

УДК 532.532.2

## СКРИНИНГ МИКРООРГАНИЗМОВ, СПОСОБНЫХ К ПОДАВЛЕНИЮ РОСТА МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *FUSARIUM*

Э.А. Кабрера Фуентес, Р.Т. Мухаметшина, Р.А. Габитов,  
Н.Г. Захарова, Т.В. Багаева, Р.П. Ибатуллина

### Аннотация

В качестве основы для биопрепаратов по защите растений от фузариозов изучены изоляты бактерий и микромицетов, выделенные из различных экологических ниш Татарстана. Установлено, что два вида бактерий – *Bacillus* sp. и *Pseudomonas* sp. – и один моноспоровый изолят микромицета *T. koningii* 406 (1) обладают наибольшей биофунгицидной активностью относительно фитопатогенных грибов рода *Fusarium*.

**Ключевые слова:** бактерии, микромицеты, род *Fusarium*.

---

### Введение

Одним из аспектов повышения урожайности сельскохозяйственных культур является возможность предотвращения потерь сельскохозяйственной продукции благодаря использованию биопрепаратов по защите растений. Основу предлагаемой стратегии составляют процессы, связанные со сдерживанием развития и размножения патогенных организмов с помощью микроорганизмов-антагонистов, культивируемых в лабораторных условиях и интродуцируемых в агроценоз. К примеру, положительные результаты были получены при применении таких биопрепаратов, как триходермин (на основе грибов рода *Trichoderma*), фитоспорин (на основе бактерий *Bacillus subtilis*), агат (*Pseudomonas aureofaciens*), планриз (*Pseudomonas fluorescens*), фитолавин (*Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces griseus*), и других [1–3]. Однако поиск новых штаммов, обладающих комплексом положительных свойств (высокий уровень биопестицидной, биофунгицидной активности, рост регулирующей активности), а также соответствующих определенным эколого-географическим условиям, продолжается. Особое внимание уделяется созданию биопрепаратов, способных подавлять рост наиболее опасных и плохо регулируемых типов возбудителей заболеваний, к числу которых относятся и микромицеты рода *Fusarium*, вызывающие угнетение и гибель практически всех важных сельскохозяйственных растений.

Настоящая работа посвящена скринингу микроорганизмов, перспективных в качестве средств биологической регуляции роста сельскохозяйственных растений и способных к подавлению возбудителей фузариоза.

## 1. Материалы и методы

Цель исследования состояла в изучении действия изолятов бактериальных культур и микромицетов рода *Trichoderma*, выделенных из образцов различных экологических ниш Республики Татарстан, с поверхности овощных культур (картофель), с поверхности семян и вегетативных органов зерновых культур (пшеница, кукуруза), из ризосферы декоративных растений (розы), на штаммы фитопатогенных микромицетов. В экспериментах использовали природный штамм *Fusarium oxysporium* (KP) и музейный штамм *Fusarium oxysporium*. Штамм *Fusarium oxysporium* был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Пушкино). Штамм *Fusarium oxysporium* (KP) был выделен из образцов с поверхности картофеля, культивируемого в Республике Татарстан, идентифицирован по принятым методам и проверен на фитопатогенность [4].

Родовую принадлежность бактериальных штаммов определяли по принятым морфологическим и физиолого-биохимическим показателям. Морфолого-культуральные свойства бактерий и грибов изучали на средах: МПА и картофельно-глюкозном агаре (PDA) [4].

Гетерогенность популяции изолятов микромицетов оценивали по их принадлежности к определенному культурально-морфологическому типу (КМТ) [5, с. 159–163]. Моноспоровые культуры грибов получали по принятым методам при выращивании на жидких питательных средах [6]. Вегетативную совместимость изолятов исследовали сращиванием от двух до восьми колоний в чашках Петри со стерильной средой PDA. Характер проявления реакций при визуальной оценке и микроскопировании сравнивали с описаниями, приведенными в работе Ю.Т. Дьякова и А.В. Долговой [7].

Антагонистическую активность изолятов бактерий проверяли методом лунок и блоков [8]. Биофунгицидную активность определяли методом встречных культур как при оптимальной температуре для роста микроорганизмов (28 °С), так и при 15 °С в опытах с микромицетами [9]. Тип взаимоотношений между исследуемыми организмами характеризовали используя шкалу Джонсона и Карла [10].

Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ Excel.

## 2. Результаты и их обсуждение

Известно, что основу большинства биопрепаратов по защите растений составляют бактерии и грибы-антагонисты. Однако разнообразие микроорганизмов, их активность в определенных эколого-географических зонах требуют расширения продуцентов, способных к комплексной защите растений от патогенов и насекомых.

В наших исследованиях поиск средств биозащиты растений был проведен по двум направлениям. Во-первых, он был направлен на изучение бактериальных микроорганизмов, способных к биофунгицидной активности относительно возбудителей наиболее опасного типа заболеваний растений – фузариоза. Во-вторых – на изучение изолятов гриба рода *Trichoderma*.

Табл. 1

## Биофунгицидное действие бактериальных изолятов

№	Штаммы	Антагонистическая активность (зоны подавления, мм)	
		<i>Fusarium oxysporium</i>	<i>Fusarium oxysporium</i> (KP)
1	<i>B. subtilis</i>	35.6 ± 2.0	40.2 ± 2.2
2	<i>B. megaterium</i>	28.0 ± 1.8	30.2 ± 1.9
3	<i>B. mycoides</i>	36.6 ± 2.8	41.6 ± 2.4
4	<i>Micrococcus</i> sp.	17.2 ± 0.9	18.4 ± 0.8
5	<i>Serratia marcescens</i>	20.8 ± 0.4	22.4 ± 0.6
6	<i>Arthrobacter</i> sp.	17.6 ± 0.4	18.2 ± 0.4
7	<i>Pseudomonas</i> sp.	30.0 ± 1.2	32.0 ± 1.4

Из образцов различных типов почв Татарстана, с поверхности овощных культур (картофель), с поверхности семян и вегетативных органов зерновых культур (пшеница, кукуруза), из ризосферы декоративных растений (розы) были выделены представители более 25 различных родов бактерий, среди которых преобладали микроорганизмы р. *Bacillus*, р. *Pseudomonas*, были представлены в меньшем количестве – р. *Micrococcus*, р. *Sarsina*, р. *Arthrobacter*, р. *Serratia* и других. Все выделенные изоляты характеризовались активным ростом и способностью в той или иной мере подавлять рост тест-объектов (*F. oxysporium* и *F. oxysporium* (KP)).

Изучение биофунгицидного действия изолятов проводили на двух штаммах патогенных грибов *Fusarium oxysporium*. Выбор данных микроорганизмов не случаен: они вызывают одно из наиболее опасных и распространенных заболеваний растений – фузариоз.

Результаты исследований показали, что биофунгицидной активностью обладало значительно меньшее число выделенных изолятов. Среди полученных и идентифицированных штаммов биофунгицидным действием обладали 3 штамма рода *Bacillus* (предположительно *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*), штамм *Pseudomonas* sp., штамм отнесенный к *Serratia marcescens*, штамм *Micrococcus* sp. и штамм *Arthrobacter* sp. (табл. 1).

Проверка действия этих штаммов на фитопатогенные грибы рода *Fusarium* выявила группу микроорганизмов, обладающих наибольшей антагонистической активностью: ее составляли бактерии рода *Bacillus*. Наиболее высокую антагонистическую активность проявлял штамм *B. mycoides* (размер зоны подавления роста *F. oxysporium* и *F. oxysporium* (KP) – 36.6 ± 2.8 мм и 41.6 ± 2.4 мм соответственно) и штамм *Pseudomonas* sp. (30.0 ± 1.2 мм и 32.0 ± 1.4 мм).

Полученные данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований, где основу разрабатываемого биопрепарата (бацизулин) составлял штамм бактерий рода *Bacillus* [11].

Среди грибов-антагонистов активно изучаются представители рода *Trichoderma* (они продуцируют антибиотики, комплексы различных ферментов, обладающих антибактериальными и антигрибковыми свойствами) [12]. Однако следует заметить, что для промышленного использования грибов рода *Trichoderma* важна стабильность признаков, характерная только для моноспоровых изолятов, в то время как природные штаммы представляют собой, как правило, комплекс

Табл. 2

Биофунгицидное действие изолятов микромицета и их характеристика

<i>T. koningii</i> № изолята	КМТ	ТАА	Тип вегетативной совместимости	Кинетические параметры, мм/ч <sup>-1</sup>
1	II	B	Барраж, мелдинг-реакция	0.085–0.092
1 (1)	II	B	Бордюр	0.082–0.088
1 (2)	II	B	мелдинг-реакция	0.081–0.086
183	II	B	Валик, мелдинг-реакция, индифферентная реакция	0.088–0.094
183 (1)	II	D	Индифферентная реакция	0.081–0.085
183 (6)	II	D	Индифферентная реакция	0.120–0.125
406	IV	B	Бордюр, мелдинг-реакция, индифферентная реакция	0.125–0.132
406 (1)	IV	E	Бордюр	0.125–0.134
406 (2)	IV	D	Индифферентная реакция	0.118–0.125

КМТ – культурально-морфологический тип.

ТАА – тип антагонистической активности.

клонов с различными физиологическими и морфологическими признаками. В связи с этим на первом этапе исследований было проведено изучение структуры аборигенных штаммов *Trichoderma koningii* 1, 183, 406. Полученные результаты показали, что в состав гетерогенной популяции изолята *Trichoderma koningii* 1 входят 2 клона: *T. koningii* 1 (1) и *T. koningii* 1 (2); *Trichoderma koningii* 183 – 2 клона: *T. koningii* 183 (1) и *T. koningii* 183 (6); *Trichoderma koningii* 406 – 2 клона: *T. koningii* 406 (1) и *T. koningii* 406 (2).

Все выделенные изоляты принадлежали к двум стабильным культурально-морфологическим типам из четырех ранее описанных в литературе [5] (табл. 2). Гетероспоровые популяции в большей степени (66%) были представлены вторым культурально-морфологическим типом (изоляты *T. koningii* 1, *T. koningii* 183 и их клоны). К четвертому типу были отнесены 25% исследованных нами изолятов (изолят *T. koningii* 406 и его клоны).

Между гетероспоровыми популяциями и моноспоровыми клонами были обнаружены различные реакции вегетативной совместимости: образование мицелиального валика из гиф воздушного мицелия и взаимное проникновение мицелия (индифферентная реакция). Кроме того, были выявлены следующие реакции несовместимости: барраж, бордюр, ограничение роста, а также мелдинг-реакция, которая по своим признакам ближе к реакциям несовместимости (табл. 2). Результаты исследований показали, что если для гетероспоровых изолятов наблюдается смешанный тип вегетативной совместимости, например сочетание реакции несовместимости *бордюр* и реакции совместимости *индифферентной*, то для моноспоровых изолятов характерен определенный тип реакции. В целом у изолятов выявляется тенденция относительного сдвига реакций в сторону вегетативной совместимости.

Сравнительное исследование антагонистической, биофунгицидной активности аборигенных гетероспоровых комплексов *T. koningii* и полученных при расщеплении моноспоровых клонов в отношении патогенного гриба *F. oxysporium* показало, что в их действии наблюдаются значительные различия (табл. 2). Было

установлено, что наибольшей антагонистической активностью обладают моноспоровые изоляты. Особенно четко это различие наблюдалось для гетероспоровой популяции *T. koningii* 406, где для исходного изолята был характерен тип реакции В, когда наблюдается обоюдное подавление роста микроорганизмов при контакте, в то время как для клонов *T. koningii* 406 (1), *T. koningii* 406 (2) – типы реакций Е и Д соответственно (подавление одного организма при контакте, при этом антагонист продолжает расти с неизменной скоростью поверх колонии или обрастает колонию подавляемого организма). Степень колонизации антагонистом *T. koningii* 406 (1) колонии фитопатогенного микромицета на пятые сутки составила 180%, при этом скорость роста антагониста в опыте увеличилась в 2 раза по сравнению с контрольным вариантом.

Выделенные и исследованные изоляты микромицета хорошо росли при оптимальной температуре роста для *T. koningii* – 28 °С. Снижение температуры роста до 15 °С приводило к снижению удельной скорости роста большинства изолятов в интервале от 0.017 до 0.055 мм/ч<sup>-1</sup>. Исключение составляла гетерогенная популяция *T. koningii* 406 и ее клоны. Наиболее высокая удельная скорость роста при данной температуре наблюдалась у моноспорового изолята *T. koningii* 406 (1) – 0.087–0.098 мм/ч<sup>-1</sup>.

### Заключение

Таким образом, среди изученных изолятов были выявлены микроорганизмы, способные к регуляции роста и размножения *F. oxysporium*. Наиболее перспективными изолятами, обладающими биофунгицидными свойствами, являлись представители двух родов бактерий – *Bacillus* и *Pseudomonas*, а также моноспоровый изолят *T. koningii* 406 (1). Данные микроорганизмы по своим свойствам могут стать основой для создания биопрепаратов по защите растений.

### Summary

*H.A. Cabrera Fuentes, R.T. Mukhametshina, R.A. Gabitov, N.G. Zakharova, T.V. Bagaeva, R.P. Ibatullina.* Screening Microorganisms Capable of Suppressing the Growth of Micromycetes Genus Fusarium.

The article studies bacteria and micromycetes strains isolated from distinct ecological niches of Tatarstan, which serve as a basis for biological products aimed at protection of plants against Fusarium. It is revealed that two types of bacteria, *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp., and one strain of *T. koningii* monospore clone 406 (1), have the highest biofungicide activity on pathogenic fungi of the genus Fusarium.

**Key words:** bacteria, micromycetes, genus Fusarium.

### Литература

1. Штерншис М.В., Джалилов Ф.С., Андреева И.В. Биологическая защита растений. – М.: Колос, 2004. – 264 с.
2. Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. Trichoderma species – opportunistic, avirulent plant symbionts // Nature Rev. – 2004. – V. 2. – P. 43–55.
3. Whipps J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // J. Exp. Bot. – 2001. – V. 52, No 9. – P. 487–511.

4. *Алимова Ф.К., Кабрера Ф.Х.А., Тухбатова Р.И., Тазетдинова Д.И.* Взаимоотношения *Trichoderma*, распространенной на территории Республики Татарстан, с микроорганизмами и растениями // Материалы междунар. конф., посв. 75-летию биол. фак. МГУ им. М.В. Ломоносова. – М.: Моск. гос. ун-т, 2006. – С. 12–14.
5. *Дьяков Ю.Т., Сергеев Ю.В.* Новое в систематике и номенклатуре грибов. – М.: Нац. акад. микологии; Медицина для всех, 2003. – 496 с.
6. *Лихачев А.Н., Сидорова И.И., Прохоров В.П., Великанов Л.Л.* Биометод – частный случай изменения структурно-функциональной организации биоценоза // Микро-биол. процессы в почвах и урожайность с.-х. культур (Матер. респ. конф., 6–7 июля, 1978 г.). – Вильнюс, 1978. – С. 202–203.
7. *Дьяков Ю.Т., Долгова А.В.* Вегетативная несовместимость у фитопатогенных грибов. – М.: Моск. гос. ун-т, 1995. – 161 с.
8. *Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др.* Практикум по микробиологии. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
9. *Grondona I., Hermosa R., Tejada M., Gomis M.D., Mateos P.F., Bridge P.D., Monte E. and Garcia-Acha I.* Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V. 63, No 8. – P. 3189–3198.
10. *Weaver M., Vedenyapina E., Kenerley C.M.* Fitness, persistence and responsiveness of a genetically engineered strain of *Trichoderma virens* in soil mesocosms // Appl. Soil Ecol. – 2005. – V. 29, No 2. – P. 125–134.
11. *Сираева З.Ю., Захарова Н.Г., Егоров С.Ю.* Использование бактерий из рода *Bacillus* // Вест. РАСХН. – 2004. – № 5. – С. 71–75.
12. *Алимова Ф.К.* Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. – Казань: Казан. гос. ун-т, 2006. – 210 с.

Поступила в редакцию  
16.03.10

---

**Кабрера Фуентес Эктор Александро** – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

**Мухаметшина Регина Талгатовна** – аспирант кафедры физиологии и биотехнологии растений Казанского (Приволжского) федерального университета.

**Габитов Рустем Амирович** – студент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

**Захарова Наталья Георгиевна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

**Багаева Татьяна Вадимовна** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биотехнологии растений Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [Tatiana.Bagaeva@ksu.ru](mailto:Tatiana.Bagaeva@ksu.ru)

**Ибатуллина Римма Петровна** – директор ООО «Научно-производственный институт “Биопрепараты”», г. Казань.