

ЭФФЕКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* КАК АНТАГОНИСТОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ *P. ALTERNARIA NEES*

Федюшко И.А.

*Белорусский государственный университет, Минск,
fiadziushka.ilya@gmail.com*

Виды грамположительных эндоспорообразующих бактерий рода *Bacillus* давно стали объектами изучения в разных аспектах микробиологии и биотехнологии. Одним из них является исследование метаболического потенциала бактерий, обусловленного генетически. При этом для биотехнологии в целом весьма важна существующая внутривидовая изменчивость т.к. наличие определённых мутаций приводит, иногда, к проявлению сверхэкспрессии ценных генов и появлению сверхпродуцента различных соединений. Одним из таких комплексов веществ, продуцируемых бактериями рода *Bacillus*, являются антибиотики (АБ) [0].

В сельскохозяйственной микробиологии многие микроорганизмы, в том числе и *Bacillus*, стали изучать и использовать как основной компонент биологических средств защиты растений. Одним из свойств, которыми должны обладать предположительные штаммы-антагонисты – антибиотическая активность [0, 0]. Данный показатель определяет способность бактерий сдерживать распространение патогенов, развитие эпифитотий, а также снижать общий инфекционный фон почвы, в которой произрастают растения. Одним из наиболее изученных представителей данного рода является *B. subtilis*, давно известный как продуцент 20-ти АБ, обладающий в разной степени антимикробным действием [0].

Целью работы является сравнение антифунгальной активности среди 4-х штаммов *B. subtilis* по отношению к анаморфным фитопатогенным микромицетам рода *Alternaria* Nees.

Для исследования были отобраны штаммы бактерий из активной коллекции кафедры микробиологии БГУ: *B. subtilis* 494, *B. subtilis* 4k31, *B. subtilis* 8 и *B. subtilis* 8-1.

В качестве тест-грибов были использованы *A. radicina* (ARad_mf16.2), возбудитель альтернариоза моркови; *A. mali* (AMal_ir01), возбудитель альтернариоза листьев яблони; *A. brassicicola* (ABr-la_mf02/1), возбудитель альтернариоза листьев капусты; *A. petroselini* (APet_mf12.1), возбудитель альтернариоза листьев петрушки и *A. sp.* (Alt18if04), выделенный с листьев яблони с симптомами краевого ожога. Все тест-грибы хранятся в коллекции фитопатогенных микромицетов кафедры ботаники БГУ.

Для определения степени угнетения вегетативного роста мицелия (Р, %) и конидиеобразования (I, %) была использована методика отсроченного

антагонизма [0]. В качестве питательной среды использовали картофельно-морковный агар (КМА). Культуры бактерий высевали кольцом ($d = 4$ см), культивировали при 25 ± 1 °С в течение суток. По истечении 24 ч. в центр сформировавшегося бактериального кольца вносили тест-гриб, совместное культивирование осуществляли при 23 ± 1 °С в течение 5 дней, повторность трёхкратная. Показатели ингибирования высчитывали по формулам, приведённым в используемой методике.

Выбранная методика определения уровня антагонизма по отношению к фитопатогенным грибам показывает, в основном, наличие фунгистатических, а не фунгицидных свойств, т.к. явление биоцидности против микроорганизмов должно выражаться в форме лизиса клеток фитопатогена, а не только задержки вегетативного роста и репродукции. Следовательно, нужно интерпретировать результаты эксперимента как наличие разной степени фунгистатических свойств штаммов-антагонистов.

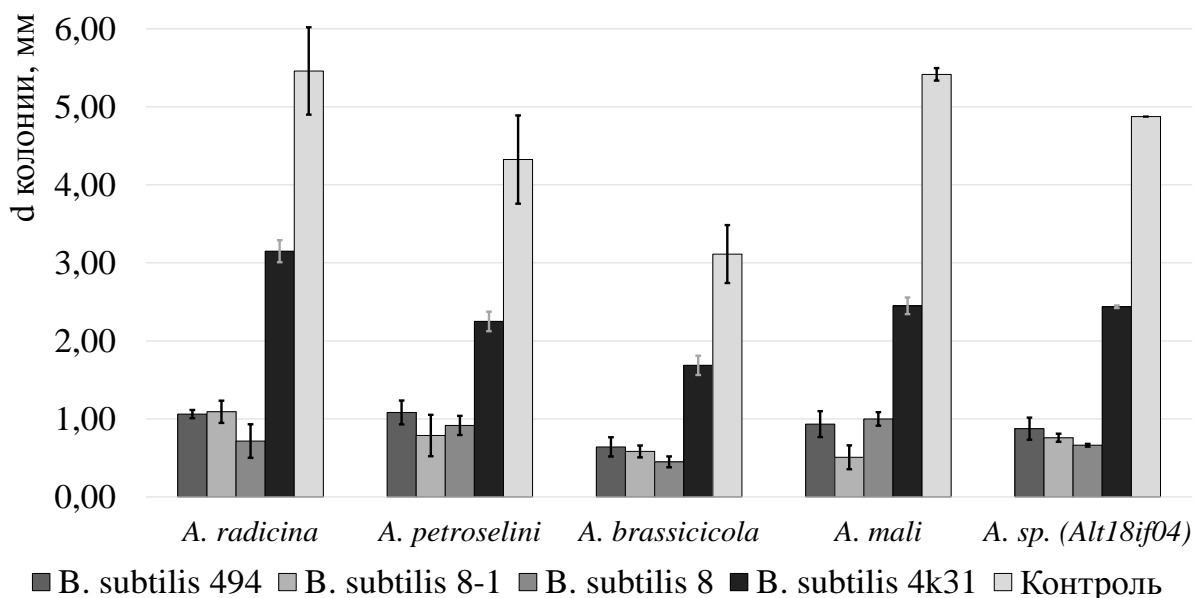


Рисунок 1 – Влияние штаммов *B. subtilis* на вегетативный рост колонии грибов.

Как видно из рисунка 1, все исследуемые штаммы обладают в разной степени фунгистатической активностью по способности ингибировать вегетативный рост. Однако, слабее всех это свойство проявляет штамм *B. subtilis* 4k31. Показатель ингибирования P у данного штамма колеблется в диапазоне от 42,3 до 50%, что видно из таблицы 1. При этом данный штамм сильнее ингибирует *A. brassicicola*, чем иные тест-грибы.

Лучшими ингибиторами вегетативного роста являются три остальных штамма. Если сравнивать их между собой, то наибольшим ингибированием вегетативного роста грибов *A. radicina* (86,9%), *A. sp.* (86,4%) и *A. brassicicola* (85,5%) характеризуется *B. subtilis* 8. Для двух видов *A. mali* (89,9%) и *A. petroselini* (81,8%) лучшим ингибитором оказался штамм *B. subtilis* 8-1.

Штамм *B. subtilis* 494 давно является основой для биопрепарата Бактоген, разработанного в НИЛ молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета БГУ. Он рекомендован против мучнисторосяных грибов, альтернариозов, кладоспориоза, пероноспороза, различных бактериозов и др. заболеваний огурцов, томатов и капусты [0]. По нашим данным (табл. 1, рис. 1) видно, что этот штамм обладает достаточно высокими значениями Р по отношению к используемым тест-грибам в диапазоне от 74,9 до 82,1%.

Таблица 1 – Показатели ингибирования вегетативного роста (Р, %) и конидиеобразования (I, %) грибов рода *Alternaria* Nees

| Вид, штамм | <i>A. sp.</i> | <i>A. radicina</i> | <i>A. petroselini</i> | <i>A. brassicicola</i> | <i>A. mali</i> |
|-------------------------|---------------|--------------------|-----------------------|------------------------|----------------|
| | Р, % | | | | |
| <i>B. subtilis</i> 494 | 82,1 | 80,5 | 74,9 | 79,4 | 82,1 |
| <i>B. subtilis</i> 8 | 86,4 | 86,9 | 78,8 | 85,5 | 80,9 |
| <i>B. subtilis</i> 4k31 | 50,0 | 42,3 | 47,9 | 45,8 | 54,3 |
| <i>B. subtilis</i> 8-1 | 84,4 | 80,0 | 81,8 | 81,3 | 89,9 |
| Вид, штамм | I, % | | | | |
| <i>B. subtilis</i> 494 | 94,5 | 87,6 | 78,1 | 88,9 | - |
| <i>B. subtilis</i> 8 | 87,2 | 88,3 | 89,9 | 74,0 | |
| <i>B. subtilis</i> 4k31 | 73,9 | 67,1 | 72,4 | 84,1 | |
| <i>B. subtilis</i> 8-1 | 86,4 | 84,9 | 88,6 | 84,1 | |

Был проанализирован второй изучаемый показатель: интенсивность ингибирования конидиеобразования, т.е. степень угнетения репродукции грибов. Это важный показатель, от которого во многом зависит распространение и скорость развития болезни. Можно констатировать, что у всех использованных видов альтернарии, кроме *A. mali*, происходило значительное подавление репродуктивной функции под влиянием метаболитов бактерий, выделяемых в среду.

Если сравнивать показатели I и Р, то можно отметить, что все штаммы *B. subtilis* ингибируют репродукцию грибов несколько сильнее, чем вегетативный рост.

Отмечено дифференцированное влияние штаммов бактерий на разные виды альтернарий. Так, *B. subtilis* 494 лучше других подавляет размножение грибов *A. sp.* (94,5%) и *A. brassicicola* (88,9%).

Для *A. radicina* и *A. petroselini* лучшим ингибитором конидиеобразования являются штаммы *B. subtilis* 8 и *B. subtilis* 8-1 (84,1 – 88,9%).

Совершенно другую реакцию проявил возбудитель пятнистости яблони *A. mali*, у которого в условиях анатагонизма с *B. subtilis* на фоне подавления вегетативного роста начинается активное образование конидий. В результате этого показатель ингибирования становится резко отрицательным, что можно

рассматривать как защитное явление патогена, способствующее увеличению расселения (табл. 2).

Таблица 2 – Интенсивность образования конидий *A. mali* при совместном культивировании с бактериями

| Вид, штамм | Интенсивность конидиеобразования (I), шт/см ² × 10 ⁵ | |
|-------------------------|--|-------------|
| | контроль | эксперимент |
| <i>B. subtilis</i> 494 | 0,78±0,06 | 4,20±2,55 |
| <i>B. subtilis</i> 8 | | 12,9±0,42 |
| <i>B. subtilis</i> 4k31 | | 3,74±3,82 |
| <i>B. subtilis</i> 8-1 | | 4,37±0,60 |

В эксперименте под влиянием бактерий количество конидий, образовавшихся уже на 5-е сутки, оказалось в 5 – 17 раз больше, чем в контроле. В контроле же массовое образование конидий у *A. mali*, ($20,08 \pm 12,9 \times 10^5$ шт/см²) происходит только после 1,5-недельного периода роста. Можно предположить, что зарегистрированное явление связано с высокой агрессивностью патогена.

Таким образом, при сравнении между собой исследуемых штаммов *B. subtilis* видно, что все они имеют выраженный в разной степени фунгистатический эффект. Наиболее стабильный высокий эффект ингибирования ростовых (80,0 – 89,9%) и репродуктивных (84,9 – 88,6%) процессов у разных видов патогенов р. *Alternaria* отмечен для штамма *B. subtilis* 8-1. Он может быть эффективен для защиты от альтернариозов. Штамм *B. subtilis* 4k31 обладает недостаточной биоактивностью. Скорее всего это связано с особенностями организации генома данного штамма и как следствие этого проявление более низкой антифунгальной активности.

Литература

1. Максимова, Н.П. Бактерии на страже урожая / Максимова Н.П., Феклистова И.Н., Лысак В.В., Гринева И.А. // Наука и инновации, 2019. – № 3 (193). – С. 13 – 16.
2. Методические указания к занятиям спецпрактикума по разделу «Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов» для студентов 4 к. дневного отделения специальности «G 31 01 01 – Биология» / Авт.-сост. В.Д. Поликсенова, А.К. Храпцов, С.Г. Пискун. – Минск: БГУ, 2004. – С. 36.
3. Ahemad M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective / M. Ahemad, M. Kibret // Journal of King Saud University. Science. – 2014, № 26. – P. 1 – 20.
4. Stein, T. *B. subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific function / T. Stein // Molecular Microbiology. – 2005. – Vol 56. – P. 845 – 857.