

## ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИФУНГАЛЬНЫХ СВОЙСТВ *PSEUDOMONAS AUREOFACIENS* 2006

Изучена возможность использования хитина для увеличения уровня биомассы и сохранения жизнеспособности бактерий *Pseudomonas aureofaciens* 2006. Проведены лабораторные испытания фунгицидного действия культуральной жидкости исследуемых бактерий. Показано, что предварительная обработка семян томата и последующее внесение бактерий в почву замедляет или полностью тормозит рост фитопатогенных грибов *Fusarium culmorum* и *Botrytis cinerea*. Антагонистические бактерии *Pseudomonas aureofaciens* 2006, внесенные в почву, способствуют ее оздоровлению.

**Ключевые слова:** биопрепараты, *Pseudomonas aureofaciens* 2006, антифунгальные свойства, хитин.

Интенсификация сельскохозяйственного производства предполагает широкое применение пестицидов, что увеличивает опасность загрязнения продуктов растениеводства. Развитие биотехнологических способов защиты сельскохозяйственных растений от болезней связано с разработкой новых биопрепаратов, не только функционально эффективных, но и экологически безопасных как для человека, так и для почвенной микробиоты [1]. Бактерии рода *Pseudomonas* относятся к числу наиболее перспективных агентов биологической защиты сельскохозяйственных растений от заболеваний. Среди представителей этой группы микроорганизмов встречаются не только антагонисты почвенных фитопатогенов [2, 3, 4], многие штаммы *Pseudomonas* активно способствуют улучшению роста и развития растений [5, 6, 7, 8]. Являясь типичными представителями ризосферы растений и обладая высокой скоростью роста, интродуцированные псевдомонады успешно колонизируют ризосферу растения-хозяина [9, 10, 11] и контролируют развитие фитопатогенов как за счет конкуренции за экологическую пищу – источники углерода и энергии [12], так и продуцируя различные антифунгальные метаболиты [13] или гидролитические ферменты, разрушающие клеточные стенки грибов [14, 15].

При разработке технологии биопрепаратов важно подобрать питательные среды, обеспечивающие не только максимальный выход биомассы, но и снижение себестоимости готового продукта. Перспективным является использование промышленных отходов. Одним из таких отходов спиртового производства является барда, содержащая белки, минеральные соли, остатки полисахаридов. Традиционный и наиболее простой путь использования барды – скармливание животным в нативном виде –

вследствие быстрого закисания является затруднительным и экономически убыточным. Использование жидкой фракции послеспиртовой барды как основы питательной среды при выращивании *Pseudomonas aureofaciens* 2006 позволит удешевить технологию получения биопрепарата для защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов.

Для совместного решения существующих проблем нами предложен способ глубинного выращивания бактерий *Pseudomonas aureofaciens* на жидкой фракции послеспиртовой барды с последующей обработкой посевного материала и почвы при выращивании культурных растений.

В работе изучалось влияние хитина на увеличение выхода биомассы и сохранение жизнеспособности бактерий *Pseudomonas aureofaciens* 2006 при культивировании на жидкой фракции послеспиртовой барды. Была проведена оценка фунгицидных свойств культуральной жидкости исследуемых бактерий в отношении развития фитопатогенных грибов при выращивании томата.

### Материалы и методы

Объектами исследования служили чистые культуры бактерии *Pseudomonas aureofaciens* 2006, селекционированной на кафедре биотехнологии Мордовского госуниверситета им. Н.П. Огарева, и фитопатогенных грибов *Fusarium culmorum* и *Botrytis cinerea*, предоставленных сотрудниками кафедры микологии и альгологии Московского госуниверситета им. М.В. Ломоносова. Грибные культуры поддерживали в среде Чапека - Докса, бактерии – на глюкозо-пептонном агаре.

Ранее нами были оптимизированы условия роста *Pseudomonas aureofaciens* 2006 на жидкой

фракции послеспиртовой барды [18, 19]. Для увеличения титра клеток глубинное культивирование проводили на послеспиртовой барде с добавлением коллоидного хитина в количестве 1% от объема среды при 150 об/мин и 28 °С в течение 23 часов. Каждые 2 ч., начиная с 17 ч. культивирования, определяли сухую биомассу методом высушивания по стандартной методике.

Для определения микопаразитических свойств бактериальной суспензии проводили обработку семян и ростков томата в следующих вариантах: 1 – семена, обработанные культуральной жидкостью, содержащей живую культуру бактерии *Ps. aureofaciens* 2006; 2 – замачивание семян и вторичная обработка бактериальной суспензией ростков томата; 3 – необработанные семена (контроль). После всхода семян и формирования листьев осуществляли заражение почвы путем внесения суспензии фитопатогенных грибов *Fusarium culmorum* и *Botrytis cinerea*, выращенных на картофельной среде при 28 °С в течение 2 сут. Активность бактерий в отношении фитопатогенов оценивали по отсутствию зоны роста грибов в почве и развитию растений.

Все результаты получены не менее чем в двух последовательных опытах, каждый из которых состоял из пяти повторностей. Результаты обрабатывали статистически по общепринятым в биологии методам [20]. Сравнение вариантов опытов проводили при 5% уровне значимости по t-критерию Стьюдента. В таблице представлены средние значения из всех опытов с их стандартными ошибками.

### Результаты и обсуждение

Известно, что многие виды бактерий рода *Pseudomonas* за счет секретируемого хитиназы способны использовать хитин в качестве единственного источника углерода. Кроме того, продукция хитиназы многими организмами является важным защитным фактором против воздействия различных патогенов. Поэтому в качестве дополнительного источника углерода и для активации ферментного комплекса бактерий мы использовали коллоидный хитин.

Было получено, что при культивировании бактерий *Ps. aureofaciens* 2006 на жидкой фракции послеспиртовой барды без добавления хитина (контроль) максимальное количество био-

массы образовывалось через 21 час роста и превысило начальное значение в 5,9 раза (табл. 1). Добавление коллоидного хитина в барду не только увеличило выход бактериальной биомассы в 1,3 раза относительно контроля, но и позволило уменьшить время культивирования до 20 часов. При этом титр активных клеток составил  $3,5 \cdot 10^8$  в 1 мл. Через 45 суток хранения при пониженной температуре культуральная жидкость бактерий характеризовалась высоким содержанием жизнеспособности клеток  $10^8$  КОЕ/мл.

Полученная бактериальная суспензия была использована для дальнейшей обработки семян. Замачивание семян в культуральной жидкости бактерий не повлияло на скорость их прорастания, но способствовало ускоренному всходу и развитию ростков томата по сравнению с контролем. Ускоренный рост, согласно литературным данным, обусловлен выделением бактериями *Pseudomonas* ростового фактора индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), которая стимулирует развитие корневой системы растений и улучшает фосфорное питание [21].

После формирования растений все варианты опыта были подвержены заражению фитопатогенами путем их внесения в грунт. При наблюдении за ростом томатов было отмечено, что поверхность грунта контрольных, т.е. не обработанных псевдомонадами ростков, оказалась заражена, как и часть побегов, грибами. Процент гибели контрольных ростков томата при воздействии гриба *F. culmorum* составил 21%, а *B. cinerea* – 10%. В варианте с вторичной обработкой суспензией *Ps. aureofaciens* 2006 заражения фитопатогенны-

Таблица 1. Динамика содержания биомассы *Pseudomonas aureofaciens* 2006 при культивировании на жидкой фракции послеспиртовой барды

Время культивирования, часы	Нативная барда	Барда с добавлением хитина
0	1,5 0,1	1,5 0,1
2	3,7 0,1	5,3 0,3
17	7,6 0,5	9,8 0,7
19	7,9 0,5	10,9 0,7
20	8,4 0,6	11,5 0,8
21	8,6 0,6	10,6 0,7
22	8,9 0,6	10,5 0,7
23	8,0 0,5	10,2 0,7

ми грибами опытных растений отмечено не было. В варианте, где обрабатывались только семена томата, выявлен незначительный процент заражения растений. При повторной обработке пораженных фитопатогенами участков грунта и растений культуральной жидкостью бактерий удалось добиться уменьшения площади заражения грибами и не было выявлено новых погибших растений.

Следует отметить, что в исследуемых условиях развитие *B. cinerea* по сравнению с *F. culmorum* происходило менее интенсивно, что может являться результатом более сильного влияния антифунгальных веществ, продуци-

руемых *Ps. aureofaciens* 2006, на данный фитопатоген.

Наблюдение на предмет обнаружения зараженного грунта ни в одном из исследуемых вариантов растений спустя 30 суток с момента заражения грибами такового не выявило.

Таким образом, показано, что обработка семян и ростков томата культуральной жидкостью *Ps. aureofaciens* 2006 может значительно снизить потери урожая от вредоносного действия фитопатогенных грибов. Кроме того, орошение почв культуральной жидкостью *Ps. aureofaciens* 2006 способствует ее оздоровлению за счет снижения уровня развития фитопатогенов.

#### Список использованной литературы:

1. Логинов О.Н. Новые микробиологические препараты для сельского хозяйства и восстановления окружающей среды. Автореферат дис. ...д-ра биол. наук. УФА: институт биологии УНЦ РАН, 2004.
2. Osburn, R.M., Schroth, M.N., Hancock, J.G. et al. Dynamics of sugar beet colonization by *Pythium ultimum* and *Pseudomonas* species: effects on seed rot and damping-off // *Physiol plant.* – 1990. – V. 79. – №6. – P. 709-716.
3. Elsherif, M., Grossmana, F. Versuche zur biologischen Bekämpfung einiger phytopathogener Pilze durch fluoreszierende Pseudomonaden unter Anwendung verschiedener Applikationsverfahren // *Z. Pflanzenkrankh und Pflanzenschutz.* – 1991. – Bd. 98. – № 3. – S. 236-249.
4. Zaspel, J. Isotierung and Selektion fluoreszierender *Pseudomonas*-Arten als Antagonisten gegen *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx et Olivier // *Arch. Phytopathol. Pflzshuts.* 1989. Bd. 25. H.2. S. 123-130.
5. Максимова, Н.П., Лысак, В.В., Игнатович, В.В. и др. Пат.2051586 Российская Федерация, 6 А01 N63/00, С 12 N 1/20 // С 12 N 1/20, С 12 R 1:40. Штамм бактерий *Pseudomonas putida* – биостимулятор роста растений. Заявлено 12.07.91; Оpubл. 10.01.96. Биол. 1.
6. Pietr S.J., Kempa R. Cucumber rhizosphere pseudomonas as antagonists of *Fusarium* // *Interrelationships Between Microorganisms and Plant Soil / Proc. Int. Symp. Praha: June 22-27, 1987.* P. 411-417.
7. Renato de Freitas J., Germida J.J. *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculation for biocontrol of *Rhizoctonia solani* // *Can. J. Microbiol.* 1991. V. 37. № 10. P. 780–784.
8. Свешникова, Е.В. Новые бактерии рода *Pseudomonas* – антагонисты фитопатогенов и перспективы их использования в сельскохозяйственной практике. Автореферат дис. ...канд. биол. наук. Уфа: институт биологии УНЦ РАН, 2003.
9. Гарагуля, А.Д., Бабич, Л.В., Киприанова, Е.А. Способность различных видов бактерий рода *Pseudomonas* к колонизации корней пшеницы // *Микробиол.* – 1988. – Т. 50. – №. 6. – С. 77-81.
10. Bahme, J.B., Schroth, M.N. Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato // *Phetopathology.* – 1987. – V. 77. – №. 7. – P. 1093-1100.
11. Caponigro, V., Contillo, R. Coloizzazione radicale di tabacco con *Pseudomonas fluorescens* // *Ann. Ist. Sper. Tabacco. Scafoti (Salerno).* – 1986. – v. 12. – P. 49-64.
12. Lugtenberg, B.J.J., Dekkers L.C., What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? // *Environ. Microbiol.* – 199. – V. 1. – P. 9-13.
13. Thomashow, L.S., Weller, D.M. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites // *Plant Microbe Interactions.* Ed by Stacey G., Keen N. / New York: Chapman and Hall. – 1996. – V. 1. – P. 187-235.
14. Dunne, C., Moenne, L.Y., McCarthy, J. et al. Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium* – mediated damping-off of sugar beet // *Plant pathology.* – 1998. – V. 109. – P. 299-307.
15. Шапошников, А.И. Механизмы антагонистического действия бактерий на фитопатогенные грибы в ризосфере овощных культур. Автореферат дис. ...канд. биол. наук. УФА: институт биологии УНЦ РАН, 2003.
16. Антипов, С.Т., Журавлев, А.В. Послеспиртовая зерновая барда: Технология переработки // *Производство спирта и ликероводочных изделий.* – 2005. – №4. – С. 9-11.
17. Олийничук, С.Т., Кошель, М.И., Каранов, Ю.А. Утилизация меласной послеспиртовой барды и очистка стоков // *Техника и технология.* – 2006. – №2. – С. 42-43.
18. Лукаткин, А.А., Ибрагимова, С.А., Ревин, В.В. Изучение влияния степени перемешивания на рост бактерий *Pseudomonas aureofaciens* на послеспиртовой барде // *Первые чтения памяти профессора О.А. Зауралова.* – 2007. – С. 69-71.
19. Лукаткин, А.А., Ибрагимова, С.А., Ревин, В.В. Оптимизация условий культивирования бактерий *Pseudomonas aureofaciens* на послеспиртовой барде // *Новые технологии в экспериментальной биологии и медицине.* – 2007. – С. 144-145.
20. Лакин, Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа. – 1980. – 293 с.
21. Смирнов, В.В., Киприанова, Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas* / Киев: Наук. Думка. – 1990. – 264 с.