magan N. Ecophysiological requirements on growth and survival of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum* 212 in different sterile soils. *Appl. Soil Ecol.*, 2014, vol. 78, pp. 18–27. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.02.003.
 40. Schlatter D.C., Samac D.A., Tesfaye M., Kinkel L.L. Rapid and specific method for evaluating *Streptomyces* competitive dynamics in complex soil communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, vol. 76, no. 6, pp. 2009–2012. doi: 10.1128/AEM.02320-09.

Для цитирования: Бикташева Л.Р., Белоногова Н.В., Селивановская С.Ю., Галицкая П.Ю. Эффективность интродукции штаммов микроорганизмов, применяемых для направленного изменения свойств компостов // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2016. – Т. 158, кн. 4. – С. 493–506.

For citation: Biktasheva L.R., Belonogova N.V., Selivanovskaya S.Y., Galitskaya P.Y. On the efficiency of introduction of microbial strains used for adjusted changes of the compost properties. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2016, vol. 158, no. 4, pp. 493–506. (In Russian)