

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ПРАВИТЕЛЬСТВО ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ
ИРКУТСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ СО РАН
БАЙКАЛЬСКИЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Материалы
Всероссийской научно-практической конференции
с международным участием

ИРНТУ 85: ФОРУМ НАУКИ И ИННОВАЦИЙ

(Иркутск, 25 – 27 июня 2015 г.)

ИЗДАТЕЛЬСТВО
Иркутского национального исследовательского технического
университета
2015

5. Хазиахметов Ф.С. Рациональное кормление животных. - СПб.: Лань, 2011. – 368 с.

УДК 579.64

**ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ РИЗОСФЕРЫ И ХАРАКТЕРИСТИКА
БАКТЕРИЙ-АНТАГОНИСТОВ МИКРОМИЦЕТОВ P. *FUSARIUM***

А.М. Марданова, М.Т. Лутфуллин, Г.Ф. Хадиева, Л.Ф. Миннуллина

Институт фундаментальной медицины и биологии, К(П)ФУ
420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, mardanovaayslu@mail.ru

Из ризосферной микрофлоры картофеля выделено 5 штаммов, проявляющих антагонистическую активность в отношении фитопатогенных микромицетов р. Fusarium. Наиболее эффективно рост фитопатогенов ингибируют штаммы B. subtilis 1 и B. subtilis 2. Эти штаммы могут рассматриваться в качестве основы для создания биопрепаратов, которые будут предназначены для контроля возбудителей сухой гнили картофеля, распространенных на территории Республики Татарстан.

Библиогр. 5 назв.

Ключевые слова: ризосферные бактерии; антагонизм; Fusarium; биоконтроль фитопатогенов

Использование биопрепаратов против сельскохозяйственных вредителей и болезней является эффективной альтернативой использованию пестицидов. Возможность применения в сельском хозяйстве биологических средств защиты растений изучается на протяжении десятков лет [1; 4]. Но только в последнее время, когда был накоплен колоссальный исследовательский материал по успешному применению бактерий-антагонистов в сельскохозяйственной практике, начались действительно широкомасштабные разработки технологий получения биопрепаратов различного назначения на основе микроорганизмов [3; 5]. В настоящее время исполь-

зование микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности в качестве альтернативы химическим пестицидам, разработка и создание биопрепаратов на их основе рассматривается как чрезвычайно перспективное направление биотехнологии.

В данной работе было проведено выделение бактерий из ризосферной микрофлоры картофеля с целью оценки потенциала использования этих штаммов в качестве биологических агентов в отношении фитопатогенов.

В качестве тест-культур были использованы штаммы микромицетов-фитопатогенов из коллекции кафедры микробиологии КФУ: *Fusarium sp.*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium tricinctum*, *Alternaria tenuissima*.

Бактерии культивировали на средах МПА (мясо-пептонный агар) и LB (Лурия-Бертани): триптон - 10 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, NaCl - 5 г/л. Среда LBA: триптон - 10 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, NaCl - 5 г/л, агар - 2%. Культивирование проводилось в термостате при температуре 37°C или 28°C при интенсивности качания 200 об/мин для жидких культур.

Для культивирования микромицетов использовали среду **Чапек**: глюкоза - 14,0 г/л, CaCO₃ - 0,7 г/л, KNO₃ - 0,7 г/л, MgSO₄ - 0,35 г/л, NaCl - 0,35 г/л, K₂HPO₄ - 0,35 г/л, FeSO₄ - следы; агар-агар - 20,0 г/л. Микромицеты культивировали при 28°C.

Для идентификации изолятов бактерий использовали отдельные колонии 18-часовой культуры, выращенной при 37°C. Бактерии идентифицировали методом масс-спектрометрии на MALDI BioType (Bruker Daltonik).

Антагонистическую активность бактерий определяли методом агаровых блоков. Культуры микромицетов высевали газонном в чашки Петри со средой Чапек. Чашки помещали в термостат при температуре 28°C на 5-7 суток. Бактерии-антагонисты засевали газонном на поверхность среды МПА. Посевы инкубировали в течение 24 часов. Стерильным пробочным сверлом вырезали блоки микромицетов и помещали их в центр чашки Петри на среду Чапек. На расстоянии 2-2,5 см от блока с микромицетом размещали 2-3 блока с бактериями-антагонистами. Культуры инкубировали при 25-28°C в

течение 3-15 суток. Антагонистическую активность оценивали по степени подавления роста колонии микромицетов.

Для оценки антимикробной активности экзометаболитов использовали культуральную жидкость бактерий, которую вносили в среду культивирования микромицетов в количестве 1:20 по объему после стерилизации. На поверхность среды в чашке Петри накладывали блоки микромицетов и культивировали при температуре 28°C в течение 5-7 суток. Антимикробную активность оценивали по степени подавлению роста колонии микромицета в сравнении с контролем.

Математическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «Microsoft Excel» путем расчета среднеквадратичного отклонения (σ). Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma \leq 15\%$.

Для выделения ризосферных бактерий корешки картофеля раскладывали на поверхности среды МПА в чашке Петри. Для дальнейшего анализа отбирали колонии бактерий, вокруг которых обнаруживалась зона подавления роста других культур. Было выделено 5 штаммов бактерий, чистые культуры которых были идентифицированы на MALDI BioTyper (Bruker Daltonik) (таблица 1). Значение score от 2.0 до 2.5 позволяет определить видовую принадлежность бактерий.

Таким образом, на основе Maldi-анализа и исследований морфологических свойств была определена видовая принадлежность 4 изолятов. Один изолят был идентифицирован как *Bacillus sp.*

Известно, что бактерии рода *Bacillus* могут использоваться в качестве агентов биоконтроля, поскольку они обладают антагонистической активностью в отношении широкого спектра фитопатогенов. К примеру, показано, что штамм *B. subtilis* SKT1-1 обладает высокой антагонистической активностью в отношении фитопатогенных микроорганизмов *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* и *Pythium aphanidermatum* [3].

Методом агаровых блоков была исследована способность выделенных изолятов ингибировать рост микромицетов *Fusarium sp.* Известно, что микромицеты р. *Fusarium* являются серьезными патогенами многих сельскохозяйственных растений и, в том числе, вызывают сухую гниль картофеля [2]. Нами было установлено, что *Ba-*

cillus sp. и *A. calcoaceticus* практически не ингибируют рост микромицета. *E. ludwigii*, *B. subtilis* 1 и *B. subtilis* 2 ингибировали рост колонии микромицета на 3 сутки культивирования на 13, 35 и 50% соответственно. Для дальнейших исследований фунгицидной активности были отобраны три самых активных штамма: *E. ludwigii*, *B. subtilis* 1 и *B. subtilis* 2.

Таблица 1. Идентификация ризосферных бактерий на MALDI BioTyper

№	Название изолята	Score Value
1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2,573
2	<i>Bacillus sp.</i>	1,991
3	<i>Enterobacter ludwigii</i>	2,424
4	<i>Bacillus subtilis</i> 1	2,336
5	<i>Bacillus subtilis</i> 2	2,295

Исследовали способность бактерий *E. ludwigii*, *B. subtilis* 1 и *B. subtilis* 2 подавлять рост колоний микромицетов *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum* и *A. tenuissima*. Эффективность ингибирования выражали в % относительно контроля. В качестве контроля использовали рост колонии микромицетов на среде Чапека (табл. 2 и рис. 1).

Таблица 2. Антагонизм ризосферных бактерий и фитопатогенных микромицетов

№	Бактерии	Подавление роста колонии микромицетов через 7 суток, % от контроля				
		<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. tricinctum</i>	<i>Alternaria tenuissima</i>
1	<i>E. ludwigii</i>	43	63	0	53	77
2	<i>B. subtilis</i> 1	80	71	84	63	80
3	<i>B. subtilis</i> 2	78	74	73	77	83

Посевы анализировали через 3, 5 и 7 суток. Наиболее эффективно рост колоний микромицетов *F. solani*, *F. avenaceum*, *A. tenuis-*

sima ингибировал штамм *B. subtilis* 1 (на 80-84% от контроля). *B. subtilis* 2 ингибировал рост микромицетов на 73-83%. Штамм *E. ludwigii* подавлял рост микромицетов *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. tricinctum*, *A. tenuissima* на 43-77% от контроля, однако он не подавлял рост *F. avenaceum*.

Исследовали антимикробную активность экзометаболитов штаммов *E. ludwigii* и *B. subtilis* 2. Для этого в среду Чапека вносили культуральную жидкость 3-х суточных культур бактерий в количестве 5% от объема. О степени ингибирования судили по диаметру колонии микромицета в сравнении с ростом на контрольной среде в течение 7 сут (рис. 2).

Как видно из рисунка 2, бактерии *B. subtilis* 2 ингибируют рост микромицета *F. oxysporum* гораздо эффективнее, чем *E. ludwigii*. Диаметр колоний микромицетов на среде с экзометаabolитами *B. subtilis* 2 и *E. ludwigii* на 66% и 20% меньше, чем в контроле.

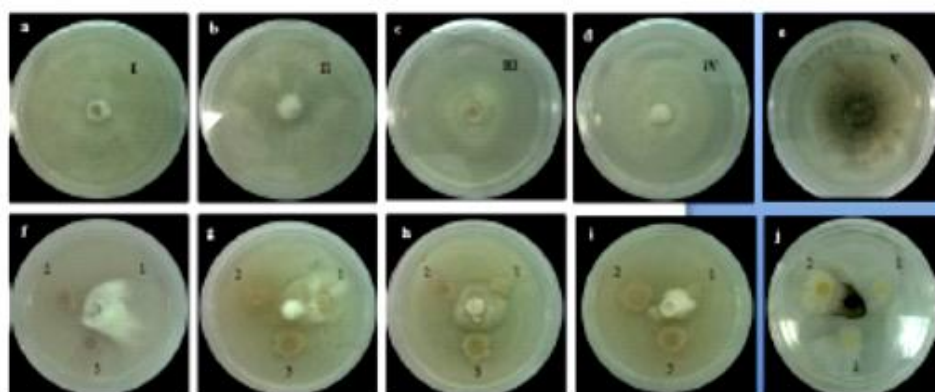


Рис. 1. Ингибирование роста колоний микромицетов ризосферными бактериями. (а-е) – микромицеты: I – *F. avenaceum*, II – *F. solani*, III – *F. tricinctum*, IV – *F. oxysporum*, V – *A. tenuissima*. (f-j) – бактерии и микромицеты: 1 – *E. ludwigii*, 2 – *B. subtilis* 1, 3 – *B. subtilis* 2

Таким образом, из ризосферы картофеля выделены штаммы бактерий с антагонистической активностью в отношении фитопатогенных микромицетов. Наиболее эффективно ингибируют рост колоний фитопатогенов штаммы *B. subtilis* 1 и *B. subtilis* 2. Эти штаммы могут рассматриваться в качестве основы для биопрепаратов, которые будут предназначены для контроля возбудителей сухой

гнили картофеля (р. *Fusarium*), распространенных на территории Республики Татарстан.

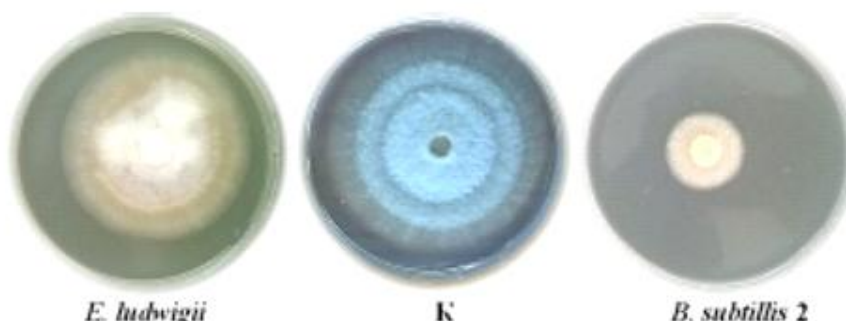


Рис. 2. Рост колонии *F. oxysporum* в присутствии экзометаболитов *B. subtilis* 2 и *E. ludwigii*. 7 суток культивирования. К – контроль

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной КФУ для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект 14-83).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Babalola O.O. Beneficial bacteria of agricultural importance. // *Biotechnol Lett.* 2010, 32, 11, P.1559-1570.
2. Du M., Ren X., Sun Q., Wang Y., Zhang R. Characterization of *Fusarium* spp. Causing potato dry rot in china and susceptibility evaluation of Chinese potato germplasm to the pathogen. // *Potato Research*, 2012, 55, P.175-184.
3. Huang T.P., Tzeng D.D., Wong A.C., Chen C.H., Lu K.M., Lee Y.H., Huang W.D., Hwang B.F., Tzeng K.C. DNA polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. // *PLoS One*, 2012, 7, 7:e42124.
4. Saraf M., Pandya U., Thakkar A. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. // *Microbiol Res.* 2014, 169, 1, P.18-29.
5. Xu S.J., Kim B.S. Biocontrol of *Fusarium* crown and root rot and promotion of growth of tomato by *Paenibacillus* strains isolated from soil. // *Mycobiology.* 2014, 42, 2, P.158-166.