

0719538-1

На правах рукописи

МЕЛЕНТЬЕВ АЛЕКСАНДР ИВАНОВИЧ

**АЭРОБНЫЕ СПОРООБРАЗУЮЩИЕ БАКТЕРИИ
РОДА *BACILLUS* Cohn. КАК АГЕНТЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО
КОНТРОЛЯ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ**

Специальность: 03.00.07 – микробиология
. 03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Казань – 2000

Работа выполнена в Институте биологии Уфимского научного центра РАН

Научные консультанты:

доктор биологических наук,
профессор Безбородов А.М.

доктор биологических наук
Веселов С.Ю.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор Лешинская И.Б.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

КФУ



0000947853

доктор биологических наук
Чернов В.М.

доктор химических наук
Варламов В.П.

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, Санкт-Петербург.

Защита состоится "7" декабря 2000 г. в "14³⁰" часов на заседании разового Диссертационного Совета ДР 053.29.39. при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина, 420008, г.Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета

Автореферат разослан "7" 11 2000 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,

кандидат биологических наук

 А.Н.Аскарова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Аэробные спорообразующие бактерии рода *Bacillus* Cohn. широко используются в микробиологической и медицинской промышленности как продуценты ферментных препаратов, антибиотиков и пробиотиков. В сельскохозяйственном производстве их применение ограничивалось лишь в качестве основы инсектицидных препаратов. В последнее время, в связи с насущной проблемой перехода к биологическому земледелию, интенсивно разрабатываются методы биологической защиты растений от болезней и соответствующие биопрепараты, призванные минимизировать применение химических пестицидов. Бактерии рода *Bacillus* рассматриваются как перспективные агенты биологического контроля болезней растений в силу их широко распространенного природного антагонизма ко многим фитопатогенным грибам. В последнее десятилетие во многих ведущих агропромышленных странах были созданы и испытаны некоторые препараты на основе бацилл-антагонистов. Однако, зачастую применение таких биопрепаратов оказывалась мало- или абсолютно неэффективным. Причина неудач в этих случаях кроется в недостаточной изученности жизнедеятельности почвенных бацилл при их взаимодействии с растениями и фитопатогенной микрофлорой. Бактерии рода *Bacillus* не относятся к типично ризосферным. Вместе с тем, при искусственной инокуляции посевного материала они способны длительное время развиваться и доминировать в прикорневой зоне растений, выдерживая конкуренцию со стороны аборигенной и фитопатогенной микрофлоры. На способность бактерий приживаться в ризосфере и осуществлять жизнедеятельность оказывают влияние как биогенные факторы так и условия внешней среды. Для успешного практического применения необходимо учитывать видовую специфичность используемого микроорганизма и влияние внешних факторов. Продукты жизнедеятельности бацилл могут оказывать как положительное, так и отрицательное воздействие на растения. Состав, как продуцируемых метаболитов, так и секретируемых ферментов, определяющих взаимоотношения интродуцированных бацилл с растениями и патогенной микрофлорой, исследован крайне недостаточно. В частности, до сих пор отсутствуют какие либо сведения о способности бактерий рода *Bacillus* синтезировать вещества фитогормональной природы. Недостаточно исследованы воздействия антибиотических веществ, продуцируемых бациллами различной видовой принадлежности, на фитопатогенные грибы. Не установлена роль миколитических ферментов в проявлении антагонизма бацилл к мицелиальным грибам. Решение этих проблем позволит ускорить внедрение в практику биологических методов защиты растений от болезней и создание высокоэффективных биопрепаратов на основе бацилл-антагонистов.

Цель и задачи исследований. Настоящая работа посвящена детальному изучению процессов взаимодействия с растениями и микрофлорой

интродуцированных бацилл в ризосфере, влиянию внешних условий на процессы приживаемости и жизнедеятельности, исследованию природы ростстимулирующих веществ, продуцируемых отдельными штаммами рода *Bacillus* и исследованию роли экстрацеллюлярных миколитических ферментов бацилл в проявлении их антагонизма к микромицетам. В соответствии с этим были определены следующие задачи:

- выделить из почвенных образцов, описать и идентифицировать изоляты бацилл-антагонистов, определить спектр и особенности антигрибного действия;
- изучить особенности колонизации зерновки и корешков прорастающих семян пшеницы бациллами-антагонистами и их влияния на ультраструктуру растительных клеток;
- исследовать динамику и распространение интродуцированных бацилл в ризосфере пшеницы в лабораторных и полевых условиях;
- исследовать влияние интродукции бацилл-антагонистов на микробиологические процессы в прикорневой зоне растений пшеницы;
- оценить полевую эффективность применения бацилл-антагонистов в подавлении развития грибных болезней злаков и влияние на продукционные процессы растений;
- изучить влияние интродукции бацилл на фитогормональный статус растений пшеницы и оценить способность природных изолятов к продукции рострегулирующих веществ;
- разработать методику выделения микробных цитокининов и установить их химическую природу;
- исследовать состав комплекса бациллярных миколитических ферментов и изучить влияние условий на их продукцию;
- выделить, очистить и охарактеризовать хитиназу *Bacillus sp. 739* и выяснить роль этого фермента в проявлении антагонизма к грибам;
- разработать и произвести в промышленных условиях бактериальный препарат "Бациспектин БМ" для расширенных производственных испытаний.

Научная новизна работы. Впервые проведено комплексное исследование влияния интродуцируемых в ризосферу растений бацилл-антагонистов на ультраструктуру клеток и продукционные процессы растений, на реакцию фитопатогенных грибов и развитие аборигенной микрофлоры в прикорневой зоне. Установлено, что при предпосевной инокуляции клетки развивающихся бактерий проникают в колеоризу и выступают как слабые патогены. Антагонистическое действие бацилл в отношении микромицетов проявляется в нарушении процесса прорастания грибных спор и строения скелета формирующегося мицелия, образованием сферопластов на кончиках и последующим их лизисом. Показано, что колонизация поверхности формирующихся корней проростков пшеницы

С. И. БУТКО
И. Н. И. ЛЕБОВЕЦКИЙ
ИЗДАТЕЛЬСТВО ГОС. УНИВЕРСИТЕТА

бациллами происходит путем образования микроколоний, прикрепленных к эпидермальному слою материалом, подобным гликокаликсу. Характер заселения ризосферы растений зависит от видовой принадлежности бацилл и факторов внешней среды и, в первую очередь, от температурного режима почвы. Развитие внедренных в ризосферу бацилл не оказывает угнетающего воздействия на основные агрономически значимые группы аборигенной микрофлоры, одновременно с этим увеличивает фунгистатический потенциал прикорневой зоны почвы. Эффективное подавление корневых гнилей растений происходит на ранних этапах развития, для злаков, - до стадии начала цветения.

Впервые обнаружена способность бактерий рода *Bacillus* воздействовать на фитогормональный статус растений и продуцировать регуляторные гормоны цитокининовой группы. Выделена и охарактеризована новая форма цитокининов, представляющая собой комплекс зеатинрибозида с полисахаридами.

Исследован миколитический комплекс ферментов культуры *Bacillus sp. 739*, включающий β -1,3-глюканазу, хитиназу и хитозаназу. Подтверждена белковая множественность форм хитиназ, синтезируемых представителями рода *Bacillus* и установлено, что по механизму действия фермент является экзо-хитиназой. Впервые для бацилл проведено подробное исследование роли хитиназы в проявлении антигрибной активности к некоторым фитопатогенным грибам. Показано отсутствие взаимосвязи между литической активностью очищенной хитиназы *Bacillus sp. 739* и ее способностью ингибировать ростовые процессы у фитопатогенных грибов.

Практическая значимость. Установлены закономерности развития интродуцированных бацилл в ризосфере растений. Выявлен механизм антагонистического действия бацилл в отношении микромицетов и положительное влияние бактеризации растений отобранными штаммами на продукционные процессы и снижение заболеваемости.

Предложен штамм *Bacillus sp. 739* в качестве основы биопрепарата "Бациспектин БМ" и продуцента хитиназы. Заявлен штамм *B. subtilis* ИБ-22 - продуцент цитокининов.

Апробация результатов. Основные результаты исследований были представлены на II Симпозиуме стран членов СЭВ по микробным пестицидам (Протвино, 1990), Всесоюзной конференции "Микробиология в сельском хозяйстве" (Кишинев, 1991), Всесоюзной конференции "Достижения биотехнологии - агропромышленному комплексу" (Черновцы, 1991), Всесоюзном симпозиуме "Микробиология охраны биосферы в регионах Урала и Северного Прикаспия" (Оренбург, 1991), конференции "Биология почв антропогенных ландшафтов" (Днепропетровск, 1991), IV Всесоюзной конференции "Микроорганизмы в сельском хозяйстве" (Пушино, 1992), II-й конференции "Регуляторы роста и развития растений" (Москва, 1993), конференции "Интродукция микроорганизмов в окружающую среду" (Москва, 1994), Всероссийском съезде по защите растений "Защита растений в условиях реформирования агропромышленного ком-

плекса: экономика, эффективность, экологичность" (Санкт-Петербург, 1995), Международной конференции "Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, экологические проблемы" (Пермь, 1996), 5-ом международном симпозиуме "Root Demographics and Their Efficiencies in Sustainable Agriculture, Grasslands and Forest Ecosystems" (Клемсон, ЮК, США, 1996), Втором съезде биохимического общества РАН (Москва, 1997), Международной школе "Проблемы теоретической биофизики" (Москва, 1998), Международной конференции "Молекулярная генетика и биотехнология" (Минск, 1998), III съезде Докучаевского общества почвоведов (Суздаль, 2000).

Публикации. Основные результаты исследований изложены в 37 научных публикациях, включая 3 патента и авторских свидетельства.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (7 глав), заключения, выводов, списка цитируемой литературы, приложений. Работа изложена на 287 страницах, содержит 48 рисунков и 56 таблиц. Список литературы включает 559 наименований, в т.ч. 367 иностранных публикаций

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Бактерии. Основным объектом исследований служили аэробные спорообразующие бактерии рода *Bacillus* Cohn., выделенные из образцов почв отобранных на территории Республики Башкортостан, а также культуры, полученные из Всесоюзной коллекции микроорганизмов. Идентификацию изолятов бацилл производили согласно руководству (Bergey's manual).

Мицелиальные грибы. В качестве тест-объектов использовали следующие культуры фитопатогенных грибов: - возбудители корневых гнилей *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Choem., *Fusarium* Lk:Fr. из коллекций ВКМ, ВИЗР и местные изоляты; - возбудители ржавчинных болезней *Puccinia striiformis* West, *P. graminis* Pers, *P. recondita* Rob. Ex Desm. и мучнистой росы *Erysiphe graminis* DC из коллекции СКНИИФ г.Краснодар; - возбудитель серой гнили *Botrytis cinerea* Pers. - из коллекции ВИЗР; - местный изолят возбудителя твердой головни *Tilletia caries* (DC.) Tul.; - возбудитель альтернариоза злаков *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. из коллекции ВКМ.

Растительными объектами в вегетационных и полевых опытах служили: яровая пшеница сортов Саратовская 55, Безенчукская 139 и Жница; озимая пшеница сорта Безостая 1. В полевых опытах растения выращивали по принятой для зоны агротехнике, в лабораторных условиях - на светоплощадке с 16-часовым периодом освещения.

Микроскопические исследования проводили с помощью светового микроскопа CarlZeiss, Jena, и электронного - Hitachi H-600 со сканирующей системой H-6010. Работы по электронной микроскопии выполнены во ВНИИ фитопатологии РАСХН совместно с Ю.М.Морозовым.

Исследование численности популяций интродуцированных бактерий-антагонистов проводили с использованием клонов спонтанных мутантов, устойчивых к стрептомицину и рифампицину. Учет численности отдельных групп почвенных бактерий и мицелиальных грибов проводили общепринятыми методами (Мишустин, 1956, Егоров, 1976, Звягинцев, 1991). Фунгистатический потенциал почвы определяли по степени прорастания спор *B. sorokiniana* в мембранных камерах (Берестецкий, 1973). Несимбиотическую актуальную и потенциальную азотфиксацию и дыхание почвы определяли газохроматографическими методами (Садыков, Каспранский, 1987).

Определение фитогормонов. Содержание абсцизовой кислоты и ауклинов в надземной части растений пшеницы определяли после экстракции 80% этанолом, согласно Веселову (Veselov et al, 1992). Содержание цитокининов определяли в водном остатке методом твердофазного иммуноферментного анализа (Кудоярова и др., 1990). Антитела к индивидуальным цитокининам были любезно предоставлены С.Ю.Веселовым. Тонкослойную хроматографию цитокининов проводили на силикагелевых пластинах "Merk" в системе бутанол: аммиак: вода (6 : 1 : 2). Разделенный материал элюировали 0,1М фосфатным буфером pH 7,4 и подвергали иммуноанализу. Иммуноаффинную очистку проводили на колонке с привитыми иммуноглобулинами к зеатинрибозиду, последовательной промывкой 0,01М фосфатным буфером, 0,5М NaCl, водой и элюцией 70%-ным этанолом. Разделение свободных и связанных цитокининов осуществляли путем гель-фильтрации на колонках с сефадексом G-25 и G-200 фосфатным буфером. Биотестирование содержания цитокининов осуществляли согласно (Biddington & Thomas, 1973). Высокоэффективную жидкостную хроматографию в сочетании с масс-спектрометрией проводили на колонке Superphase Rp Select BC18 ("Merck") элюцией системой метанол : 0,1М ацетат аммония (35:65; об/об), скорость 0,8 мл/ мин. в режиме сканирования или мониторинга селективного иона на масс-спектрометре (220- селективный диагностический ион для зеатина; 225- для дейтерированных стандартов зеатина и его производных).

Исследование ферментов миколитического комплекса. Хитиназную активность измеряли по образованию редуцирующих сахаров в реакционной смеси, включавшей 1 мл раствора фермента в фосфатно-цитратном буфере (50 мМ, pH 5.0) и 0.5 мл 1%-ной суспензии коллоидного хитина. Смесь инкубировали в течение часа при 55°C. Концентрацию редуцирующих сахаров оценивали спектрофотометрически с феррицианидным реагентом (Синицин и др., 1993). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкМ N-ацетил-D-глюкозамина в мл в минуту при описанных условиях. Хитозаназную активность измеряли тем же методом, используя в качестве субстрата 1%-ную суспензию коллоидного хитозана. За единицу активности хитозаназы принимали количество фермента, образующее 1 мкМ D-глюкозамина на мл в минуту при описанных условиях. Ламиarinaзную (β -1,3-

глюканазную) активность определяли аналогично, используя в качестве субстрата ламинарин. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкМ D-глюкозы на мл в мин при описанных условиях.

Реактивы. В работе использовали отечественные реактивы марки х.ч. и ч.д.а., сорбенты фирм “Pharmacia” и “Bio-Rad”, хромогенные реактивы - пара-нитрофенильные производные N-ацетил-D-глюкозамина, N,N'-диацетил-β-D-хитобиозы и N,N',N''-триацетил-β-D-хитотриозы (“Sigma”), стандарты фитогормонов (“Sigma”), препараты альбуминов (Serva).

Статистическую обработку результатов выполняли по стандартным компьютерным программам. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента на 5% уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Скрининг природных бактерий рода *BACILLUS* Cohn - антагонистов фитопатогенов и спектр их антигрибной активности

Наибольшую сложность в разработке микробиологических средств защиты растений представляет поиск активной культуры антагониста – биологической основы создаваемого препарата. Безусловно, что для обеспечения экологической безопасности разрабатываемых препаратов им может быть только природный, генетически не трансформированный штамм. По этой причине вопросу скрининга должно уделяться первостепенное значение. Первичный отбор изолятов бацилл проводили из почвенных образцов, отобранных на территории Республики Башкортостан. Отобранные изоляты были подвергнуты тесту на способность ингибировать развитие грибов рода *Fusarium*, входящих в состав фитопатогенного комплекса грибов – возбудителей корневых гнилей и других. болезней растений. Полученные результаты (табл. 1.) свидетельствовали о том, что действие бацилл избирательно и специфически проявляется по отношению к определенным видам грибов. Не обнаружено изолята, который подавлял бы одновременно развитие всех 11 испытанных видов. Наибольшее число изолятов проявило антагонизм к *F.avenaceum*, *F.sambucinum*, *F.gibbosum* и *F.semitectum*. Меньше всего антагонистов обнаружено к *F.culmorum*, *F.graminearum*, *F.sporotrichiella*. Последние три вида подавлялись только изолятами, обладающими достаточно широким спектром действия. Такое разнообразие действия бацилл-антагонистов указывает на принципиальную возможность выделения таких культур, которые, подавляя развитие фитопатогенных почвенных грибов, не оказывали бы отрицательного воздействия на полезную для растений микрофлору.

Обнаруженное разнообразие действия изолятов бацилл-антагонистов вероятно связано с их таксономической принадлежностью. В связи с этим нами была проведена их идентификация. Большая часть изолятов принадлежала к видам *B.subtilis* (73,8%) и *B.polymyxa* (21,5 %). Остальные, по со-

вокупности признаков, представляли собой виды с неопределенным таксономическим положением.

Таблица 1.

Характеристика изолятов бацилл по их действию на виды рода *Fusarium*

Шифр изолята	Тест организм										
	<i>F.avena- ceum</i>	<i>F.culmorum</i>	<i>F.gibbosum</i>	<i>F.gramine- arum</i>	<i>F.monili- forme</i>	<i>F.nivale</i>	<i>F.oxyspo- rum</i>	<i>F.sambu- cinum</i>	<i>F.semitec- tum</i>	<i>F.solani</i>	<i>F.sporot- richiella</i>
EM-1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-13	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
813	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
EM-3	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
EM-11	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-17	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
262	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
815	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
EM-8	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
EM-15	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
828/2	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
834	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
EM-14	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
739/1	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
EM-21	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
780	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
851	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
822/3	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
807	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
815/3	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
832/3	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
669	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
222	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
283	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
805	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
EM-22	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
250	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
EM-9	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
EM-10	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6/2	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
EM-4	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
822	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
817	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
EM-8	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EM-16	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: (+) - подавляют развитие гриба; (-) - не оказывают влияние на развитие гриба.

Антагонизм бацилл в отношении микроскопических грибов связывают в основном с действием ферментов, лизирующих клеточные стенки грибов, и антибиотических веществ. Мы изучали характер действия метаболитов, выделяемых в среду бактериями-антагонистами двух доминирующих видов: *B. subtilis* и *B. polymyxa* на процесс прорастания спор и развитие мицелия грибов, возбудителей обыкновенной корневой гнили злаков. Для изучения воздействия нелетальных доз метаболитов бацилл на процесс прорастания конидий и морфогенез изучаемых грибов мы создавали в агаре зоны с радиальным градиентом концентраций. Бациллы выращивали сплошным газоном на поверхности капроновой мембраны (размер пор 0,2 мкм), помещенной на питательный агар. После трех суток инкубации при 32°C мембрану с биомассой бацилл удаляли, вырезали агаровые блоки и помещали на свежий питательный агар, предварительно засеянный конидиями тестируемых грибов. Наблюдение за процессом прорастания грибных пропагул и конидий вели с помощью светового микроскопа, просматривая по 50-60 спор в каждом образце. Через 22 ч экспозиции четко проявился эффект градиента концентраций. В середине пятна антибиотиков *B. subtilis* (место наложения блока) прорастания спор всех испытываемых грибов не происходило, а ближе к периферии из проросших спор формировался мицелий с морфологическими уродствами, проявившимися в образовании сферопластов на кончиках ростовых трубок (рис.1Б) и растущих гиф (рис.2Б). Вне зоны диффузии антибиотика мицелий был хорошо развит и имел типичный для конкретной культуры вид (рис.1А,2А). По другому проявилось действие антибиотических веществ *B. polymyxa*. Образования сферопластов в зоне метаболитов этого штамма нами не выявлено, но обнаружено нарушение морфогенеза грибов, проявившееся в резком увеличении степени ветвления мицелия как у *B. sorokiniana* (рис.1В), так и у исследованных представителей рода *Fusarium* (рис.2В).

Таким образом, воздействие метаболитов бактерий группы *B. subtilis* на фитопатогенные мицелиальные грибы характеризуется образованием сферопластов на кончиках растущих гиф, а группы *B. polymyxa* - нарушением строения скелета формирующегося мицелия. Описанные отличия обусловлены, вероятнее всего, природой и механизмом физиологического действия продуцируемых представителями этих групп антибиотических веществ.

2. Приживаемость и распространение интродуцированных штаммов в корневой системе проростков яровой пшеницы

Бактерии-антагонисты рода *Bacillus*, в целом, считаются перспективными для создания на их основе биопрепаратов и внедрения их в практику растениеводства. Однако, для их эффективного использования необходимо получить сведения о способности бацилл-антагонистов приживаться в ризосфере, колонизировать поверхность корня, взаимодействовать с тканями и клетками прорастающего семени.

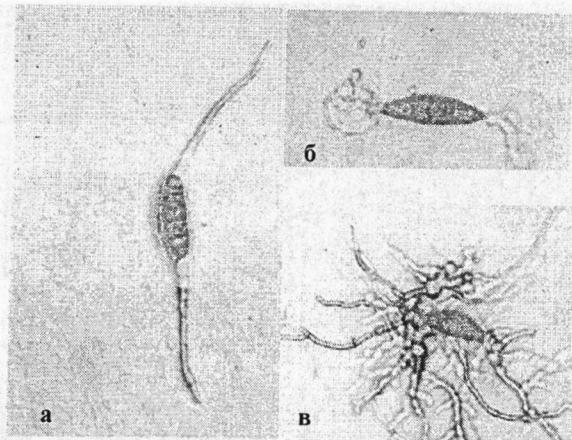


Рис.1. Прорастание конидий *B.sorokiniana*: а - контроль; б - метаболиты *B.subtilis*; в - метаболиты *B.polymyxa*.

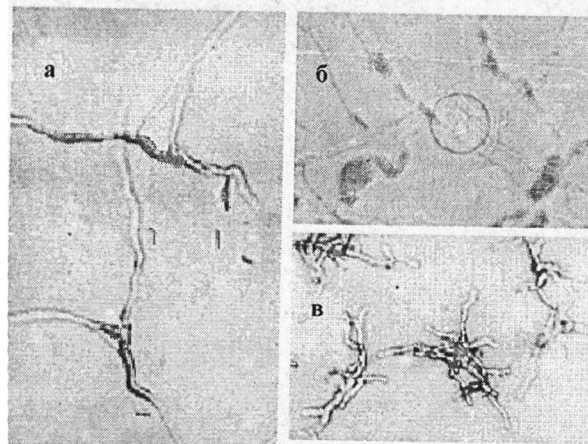


Рис.2. Формирование мицелия *F.avenaceum*: а - контроль; б - в присутствии метаболитов *B.subtilis*; в - в присутствии метаболитов *B.polymyxa*

2.1. Электронно-микроскопическое исследование взаимодействия бацилл-антагонистов с поверхностными структурами и тканями семени пшеницы

Целью данного этапа работы было изучение особенностей заселения семени и формирующихся корней проростков при бактеризации семян и исследование анатомических и ультраструктурных изменений клеток прорастающего семени. Для этой цели из нашей коллекции бацилл-антагонистов были выбраны культуры различной видовой принадлежности, а именно *Bacillus sp.739*, *B.subtilis* ИБ-15 и *B.polymyxa* ИБ-37. Исходная плотность инокулята в этих исследованиях составила: *B.subtilis* ИБ-15 - $2,6 \cdot 10^6$, *B.polymyxa* ИБ-37 - $8,9 \cdot 10^4$, *Bacillus sp.739* - $4,3 \cdot 10^6$ КОЕ/зерно. Зерновки, обработанные культурами *B.subtilis* ИБ-15 и *B.polymyxa* ИБ-37, прорастали без видимых отличий от контрольных. Длина корней через 3 суток после помещения во влажную камеру составляла 3 – 4 см. В то же время, зерновки, обработанные бактериями *Bacillus sp.739*, формировали корни заметно меньшей длины (1 – 2 см).

На поверхности прорастающих зёрен и у основания формирующихся корней при сканирующей электронной микроскопии обнаружались скопления глобулярных образований разных размеров: от 1 до 40 мкм в диаметре (рис. 3.). С помощью просвечивающей электронной микроскопии было установлено, что эти глобулярные образования представляют собой микроколонии бактерий или единичные бактерии, окруженные чехлами. Материал чехлов на срезах выглядел слоистым, располагался концентрически вокруг бактериальных клеток и микроколоний (рис. 4а).

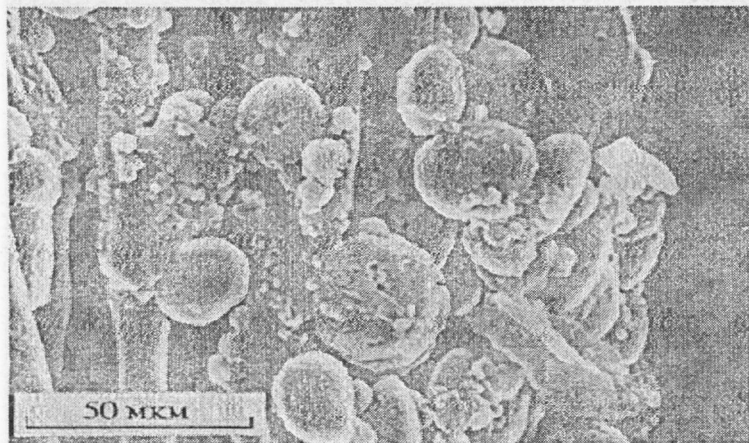


Рис.3. Микроколонии *B.subtilis* ИБ-15 на поверхности coleоризы и
корня пшеницы. Сканирующая электронная микроскопия.

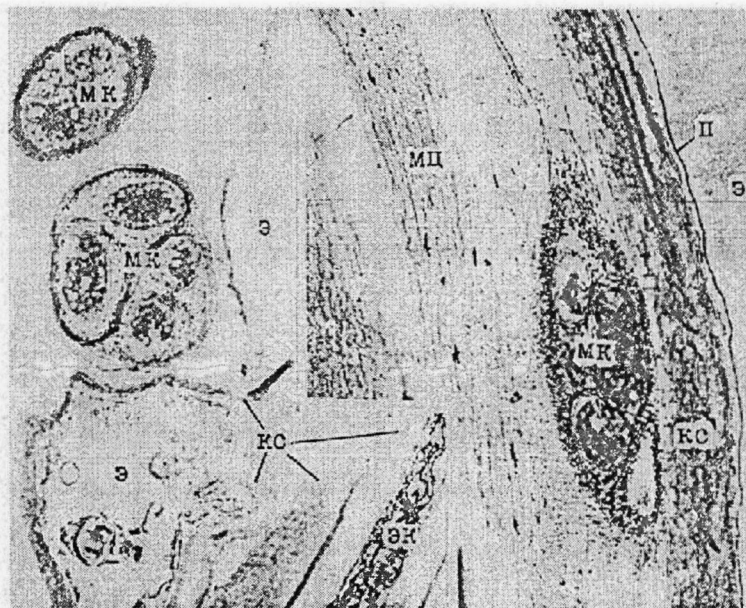


Рис.4. Микроколонии *B.subtilis* ИБ-15 на поверхности корней пшеницы. Просвечивающая электронная микроскопия. а - микроколонии бактерий и некротизированные клетки эпидермы и экзодермы корня, б - микроколонии бактерий и скопление муцилажа на поверхности корня. Кс - клеточная стенка, мк - микроколония бактерий, мц - муцилаж, п - плазмалемма, э - клетки эпидермы, эк - клетка экзодермы.

По морфологическим признакам материал чехлов был схож с бактериальным гликокаликсом - отложением полисахаридов и гликопротеинов снаружи клеточной стенки (Costerton et al., 1981). Известно, что бактериальные чехлы играют существенную роль в адгезии дочерних клеток, в прикреплении микроколоний к субстрату, в защите бактерий от неблагоприятных факторов (Costerton et al., 1981; Foster et al., 1983).

Исследование срезов прорастающих семян пшеницы под световым и электронным микроскопом показало, что развивающиеся бактерии присутствовали в колеоризе, в утолщенной части семенной кожуры и в некоторых клетках щитка. Мы не обнаружили бактерий в крахмалистом эндосперме и в клетках алейронового слоя. Бактерии заселяли и лизировали клетки зародыша, поскольку фронт распространения некроза наблюдался впереди распространяющихся бактерий. В контрольных образцах некроза клеток или патологических изменений ультраструктуры мы не наблюдали.

Бактерии, развивающиеся в колеоризе и в пространстве между колеоризой и корнем, находились, вместе с тем, в непосредственной близости

от щитка и, очевидно, могли отрицательно сказываться на его функциях. На это указывает обнаруженный нами в некоторых образцах некроз части клеток вблизи узла щитка (рис.5).

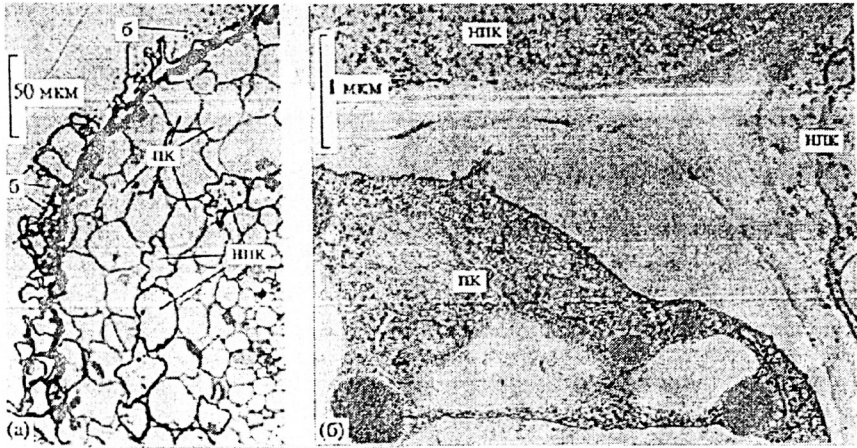


Рис. 5. Некроз клеток первичной коры корня при воздействии бактерий *Bacillus sp.739*. б - бактерии, нпк - некротизированная клетка первичной коры, пк - живая клетка первичной коры.

Клетки в центральной части узла щитка и удаленные от бактерий слои клеток щитка оставались живыми, но их ультраструктура претерпевала ряд патологических изменений: в центральных вакуолях и вновь образующихся вакуолях с разветвленной поверхностью накапливались электроплотные отложения, строма митохондрий просветлялась, в пластидах исчезали крахмальные зерна и формировались крупные пластоглобулы и перефирический ретикулум.

При прорастании семян, обработанных бациллами, утолщенная часть семенной кожуры активно заселялась бактериями (рис.6а). При этом происходил почти полный лизис клеточных стенок (рис.6б). Бактерии, развивающиеся в семенной кожуре, обычно были свободны от чехлов или чехлы имели измененную структуру (рис.6б, 6в).

На основании выше изложенного можно предположить, что причиной ослабления роста корней в случае применения культуры *Bacillus sp.739* могли являться патологические изменения клеток щитка, вызывающие нарушение транспорта питательных веществ от эндосперма к зародышу. Вопрос, насколько часто подобные явления могут наблюдаться при бактеризации семян бациллами-антагонистами, должен явиться предметом дальнейших исследований.

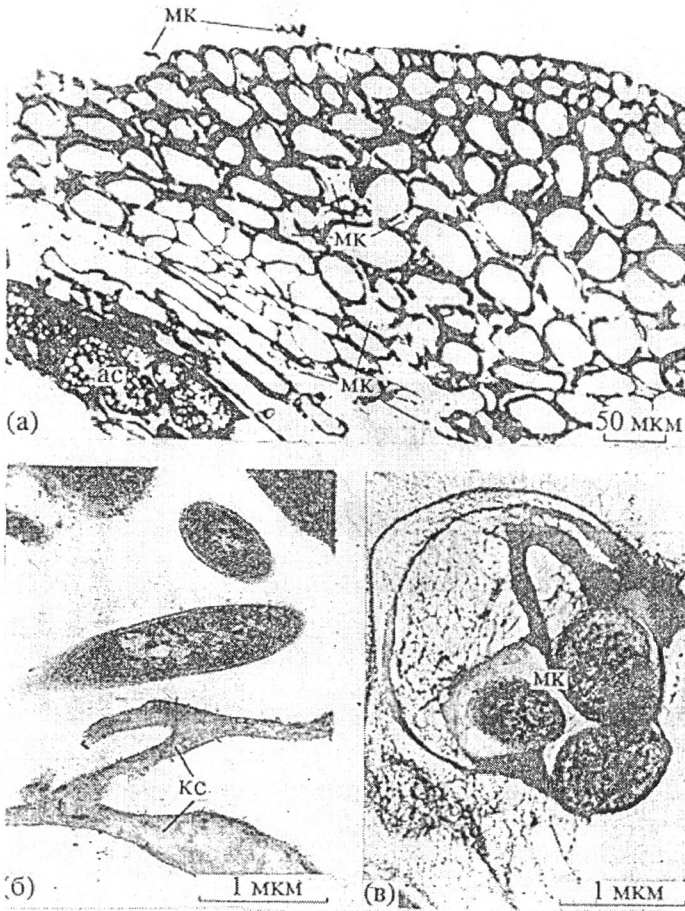


Рис. 6. Утолщенная часть семенной кожуры и заселяющие ее бактерии *B. polytuxa* ИБ-37 (а), бактерии и полуразрушенные клеточные стенки семенной кожуры (б), микроколония бактерий с измененным чехлом (в). ас - клетки алейронового слоя, кс - клеточная стенка, МК - микроколония бактерий.

Таким образом, исследованные нами бактерии *B. subtilis* ИБ-15, *B. polytuxa* ИБ-37 и *Bacillus sp.* 739 при взаимодействии с прорастающими семенами и образующимися корнями пшеницы в стерильных условиях выступали как слабые патогены. Очевидно, ущерб, причиняемый бактериями проросткам в этих условиях невелик, из-за отсутствия системного заселения тканей, а также заселения эндосперма и алейронового слоя.

2.2. Динамика численности и распространение бацилл-антагонистов в корневой системе проростков пшеницы

Очень важную информацию могут дать сведения о способности бацилл-антагонистов к распространению вдоль корней растущего растения. В настоящее время этот вопрос остается мало изученным, и одной из задач настоящей работы было сравнительное изучение динамики распространения бацилл-антагонистов по корневой системе пшеницы при их интродукции путем бактеризации семян. Для детального исследования были взяты бактерии различной видовой принадлежности: *B. subtilis* ИБ-15, *B. polymyxa* ИБ-37 и *Bacillus sp.739*, маркированные по устойчивости к антибиотикам.

Распределение исследуемых штаммов бацилл-антагонистов по отдельным фрагментам корневой системы 30 суточных проростков пшеницы в условиях вегетационного опыта представлено на рисунке 7.



Рис.7. Численность бацилл по длине корня пшеницы. Фрагмент основания корня I; средняя часть корня II; апикальный фрагмент III. $p=0,95$.

Как следует из представленных данных, бактерии *B. subtilis* ИБ-15 и *B. polymyxa* ИБ-37 распространялись по всей длине корня растений, но плотность популяций интродуцированных бактерий в основании корня была примерно в 5 раз выше, чем на апикальном фрагменте. Анализ физиологического состояния показал, что клетки *B. subtilis* ИБ-15 по всей длине корня находились в споровом состоянии, тогда как клетки *B. polymyxa* ИБ-37 на апикальном фрагменте присутствовали лишь в вегетативной форме. В отличие от этих двух культур, *Bacillus sp.739* обнаруживался только на более старых по возрасту частях корня проростков и не высевался с апикальных фрагментов.

Полученные данные подтверждают в целом наблюдения других авторов, что численность микрофлоры ризопланы экспоненциально снижается от основания корня к его кончику (van Vurde, Schippers, 1980; Olsson et al., 1987). Активно растущие части корня, как правило, почти свободны от микроорганизмов. Вместе с тем, характер распространения интродуци-

рованных клеток бацилл-антагонистов вдоль корней оказался штаммоспецифичным. Очевидно, что клетки *Bacillus sp.*739 менее подвижны и, скорее всего, пассивно переносятся вдоль развивающихся корней.

Эффективность действия бактерий-антагонистов при интродукции зависит и от их способности колонизировать ризосферу растений в меняющихся температурно-влажностных условиях, и способности преодолевать конкурентное давление со стороны аборигенной микрофлоры почвы. В серии экспериментов мы исследовали влияние этих факторов на динамику заселения корневой системы.

Изучение динамики численности бацилл в ризосфере пшеницы в условиях инфицированной почвы проводили в лабораторных вегетационных опытах. Для создания инфекционного фона использовали гриб *B.sorokiniana*, преобладающий в патогенном комплексе возбудителей корневых гнилей. Для более четкого выявления различий был создан заведомо высокий инфекционный фон - $3,3 \cdot 10^3$ пропагул на 1 г почвы.



Рис.8. Динамика численности штаммов бацилл в ризосфере пшеницы в почвах с *B.sorokiniana* и свободных от патогена.

Динамика численности популяции интродуцированных бацилл-антагонистов в присутствии фитопатогена носит индивидуальный характер (рис.8). Так для штамма *B.subtilis* ИБ-15 численность клеток в ризосфере растений, выращиваемых в инфицированной почве, оказалась на два порядка ниже, чем в ризосфере контрольных растений ($1,2-2,6 \cdot 10^5$ против $1,4-2,9 \cdot 10^7$ КОЕ/г). Численность *B.polymyxa* ИБ-37 в ризосфере пшеницы в варианте с патогеном, наоборот, достоверно выше, чем в варианте с неинфицированной почвой. Наличие инфекционного начала в почве не сказалось на колонизирующей активности антагониста *Bacillus sp.*739.

При изучении влияния температуры были заданы температурные режимы почвы, характеризующиеся для пшеницы как низкий, оптимальный и высокий на фоне полной влагообеспеченности.

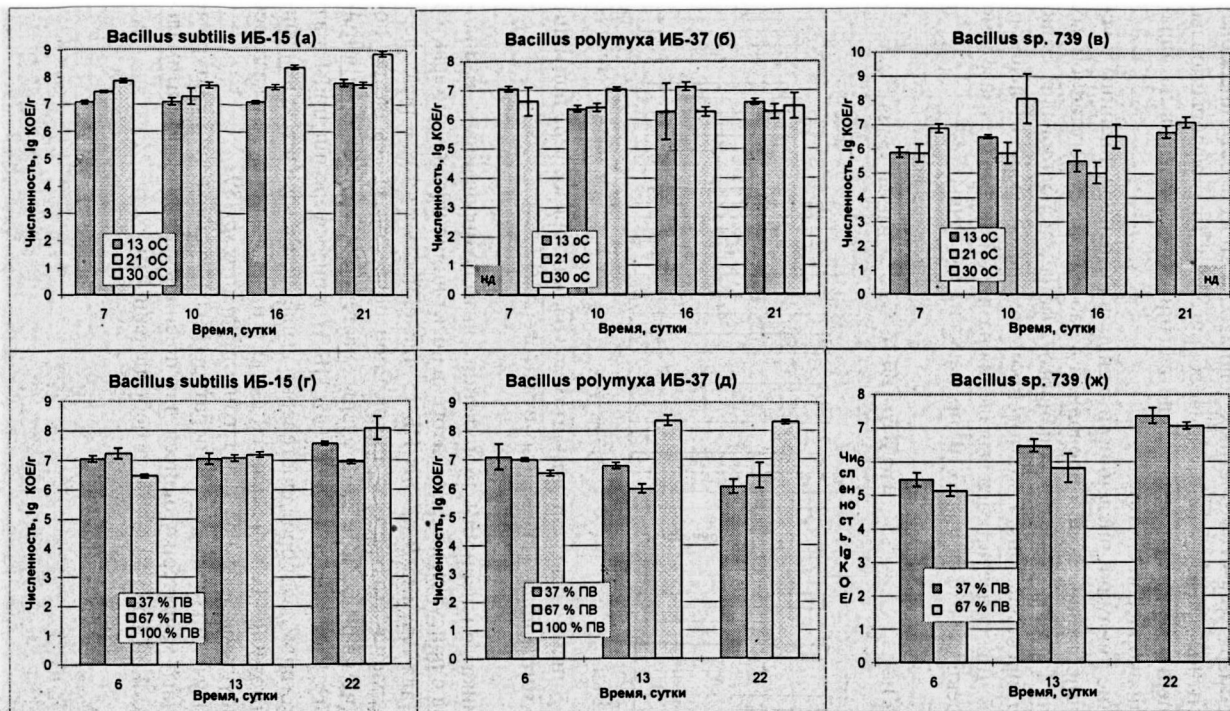


Рис.9 Динамика численности исследуемых штаммов бацилл в ризосфере пшеницы при различных температурных (а, б, в) и влажностных (г, д, ж) режимах выращивания растений. Примечание: нд - нет данных.

Анализ численности популяций интродуцированных бацилл показал, что для *B.subtilis* ИБ-15 существует прямая зависимость плотности популяции от температуры почвы (рис.9а). Анализ плотности клеток *B.polymyxa* ИБ-37 в ризосфере пшеницы, выращиваемой при различных температурных режимах, не выявил достоверных различий между вариантами (рис.9б). Очевидно, численность этого штамма в ризосфере предопределена его физиологическими особенностями и влияние температуры, в исследованном диапазоне, минимально. Существенных различий в численности *Bacillus sp.*739 в ризосфере растений пшеницы, выращиваемой в почве с температурой 13°C или 21°C, мы не обнаружили. Однако, при повышении температуры почвы до 29,5°C численность клеток *Bacillus sp.*739 достоверно увеличивалась, как минимум, на порядок. Таким образом, с повышением температуры численность интродуцированных бацилл-антагонистов в ризосфере возрастает, однако реакция на изменение температуры зависит от видовой принадлежности штамма.

При исследовании влияния влажности почвы на динамику численности бацилл-антагонистов в ризосфере пшеницы были смоделированы режимы недостаточного влагообеспечения растений (37% ПВ), нормального (67% ПВ) и переувлажнения (100% ПВ). Анализ плотности популяции *B.subtilis* ИБ-15 (рис.9г) показал, что как при недостаточном влагообеспечении, так и при нормальном, численность этого штамма в ризосфере пшеницы поддерживалась на очень высоком уровне - порядка 10^7 КОЕ/г и практически не изменялась на протяжении всего эксперимента. При переувлажнении почвы наблюдалось непрерывное, на протяжении всего эксперимента, увеличение численности клеток, вероятно потому, что в этих условиях развитие популяции не лимитировалось корневыми эксудатами, а осуществлялось за счет потребления органики из почвенного раствора. То же и для культуры *B.polymyxa* ИБ-37. Нами не было обнаружено существенных отличий в динамике и уровне численности популяции при недостаточном и благоприятном влагообеспечении почвы (рис.9д). Аналогичная картина наблюдалась и с культурой *Bacillus sp.*739 (рис.9ж), но в этом случае при недостатке почвенной влаги численность культуры, как правило, была даже несколько выше, чем при оптимальном увлажнении.

Таким образом, исследованные штаммы бацилл оказались способными колонизировать ризосферу пшеницы не только при оптимальном, но и при недостаточном влагообеспечении почвы.

3. Влияние интродукции бацилл-антагонистов в ризосферу пшеницы на микробиологические процессы в прикорневой зоне

Интродукция микроорганизмов-антагонистов в корневую систему растений, оказывает существенное влияние на микрофлору прикорневой зоны (Bagnoli, Filippi, 1985; Vransy et al., 1990). Привнесение в ризосферу несвойственной микрофлоры может отрицательно отразиться на развитии микробиологических процессов в прикорневой зоне и, в конечном счете,

на продуктивности сельскохозяйственных растений. Поэтому при разработке микробиологических препаратов, предназначенных для предпосевной обработки семян необходимо учитывать их влияние на биологическую активность ризосферной микрофлоры. С этой целью нами были проведены серии лабораторных и микроделяночных полевых экспериментов, в которых изучалось влияние бактеризации семян пшеницы бациллами-антагонистами как на биологическую активность ризосферной микрофлоры в целом, так и на отдельные группы почвообитающих микроорганизмов.

В мелкоделяночных полевых опытах на выщелоченном черноземе были проведены исследования состава микрофлоры и ее биологической активности в прикорневой зоне яровой пшеницы, обработанной исследуемыми бактериями. Семена высевали на делянки, предварительно инфицированные внесением в почву смеси местных изолятов фитопатогенных грибов: *B. sorokiniana*, *F. gibbosum*, *F. oxysporum*.

Как следует из полученных данных, наибольшие отличия по численности ризосферной микрофлоры между вариантами опытов наблюдаются в период интенсивного развития растений пшеницы, а именно в фазу кущения (рис.10). Результаты определения интенсивности дыхания и нитрогеназной активности почвы прикорневой зоны, в этот период, представлены в табл.2.

Таблица 2.
Интенсивность дыхания почвы и потенциальной фиксации азота в ризосфере яровой пшеницы

Вариант, доза (кг/т)	Интенсивность выделения CO ₂ , мг/кг ч		Нитрогеназная активность, мг N ₂ /кг ч
	без глюкозы	с глюкозой	
Контроль	6,4	101	794
ТМТД, 1,5	7,0	107	974
<i>Bacillus sp.739</i> , 5,0	5,2	100	1059
<i>Bacillus sp.739</i> , 10,0	8,9	107	889
<i>B.subtilis</i> , 5,0	5,6	105	742
<i>B.subtilis</i> , 10,0	5,4	114	884
<i>B.polymyxa</i> , 5,0	5,7	102	1121
<i>B.polymyxa</i> , 10,0	6,8	127	1390

Интенсивность актуального (без внесения глюкозы) и потенциально (с внесением глюкозы) выделения CO₂ из почвы ризосферы возрастала в вариантах с обработкой семян штаммами *B.polymyxa* ИБ-37 и *Bacillus sp.739* в максимальных дозах. Высокий уровень нитрогеназной активности отмечен в вариантах с обработкой семян этими же культурами. Возможно, это связано с физиологическими особенностями использованных штаммов, поскольку азотфиксирующая активность описана для видов *B.polymyxa* (Смирнов и др., 1982), а для *Bacillus sp.739* была определена нами экспериментально.

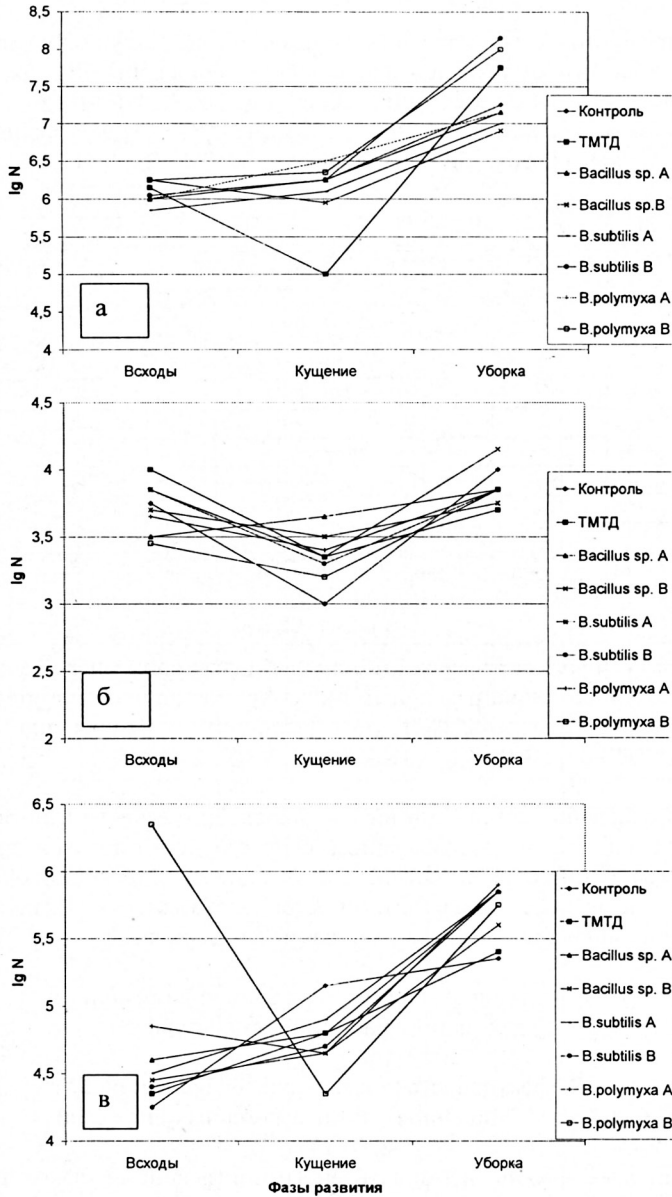


Рис.10. Численность гетеротрофных микроорганизмов (а), микроскопических грибов (б) и спорообразующих бактерий (в) в прикорневой зоне пшеницы при различных вариантах бактериализации семян. А - доза 5 кг/т; В 10 кг/т.

Определение фунгистатического потенциала в фазу колошения пшеницы показало, что степень подавления прорастания конидий *B.sorokiniana* в прикорневой зоне растений, обработанных препаратами культур *B.subtilis* ИБ-15, *B. polymyxa* ИБ-37 и *Bacillus sp.*739 существенно выше, чем у контрольных растений или обработанных ТМТД (рис.11).

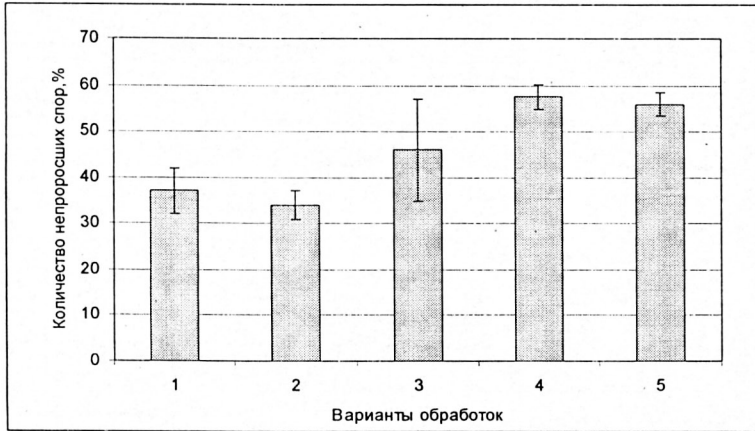


Рис.11. Фунгистатический потенциал почвы прикорневой зоны пшеницы, инокулированной различными культурами бацилл-антагонистов. 1 - контроль, 2 - протравлены ТМТД, 3 - *Bacillus sp.*739 (Бациспекцин БМ), 4 - *B.polymyxa* ИБ-37, 5 - *B.subtilis* ИБ-15.

На основании данных об интенсивности актуального и потенциального дыхания, уровне азотфиксации и супрессивности почвы в прикорневой зоне растений, обработанных биопрепаратами, можно заключить, что исследуемые штаммы бацилл-антагонистов не оказывают негативного воздействия на микробиологические процессы в ризосфере.

4. Эффективность применения бацилл-антагонистов для защиты растений от болезней

4.1. Эффективность применения “Бациспекцина БМ” на озимой пшенице против аэрогенных инфекций

Наиболее вредоносными аэрогенными инфекциями злаков являются возбудители желтой ржавчины *Puccinia striiformis* West, стеблевой - *P.graminis* Pers, бурой - *P.recondita* Rob. Ex Desm. и мучнистой росы *Erysiphe graminis* DC. В связи с этим, представляло интерес выявить возможность подавления развития болезней злаков с помощью отобранных нами бацилл-антагонистов. Определить антагонистическое действие бацилл по отношению к данной группе грибов *in vitro* не представлялось

возможным, поскольку физиологически они являются облигатными паразитами и практически не культивируются на искусственных питательных средах. Испытания проводили на базе СКНИИФ (в настоящее время ВНИИ биологических средств защиты растений, г.Краснодар) в теплице на всходах озимой пшеницы сорта Безостая 1 при условиях, оптимальных для развития растений и фитопатогенов. Эффективность действия определяли учетом количества проявившихся пустул на 1 см² листовой поверхности. В каждом варианте учитывали 40 растений. Контролем служили необработанные инфицированные растения.

Эффективность предпосевной обработки семян против аэрогенной инфекции была определена по развитию бурой ржавчины (возбудитель *P.recondita*).

Таблица 3.

Влияние обработки семян пшеницы биопрепаратами
на развитие бурой ржавчины

Вариант обработки	Концентрация, кл/мл	Количество проявившихся пустул, %	Снижение проявляемости болезни, %
Контроль	-	100	-
Бациспектин БМ	$1,8 \times 10^9$	43,5	56,5
	$0,4 \times 10^9$	62,3	37,7
	$0,4 \times 10^8$	78,3	21,7
<i>Bacillus sp.739</i>	$0,8 \times 10^7$	84,1	15,9
	$0,4 \times 10^7$	84,9	15,1
	$0,2 \times 10^7$	97,1	2,9
<i>B.subtilis</i> ИБ-15	$1,9 \times 10^8$	23,1	76,9
	$0,95 \times 10^8$	23,1	76,9
	$0,46 \times 10^8$	26,1	73,9

Наибольшую устойчивость проявили растения, выращенные из семян, обработанных отмытыми клетками культуры *B. subtilis* ИБ-15 - снижение проявления пустул патогена более 70% (табл.3). При обработке семян биопрепаратом «Бациспектин» с концентрацией $1,8 \times 10^9$ КОЕ/мл, проявляемость пустул снизилась в 2 раза по сравнению с контролем. В то же время, обработка отмытыми клетками *Bacillus sp.739* привела к снижению проявления пустул не более чем на 15%. Сам факт снижения проявления аэрогенной инфекции, в результате предпосевной бактериализации семян, свидетельствует о существовании неких механизмов индукции устойчивости растений, поскольку в этих условиях непосредственный контакт антагониста с фитопатогеном исключен. Ранее были описаны случаи подавления развития ржавчины на листьях лука (возбудитель *P. allii* Rud) при обработке растений *B. cereus* (Doherty & Preece, 1978). Однако, снижение развития ржавчины при обработке семян обнаружено нами впервые.

При профилактической обработке растений пшеницы, за сутки до заражения, также установлено значительное снижение проявления болезни (табл.4). Опрыскивание растений препаратом "Бациспектин БМ" привело к снижению проявления бурой ржавчины на 47,2 – 73,9%, стеблевой ржав-

Таблица 4.

Влияние профилактической обработки растений биопрепаратами на развитие болезней пшеницы

Вариант обработки	Концентрация, кл/мл	Бурая ржавчина		Стеблевая ржавчина		Желтая ржавчина		Мучнистая роса	
		Количество пустул, %	Снижение проявляемости болезни, %	Количество пустул, %	Снижение проявляемости болезни, %	Количество пустул, %	Снижение проявляемости болезни, %	Количество пустул, %	Снижение проявляемости болезни, %
Контроль	-	100	0	100	0	100	0	100	0
Бациспектин БМ	$1,8 \cdot 10^9$	26,1	73,9	27,8	72,2	0	100	31,3	68,7
	$0,4 \cdot 10^9$	52,8	47,2	32,7	67,3	0	100	37,5	62,5
	$0,4 \cdot 10^8$	65,7	34,3	55,7	44,3	68,4	31,6	84,3	15,7
Контроль	-	100	0	100	0	100	0	100	0
Bacillus sp. 739	$0,8 \cdot 10^7$	76,1	23,9	45,9	54,1	14,1	85,9	70,3	29,7
	$0,4 \cdot 10^7$	77,2	22,8	59,0	41,0	40,0	60,0	73,4	26,6
	$0,2 \cdot 10^7$	78,1	21,9	100	0	43,5	56,5	78,1	21,9
Контроль	-	100	0	100	0	100	0	100	0
B.subtilis ИБ-15	$1,9 \cdot 10^8$	51,8	48,2	57,8	42,2	0	100	62,0	38,0
	$0,95 \cdot 10^8$	92,9	17,1	75,0	25,0	36,4	63,6	72,0	28,0
	$0,46 \cdot 10^8$	98,4	1,6	89,1	10,9	97,7	2,3	93,0	7,0

чины на 67,3 – 72,2%% и полному подавлению проявления желтой ржавчины. Развитие мучнистой росы в результате профилактической обработки этим же препаратом снизилось на 62,5 – 68,7%%. В то же время, применение для обработки растений отмытых клеток *Bacillus sp.739*, биологического начала препарата "Бациспектин БМ", оказалось менее эффективным (табл.4). Максимальный уровень снижения проявления бурой ржавчины и мучнистой росы при обработке клетками *B.subtilis* ИБ-15 составил 48,2 и 38,0%% соответственно. Следует отметить высокую эффективность применения клеток исследуемых культур бацилл-антагонистов в отношении возбудителя желтой ржавчины *Puccinia striiformis* – максимальное подавление его развития культурой *Bacillus sp.739* достигало 85,9%, а культурой *B. subtilis* ИБ-15 – 100%.

Результаты оценки искореняющего действия препарата «Бациспектин» и культур антагонистов показали, что такая обработка растений менее эффективна, чем профилактическая. Применение Бациспектина снизило проявление болезней от 40,0 до 61,4%%, а использование клеток *Bacillus sp.739* вообще не оказывало заметного влияния.

Таким образом, проведенные исследования продемонстрировали возможность использования бацилл-антагонистов в защите пшеницы от таких распространенных аэрогенных инфекций, как желтая, стеблевая и бурая ржавчины, мучнистая роса. Одновременно показано, что для *Bacillus sp.739* препаративная форма предпочтительнее, вероятно, потому что в ней содержатся активные метаболиты. Важное значение для понимания механизмов биологического воздействия на растения бацилл-антагонистов имеет обнаруженный феномен снижения развития аэрогенных инфекций при бактеризации семян.

4.2. Эффективность бацилл-антагонистов в отношении твердой головки пшеницы

К наиболее вредоносным болезням пшеницы относится твердая головня, возбудитель *Tilletia caries* (DC.) Tul., потери от которой приводят к недобору 10 – 15% урожая. Инфекция передается через посевной материал, заражающийся при контакте с телиоспорами, сохраняющимися в пораженном зерне. Поэтому представляло интерес исследовать влияние бактеризации семян бациллами-антагонистами на развитие твердой головки пшеницы. Семена яровой пшеницы сорта Жница предварительно инфицировали телиоспорами местной популяции *Tilletia caries* (DC.) Tul. и обрабатывали культурами соответствующих бактерий с добавкой Na-КМЦ в качестве прилипателя. Начальная плотность инокулюма колебалась от 2×10^4 до 2×10^6 КОЕ/семя, в зависимости от штамма бактерий. Полевые микроделачные испытания проводили в двух разных агроклиматических зонах Башкирии – Дуванском (Северо-восток Республики) и Уфимском (Центральный регион) районах. Результаты представлены в таблице 5. Как следует из представленных данных, во всех вариантах обработки семян про-

изошло снижение распространения болезни. Следует отметить высокую эффективность препарата на основе штамма *Bacillus sp.739*.

Таблица 5.
Влияние предпосевной бактеризации семян яровой пшеницы сорта Жница на проявление твердой голвни

Вариант обработки	Доза инокулюма, кл/зерно	Дуванский р-н		
		Кол-во пораженных колосьев, шт.	Количество здоровых колосьев, шт.	Проявление болезни, %
Контроль	-	17	91	15,5
<i>Bacillus sp.739</i>	$2,1 \times 10^4$	1	77	1,3
<i>B.polymyxa</i> ИБ-37	$2,3 \times 10^4$	3	91	3,3
<i>B.subtilis</i> ИБ-37	$1,9 \times 10^6$	3	97	3,1

Таким образом, предпосевная бактеризация бациллами-антагонистами способна снизить проявление твердой головни пшеницы при исходной инфицированности семян.

4.3. Эффективность подавления корневых гнилей яровой пшеницы

Испытания в условиях полевых микроделяночных опытов были проведены в сезоны 1989-1993 гг. и 1996 г. Вегетационные периоды значительно различались по климатическим условиям. В наиболее благоприятном для развития яровой пшеницы 1990 г. отмечался самый низкий за период испытаний уровень распространения (36,8%) и развития корневых гнилей (9,7%). В условиях 1991, 1993 и 1996 годов проявление корневых гнилей было очень высоким, распространение и развитие болезни на яровой пшенице составило 71,7-75,0% и 24,2-27,3% соответственно. В очень холодном и слабо засушливом 1992 году так же наблюдалось значительное развитие корневых гнилей - 57,0%.

В этих опытах ставилась задача изучить влияние доз биопрепаратов, продуктов метаболизма культур антагонистов на эффективность подавления болезни и отдельные элементы структуры урожая в агроклиматических условиях, складывающихся в различные полевые сезоны. Кроме того изучали возможность совмещения биопрепаратов с химическими протравителями. Результаты 4-х летних исследований суммированы в табл. 6 - 8.

В целом, результаты полевых исследований достоверно свидетельствуют о снижении развития болезни в раннем периоде вегетации растений (выход в трубку). Ко времени уборки урожая эффект действия бацилл-антагонистов снижается и различия между вариантами и контролем, как правило, нивелируются.

Таблица 6.

Влияние бактеризации семян пшеницы сорта Саратовская 55 и Безенчукская 139 биопрепаратом на основе культуры *B.subtilis* ИБ-15 на элементы структуры урожая и поражение растений корневыми гнилями

Год	Вариант опыта	Доза, г/кг, кг/т или КОЕ/ зерно	Продук- тивная кустис- тость, шт	Число колосков в глав. колосе, шт	Число зерен в глав. колосе, шт	Масса 1000 зерен, г	Распрост- ранение корневых гнилей, %	Биологич- еская эф- фектив- ность, %	Развитие корневы х гнилей, %	Биологич- еская эф- фектив- ность, %	Развитие корневы х гнилей, %	Биологи- ческая эффектив- ность, %
							Фаза выхода в трубку или цветение				Полная спелость	
1990	Контроль	-	2,8±0,5	12,1±0,5	27,9±3,5	33,6±4,5	36,8±15,1	-	9,7±3,0	-	27,5±5,1	27,5±5,1
	ТМТД	1,5 кг/т	2,3±1,5	13,2±1,0*	27,7±3,5	33,1±3,2	16,4±10,4*	55,4*	4,9±3,0*	49,5*	30,4±5,9	30,4±5,9
	B.subtilis ИБ-15	5 кг/т	2,5±0,4	12,6±0,7	28,3±2,7	32,7±4,4	9,4±5,5*	74,5*	4,2±2,9*	56,7*	31,2±9,5	31,2±9,5
	B.subtilis ИБ-15	7,5 кг/т	2,3±1,5	12,1±1,2	28,8±3,3	33,6±3,7	23,8±9,7*	35,3*	7,7±3,1	-	25,0±13,0	25,0±13,0
	B.subtilis ИБ-15	10 кг/т	2,7±0,8	12,2±1,2	27,7±4,2	33,3±1,9	20,4±7,9*	44,6*	6,2±4,6	-	20,5±10,4	20,5±10,4
1991	Контроль	-	1,2±0,2	9,9±0,7	20,7±1,3	40,8±1,3	71,7±9,9	-	24,2±4,9	-	нд	нд
	B.subtilis ИБ-15rif(кл)	3,0·10 ⁵	1,3±0,3	9,8±1,6	21,5±3,8	41,2±1,6	55,5±26,0	-	15,9±5,3*	34,3*	нд	нд
	B.subtilis ИБ-15rif(пм)	6,8 г/кг	2,0±0,2*	10,1±0,6	21,9±3,4	42,9±1,2	60,0±6,5*	16,3*	17,9±4,1*	26,0*	нд	нд
1992	Контроль	-	1,0±0,1	9,5±1,6	17,4±4,7	41,4±1,4	57,0±35,4	-	16,5±10,4	-	нд	нд
	B.subtilis ИБ-15rif(кл)	9,1·10 ⁴	1,0±0	9,6±0,9	16,8±3,4	41,5±5,1	61,3±7,9	-	13,7±3,8	17,0	нд	нд
	B.subtilis ИБ-15rif(пм)	2,5 г/кг	1,0±0	9,2±2,6	15,6±5,6	39,7±4,3	42,0±23,5	-	13,7±2,0	17,0	нд	нд
1996	Контроль	-	2,0±0,4	13,7±0,5	36,5±2,5	43,2±1,7	нд	нд	нд	нд	27,9±6,5	-
	ТМТД	1,5 кг/т	2,0±0,1	13,5±0,6	31,3±2,2	43,6±1,5	нд	нд	нд	нд	23,7±8,4	-
	B.subtilis ИБ-15rif	1,0·10 ³	1,8±0,3	14,4±0,6	32,7±2,2	34,2±1,6	нд	нд	нд	нд	27,4±12,9	-
	B.subtilis ИБ-15rif	8,7·10 ⁴	2,2±0,7	14,5±1,4	42,9±11,2*	32,3±2,3	нд	нд	нд	нд	30,7±4,2	-
	B.subtilis ИБ-15 rif	3,8·10 ⁶	2,4±0,4	14,5±0,3*	43,4±7,9*	36,3±2,4	нд	нд	нд	нд	18,1±8,5*	37,8*

* - Различия по сравнению с контролем существенны при $p=0,95$, "rif" - рифампицин устойчивый штамм, кл – инокуляция семян клетками, пм – обработка семян продуктами метаболизма, накопленными в среде в процессе ферментации.

Таблица 7.

Влияние бактеризации семян пшеницы сорта Саратовская 55 и Безенчукская 139 биопрепаратом на основе культуры *V. polymyxa* ИБ-37 на элементы структуры урожая и поражение растений корневыми гнилями

Год	Вариант опыта	Доза, г/кг, гк/т или КОЕ/ /зерно	Продук- тивная кустис- тость, шт	Число колосков в главом колосе, шт	Число зерен в главом колосе, шт	Масса 1000 зерен, г	Распрост- ранение корневых гнилей, %	Биологи- ческая эффек- тивность %,	Развитие корне- вых гнилей, %	Биологи- ческая эффекти- вность, %	Развитие корне- вых гнилей, %	Биологиче- ская эф- фектив- ность, %
							Фаза выхода в трубку или цветение				Полная спелость	
1990	Контроль	-	2,8±0,5	12,1±0,5	27,9±3,5	33,6±4,5	36,8±15,1	-	9,7±3,0	-	27,5±5,1	-
	ТМТД	1,5 кг/т	2,3±1,5	13,2±1,0*	27,7±3,5	33,1±3,2	16,4±10,4*	55,4*	4,9±3,0*	49,5*	30,4±5,9	-
	<i>V. polymyxa</i> ИБ-37	5 кг/т	2,5±0,3	13,2±1,0	30,0±2,2	32,4±3,3	27,0±9,5	-	7,1±2,1	26,8	29,5±7,5	-
	<i>V. polymyxa</i> ИБ-37	7,5 кг/т	2,0±0,2	12,1±0,7	26,0±1,1	32,2±2,9	30,0±4,2	-	8,2±1,9	-	32,5±6,7	-
	<i>V. polymyxa</i> ИБ-37	10 кг/т	2,1±0,4*	12,8±1,3	27,0±5,7	31,9±4,3	43,2±18,0	-	11,1±5,0	-	28,3±11,2	-
1991	Контроль	-	1,2±0,2	9,9±0,7	20,7±1,3	40,8±1,3	71,7±9,9	-	24,2±4,9	-	нд	нд
	<i>V. polymyxa</i> ИБ-37rif _(кл)	2,4·10 ⁴	1,5±0,2	10,5±0,7	22,7±1,2*	43,1±3,8	64,1±40,9	-	17,5±8,6	27,7	нд	нд
	<i>V. polymyxa</i> ИБ-37rif _(пм)	25 г/кг	1,4±0,1	10,3±1,8	23,0±5,0	43,2±4,4	67,5±18,3	-	21,4±6,0	-	нд	нд
1992	Контроль	-	1,0±0,1	9,5±1,6	17,4±4,7	41,4±1,4	57,0±35,4	-	16,5±10,4	-	нд	нд
	<i>V. polymyxa</i> ИБ-37rif _(кл)	2,3·10 ³	1,0±0	10,2±1,6	15,7±2,4	43,4±1,2	46,0±22,3	-	11,7±3,7	29,1	нд	нд
	<i>V. polymyxa</i> ИБ-37rif _(пм)	2,5 г/кг	1,0±0	9,8±0,9	15,9±4,3	40,5±4,8	58,0±26,7	-	19,2±9,6	-	нд	нд

* - Различия по сравнению с контролем существенны при $p=0,95$, "rif" - рифампицин устойчивый штамм. Обозначения как в таблице 1.

Таблица 8.

Влияние бактеризации семян пшеницы сорта Саратовская 55 и Безенчукская 139 биопрепаратом на основе культуры *Bacillus sp. 739* на элементы структуры урожая и поражение растений корневыми гнилями

Год	Вариант опыта	Доза, г/кг, гк/т или КОЕ/зерно	Продуктивная кустистость, шт	Число колосков в главном колосе, шт	Число зерен в главн. колосе, шт	Масса 1000 зерен, г	Распространение корневых гнилей, %	Биологическая эффективность, %	Развитие корневых гнилей, %	Биологическая эффективность, %
Фаза выхода в трубку или цветение										
1990	Контроль	-	2,8±0,5	12,1±0,5	27,9±3,5	33,6±4,5	36,8±15,1	-	9,7±3,0	-
	ТМТД	1,5 кг/т	2,3±1,5	13,2±1,0*	27,7±3,5	33,1±3,2	16,4±10,4*	55,4*	4,9±3,0*	49,5*
	Бациспекцин	5 кг/т	2,0±0,3*	12,5±1,4	25,4±3,4	30,6±0,8	29,8±2,9	-	8,6±3,7	-
	Бациспекцин	7,5 кг/т	2,9±1,0	12,5±1,1	28,3±3,9	35,0±5,6	31,3±4,1	-	7,3±4,2	-
	Бациспекцин	10 кг/т	3,0±0,6	12,9±0,4*	29,1±2,1	33,4±11,3	21,7±4,8*	41,0*	5,0±3,0*	48,4*
1991	Контроль	-	1,2±0,2	9,9±0,7	20,7±1,3	40,8±1,3	71,7±9,9	-	24,2±4,9	-
	<i>Bacillus sp. 739</i> ^{str} (кл)	1,4·10 ⁶	1,3±0,1	10,6±2,0	25,6±4,2	45,6±2,1*	75,0±20,1	-	24,2±8,2	-
	<i>Bacillus sp. 739</i> ^{str} (пм)	11 г/кг	2,0±0,5*	12,0±1,0*	26,0±3,8*	45,8±2,2*	74,2±18,8	-	26,7±9,1	-
	Бациспекцин (кл)	2,6·10 ⁴	1,7±0,3*	9,7±1,8	25,2±3,0*	42,8±3,8	66,7±9,9	-	25,2±1,7	-
	Бациспекцин (пм)	24 г/кг	1,6±0,4*	10,7±1,7	23,4±6,4	43,5±5,1	78,3±29,2	-	24,4±4,6	-
1992	Контроль	-	1,0±0,1	9,5±1,6	17,4±4,7	41,4±1,4	57,0±35,4	-	16,5±10,4	-
	<i>Bacillus sp. 739</i> ^{str} (кл)	2,3·10 ⁵	1,1±0,1*	10,5±0,8	17,9±5,2	42,6±2,9	33,3±18,2	-	11,7±2,0	29,1
	Бациспекцин (кл)	2,5·10 ⁴	1,0±0,0	9,6±1,7	16,3±5,3	40,4±4,9	64,0±9,0	-	26,0±5,0	-
	Бациспекцин (пм)	2,5 г/кг	1,0±0,1	9,6±1,1	15,6±3,8	43,0±2,1	25,3±7,9*	55,6*	7,0±2,2*	57,6*
1993	Контроль	-	1,4±0,4	13,3±0,2	27,0±4,1	37,7±1,6	71,7±1,3	-	25,0±3,4	-
	<i>Bacillus sp. 739</i> ^{str}	4,8·10 ³ 2,5 г/кг	1,3±0,4	13,8±0,9	24,4±3,9	40,4±3,9	61,3±3,0*	14,5*	21,3±3,0*	14,8*
	Байтан	2,0 г/кг	1,4±0,2	13,5±0,1*	28,1±1,4	38,3±6,0	61,0±9,5*	14,9*	21,7±11,1	13,2
	<i>Bacillus sp. 739</i> ^{str} +Бай.	2,2·10 ³ +2,0 г/кг	1,3±0,3	13,6±0,1*	28,1±9,2	35,1±1,3	60,0±10,4*	16,3*	19,3±3,0*	22,8*
	ТМТД	2,0 г/кг	1,4±0,4	14,8±0,5*	26,3±7,9	38,7±4,4	77,0±19,0	ℓ	23,0±0	8,0
	<i>Bacillus sp. 739</i> ^{str} +ТМТД	3,4·10 ³ +2,0 г/кг	1,4±0,2	13,8±0,4*	28,9±2,4	39,2±4,3	69,3±3,0	-	22,0±0	12,0
	Фундазол	2,0 г/кг	1,2±0,2	13,7±0,8	27,5±4,5	38,2±2,9	71,1±26,0	-	29,3±16,9	-
	<i>Bacillus sp. 739</i> ^{str} +Фун.	1,0·10 ³ +2,0 г/кг	1,3±0,2	14,1±0,3*	26,9±7,2	36,3±3,1	64,0±33,3	10,7	26,7±13,4	-

• - Различия по сравнению с контролем существенны при $p=0,95$, "str" - стрептомицин устойчивый штамм. Обозначения как в таблице 1.

По характеру действия препараты исследованных бацилл-антагонистов значительно различались. Для эффективной защиты растений пшеницы от корневых гнилей препаратами на основе *Bacillus sp.* 739 необходимо было обязательное наличие в них биологически активных метаболитов, накапливающихся в процессе их ферментации. Вместе с тем необходимо и наличие в препарате жизнеспособных спор культуры-продуцента, поскольку заселение ризосферы данным штаммом положительно сказывается на структуре урожая.

Для препаратов на основе *B. subtilis* ИБ-15 наличие активных метаболитов не является определяющим, но важное значение имеет плотность инокулюма, поскольку эффективность протекторного действия напрямую зависит от количества нанесенных на зерно спор.

Биологическое действие *B. polymyxa* ИБ-37, как антагониста возбудителей корневых гнилей, в полевых условиях не проявилось.

Производственные испытания биопрепарата "Бациспецин БМ", проведенные в разные годы в хозяйствах Башкирии, расположенных в различных агроклиматических зонах, убедительно свидетельствуют о положительном влиянии предпосевной обработки семян пшеницы на урожай и снижение распространения основных болезней. Эффективность обработки семян биопрепаратом в производственных условиях сопоставима с обработкой семян химическими протравителями, а зачастую и значительно их превосходит. На рисунке 12 представлены, в качестве примера, результаты производственных испытаний на посевах пшеницы за 1990 год.

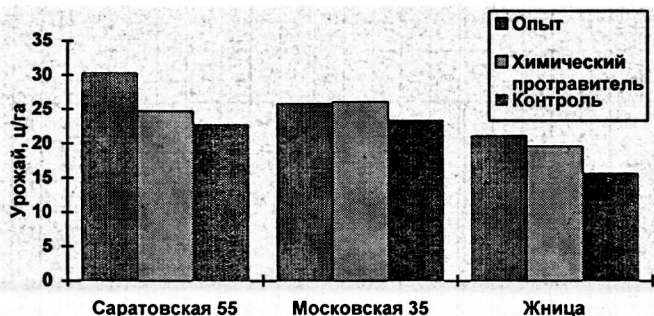


Рис. 12. Результаты полевых испытаний биопрепарата "Бациспецин" в 1990 г. Предпосевная обработка семян.

По эффективности применение биопрепарата для обработки семян превосходит (или сопоставимо) использование химических протравителей ТМТД и Байтан.

5. Продукция бациллами-антагонистами веществ фитогормональной природы

Наши многочисленные наблюдения о влиянии обработки растений пшеницы биопрепаратами позволили выделить некоторые особенности в реакции растений. Помимо снижения общей пораженности растений грибными болезнями, что можно объяснить антигрибными свойствами бактерий, очень часто у обработанных растений отмечались морфофизиологические изменения, в частности, увеличивались высота стебля, продуктивная кустистость, число зерен в колосе и масса 1000 семян. Зачастую отмечалось ускорение цветения. Поскольку такая полифункциональность реакции характерна для действия на растения рострегулирующих веществ и/или экзогенных фитогормонов, возникло предположение о возможной продукции бациллами-антагонистами подобных соединений. Изучению влияния бактерий на фитогормональный статус растений, определению способности отдельных штаммов синтезировать фитогормоны и секретировать их в окружающую среду, установлению природы синтезируемых гормонов посвящена настоящая глава.

5.1. Влияние бактерий-антагонистов рода *Bacillus* на фитогормональный статус растений пшеницы

Влияние интродукции бацилл-антагонистов в корневую систему пшеницы на гормональный статус растений изучали в полевых мелкоделяночных экспериментах. Семена яровой пшеницы сорта Саратовская 55 обрабатывали препаратами и высевали на делянки площадью 5,0 м² в четырехкратной повторности. Контролем служили необработанные семена. Растения на анализ отбирали в фазе выхода в трубку.

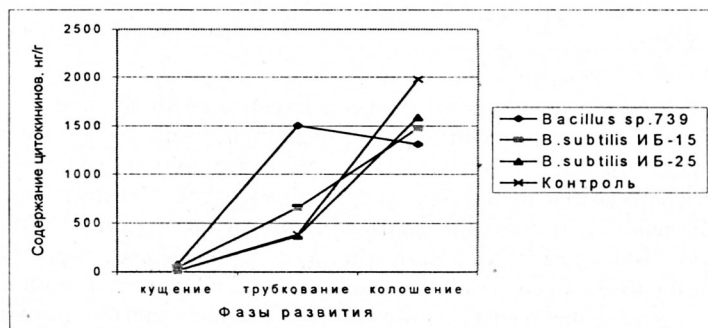


Рис. 13. Содержание эндогенных цитокининов в растениях пшеницы, инокулированных бактериями-антагонистами.

Содержание цитокининов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с антисывороткой к зеатинрибозиду. Поскольку

уровень содержания цитокининов в растениях не является константой, а меняется во времени, в зависимости от стадии развития растений, содержание цитокининов определяли в трех точках: кушение, выход в трубку, колошение. Результаты эксперимента представлены на рис. 13.

Как следует из представленных данных, наибольшие различия в уровне содержания цитокининов в растениях наблюдаются в фазу трубкования. Поскольку гормональная регуляция развития и физиологического состояния растений определяется не столько уровнем содержания того или иного фитогормона, сколько их балансом, то в следующем эксперименте было определено влияние бактериальной обработки на гормональный статус растений (табл. 9).

Таблица 9.

Содержание гормонов в надземной части растений пшеницы при обработке семян биопрепаратами

Вариант обработки	ИУК, нг/г	АБК, нг/г	Зеатиноподобные, нг/г
Контроль	98	172	30
ТМТД	165	235	20
<i>B.pumilus</i> ИБ-2	200	207	20
<i>B.subtilis</i> ИБ-15	164	264	80
<i>B.polymyxa</i> ИБ-37	152	383	155
<i>Bacillus sp.</i> 739 Бациспецин БМ	173	310	30
НСП ₁₀	40	148	37
НСП ₀₅	52	190	48

Тот факт, что все обработанные растения содержали в целом больше ИУК и АБК чем контрольные, может свидетельствовать о воздействии экзогенных цитокининов, продуцируемых бактериями, развивающимися в ризосфере. Увеличение уровня ауксинов и абсцизовой кислоты у растений под воздействием экзогенных цитокининов отмечал Evans (1984). Отмеченную нами в предыдущей главе индукцию устойчивости растений при обработке их биопрепаратами, можно связать с изменением гормонального статуса, что в свою очередь может быть следствием синтеза цитокининподобных веществ интродуцированными в ризосферу бактериями-антагонистами.

5.2. Образование цитокининов бактериями-антагонистами

Для определения способности исследуемых бактерий-антагонистов продуцировать вещества фитогормональной природы, отдельные штаммы микроорганизмов были проанализированы в иммуноферментных тест-системах на наличие в культуральной жидкости цитокининов, ауксинов и абсцизовой кислоты. ИУК и АБК полностью отсутствовали в культуральной жидкости исследуемых штаммов. В тест-системе для определения зеатина/зеатинрибозидов в культуральной жидкости *B. subtilis* ИБ-15, *B. subtilis* ИБ-21, *Bacillus.sp.* 739 и *B. polymyxa* ИБ-43 наблюдалось ингибирование реакции, что свидетельствовало о возможном присутствии данных гормонов. Расширенный анализ коллекции бактерий-антагонистов на содержание цитокининподобных веществ позволил выявить штаммы, способные продуцировать цитокинины в больших количествах. В таблице 10. представлены результаты иммуноферментного анализа культуральной жидкости штаммов-антагонистов бактерий рода *Bacillus* в тест-системе для определения цитокининов с расширенной специфичностью.

Таблица 10.

Иммунореактивность культуральной жидкости штаммов-антагонистов рода *Bacillus* в тест-системе с расширенной специфичностью.

Штамм	ОД ₄₉₂	Штамм	ОД ₄₉₂
<i>B. subtilis</i> ИБ-4	1.32±0,12	<i>B. polymyxa</i> ИБ-37	1.32±0,15
<i>B. subtilis</i> ИБ-7	1.56±0,15	<i>B. subtilis</i> ИБ-39	1.55±0,07
<i>B. subtilis</i> ИБ-14	1.35±0,05	<i>B. polymyxa</i> ИБ-45	1.61±0,09
<i>B. subtilis</i> ИБ-16	1.36±0,09	<i>B. polymyxa</i> ИБ-50	1.60±0,21
<i>B. subtilis</i> ИБ-18	1.29±0,13	<i>B. subtilis</i> ИБ-54	1.66±0,11
<i>B. subtilis</i> ИБ-19	1.32±0,11	<i>B. subtilis</i> ИБ-55	1.59±0,17
<i>B. subtilis</i> ИБ-21	1.45±0,19	<i>B. pumilus</i> ИБ-2	1.16±0,07
<i>Bacillus sp.</i> ИБ-23	1.62±0,21	<i>B. subtilis</i> ИБ-6	1.05±0,10
<i>B. subtilis</i> ИБ-24	1.58±0,06	<i>B. subtilis</i> ИБ-15	0.80±0,16
<i>Bacillus sp.</i> ИБ-26	1.30±0,08	<i>B. subtilis</i> ИБ-22	0.50±0,09
<i>B. subtilis</i> ИБ-29	1.38±0,10	<i>Bacillus sp.</i> 739	0.92±0,12
<i>B. subtilis</i> ИБ-34	1.52±0,11	<i>B. subtilis</i> ИБ-43	1.17±0,11
Контроль *	1.55±0.20		

*Контроль - питательная среда до внесения в нее культуры бактерий.

Исследованные штаммы разделены по степени достоверного ингибирования иммунологической реакции антиген-антитело. В использованном нами варианте непрямого конкурентного ИФА количество цитокининов обратно пропорционально хромофорному ответу (оптической плотно-

сти). Штаммы, сгруппированные в светлой части таблицы, не продуцировали цитокинины. Культуральная жидкость штаммов *B.subtilis* ИБ-15, *B.subtilis* ИБ-22 и *Bacillus sp.* 739 достоверно и в значительной степени ингибировала реакцию антиген-антитело. В этой связи были основания предположить, что вышеназванные штаммы являются продуцентами цитокининов. До сего времени продукция цитокининов аэробными спорообразующими бактериями рода *Bacillus* не была описана. Поэтому для подтверждения такого феномена нами была предпринята попытка выделения из культуральной жидкости, очистки и идентификации веществ, проявивших иммунореактивность в тест-системах на цитокинины.

5.3. Исследование природы цитокининов, продуцируемых аэробными спорообразующими бактериями рода *Bacillus*

Определенные сомнения в том, действительно ли иммунореактивные к специфическим антителам продукты метаболизма исследуемых бацилл-антагонистов являются цитокининами, вызвал тот факт, что при разведении тестируемых образцов отсутствовала пропорциональность между содержанием иммунореактивного вещества и кратностью разведения. Такие результаты обычно свидетельствуют об эффекте неспецифической интерференции, который связан с присутствием веществ, мешающих достоверному определению антигенов (Pengelly, 1986; Wong, Horgan, 1987). Неспецифическая интерференция обуславливается компонентами, которые препятствуют образованию комплекса между антигеном и антителом. Для подтверждения эффекта неспецифической интерференции обычно используют антитела к таким антигенам, которых заведомо нет в исследуемом объекте.

Последующую работу проводили со штаммом *Bacillus subtilis* ИБ-22, максимально ингибировавшим иммуноферментную реакцию в системе для определения цитокининов. Для определения в культуральной среде неспецифического ингибитора иммунохимической реакции, культуральную жидкость анализировали в тест-системах для определения гемагглютинина вируса гриппа (ГА) и овальбумина (ОВА), то есть веществ, заведомо отсутствующих в бактериальной среде. Тем не менее, в обеих системах происходило значительное ингибирование иммуноферментной реакции, что свидетельствовало о том, что в культуральной жидкости действительно содержится компонент или компоненты, обладающие способностью неспецифически ингибировать иммунологическую реакцию антиген-антитело. Было выяснено, что неспецифический ингибитор не диализуется и, следовательно, является высокомолекулярным компонентом. Нами была проведена очистка культуральной жидкости от неспецифического ингибитора при помощи бутанольной экстракции и аффинной хроматографии.

На рисунке 14 представлены результаты иммуноферментного анализа фракций после хроматографии бутанольного экстракта культуральной жидкости на аффинной колонке в тест-системе для определения зеатина.

Суммарное содержание гормонов в спиртовой фракции составило 400 нг; что соответствует концентрации 16 нг/мл свободных цитокининов в культуральной среде.

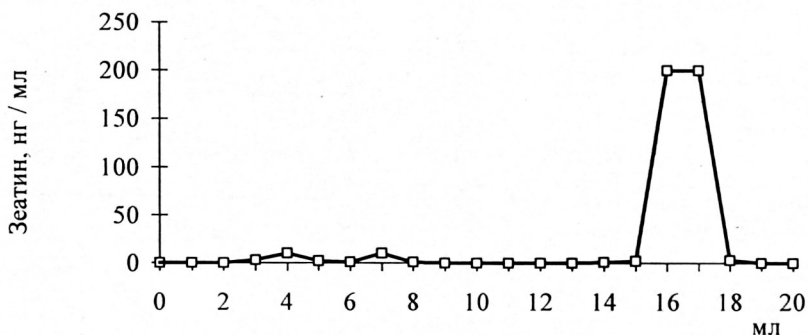


Рис. 14. Аффинная хроматография бутанольного экстракта культуральной жидкости *B. subtilis* ИБ-22 на колонке с антителами к зеатинрибозиду.

Состав цитокининов собранной фракции был установлен с помощью тонкослойной хроматографии и дальнейшего анализа зон хроматограммы в тест-системах для ЗР-З, ИПА-ИП и ДЗР-ДЗ. В зонах, соответствующих положениям метчиков, были идентифицированы изопентениладенин, в количестве 4 нг/мл, зеатинрибозид и/или дигидрозеатинрибозид, - 1,5 нг/мл, и обширная зона, соответствующая положению метчиков зеатина и дигидрозеатина. Количество гормона последней зоны в тест-системе к зеатинрибозиду составило 15 нг.

Для окончательной идентификации свободных цитокининов культуральной жидкости *B. subtilis* ИБ-22 образец, подготовленный при помощи бутанольной экстракции и аффинной хроматографии, анализировали методом масс-спектрометрии в сочетании с ВЭЖХ. Как следовало из данных хроматографии, в образце обнаруживался компонент со временем выхода, соответствующим времени выхода дейтерированного стандарта зеатина (рис 15). На масс-спектрограмме обнаружился пик с максимумом отношения массы к заряду, равным 220, что характерно для зеатина (рис 16). По соотношению масса/заряд, пика дейтерированного стандарта зеатина и пика фракции образца, было вычислено содержание указанного цитокинина, составившее около 20 нг/мл КЖ.

Таким образом, иммунологическими методами, тонкослойной, ВЭЖХ и хроматомасс-спектроскопией было установлено, что в культуральной жидкости *B. subtilis* ИБ-22 действительно содержится свободный цитокинин, идентифицированный нами как зеатин. Этот факт установлен для аэробных спорообразующих бактерий впервые.

Содержание свободных цитокининов в культуральной жидкости оказалось не столь велико, как это следовало из данных иммуноферментного анализа.

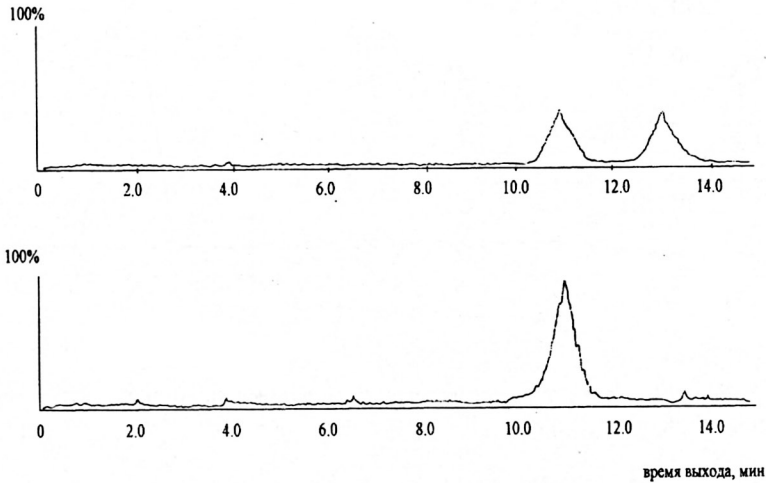


Рис. 15. Высокоскоростная хроматография цитокининов: а - культуральной жидкости *B. subtilis* ИБ-22, образец подготовленный при помощи бутанольной экстракции и аффинной хроматографии; б - дейтерированного стандарта зеатина.

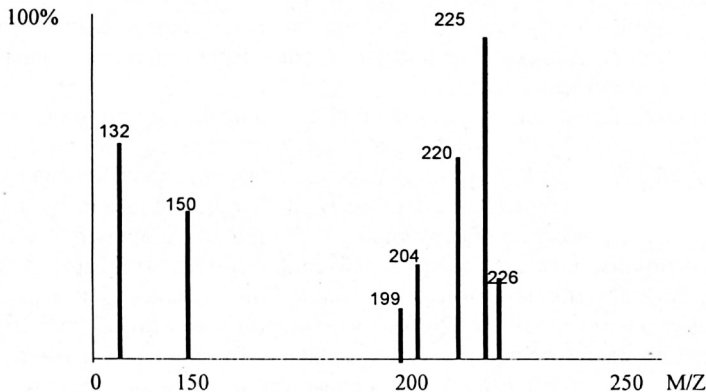


Рис. 16. Масс-спектр компонентов хроматографического пика, соответствующего времени выхода зеатина

Выявленное наличие неспецифического ингибитора иммунологической реакции антиген-антитело в культуральной среде бактерий, вынудило нас заинтересоваться его природой. При попытке освободиться от неспе-

цифического ингибитора, содержащегося в культуральной жидкости *B. subtilis* ИБ-22 с помощью аффинной хроматографии, было выяснено, что около 7% процентов ингибитора прочно удерживается аффинным сорбентом и вымывается только 70% этанолом, т.е. попадает во фракцию цитокининов. Основное количество неспецифического ингибитора элюируется с колонки 0.5M NaCl. При элюции образца через колонку с нормальными иммуноглобулинами кролика, неспецифический ингибитор в спиртовом элюате не обнаруживался. Вероятно, часть неспецифического ингибитора содержит в своей структуре участок, способный специфически связываться с антителами к цитокининам. В этом случае он должен вытесняться с колонки избыточным количеством гормона. Действительно, при замене этанола на раствор БАП при элюции с аффинной колонки неспецифический ингибитор вытеснялся в том же количестве. Этот результат свидетельствовал, что вещество, элюирующееся в спиртовой фракции, содержит цитокинин.

Для выяснения физико-химических параметров компонента, удерживаемого специфическими антителами, собранную фракцию подвергли гельфильтрации на сефадексе G-200. Поскольку вся ингибирующая активность определялась во фракции, соответствующей свободному объему, молекулярная масса данного компонента была не менее 250 кДа. Максимум УФ-поглощения изучаемого компонента соответствовал 264 нм, что свидетельствовало о небелковой природе вещества.

Исследование высокомолекулярной фракции на наличие цитокининовой активности с помощью биотеста на проростках щирицы *Amaranthus caudatus* L. показало, что данная фракция проявляет цитокининовую активность. Количество активного гормона соответствовало содержанию 200 нг зеатинрибозиды в 1 мл культуральной жидкости. Таким образом, было подтверждено, что цитокинины, входящие в комплекс с неспецифическим ингибитором являются биологически активными.

Поскольку исследуемый высокомолекулярный ингибитор не относится к белкам, было предположено, что, возможно, он имеет полисахаридную природу. Обработка фракции 0.5% спиртовым раствором йода вызвала красно-коричневую окраску, характерную для некоторых микробных полисахаридов (Елинов, 1987). При анализе кислотного гидролизата фракции глюкозидазным методом присутствие в ней глюкозы не обнаружено. Очевидно, мономерной единицей полисахарида, образующего комплекс с цитокининами, является не глюкоза, а другой углевод, природу которого предстоит установить. Данный полимер, вероятно, синтезируются бактериями *de novo*.

Количественный и качественный состав цитокининов, входящих в высокомолекулярный комплекс, определяли с помощью иммуноанализа в сочетании с ТСХ. От интерферирующего действия неспецифического ингибитора освобождались путем прогревания аффинноочищенной высокомолекулярной фракции при 80°C в течение 15 мин. Количество цитокининов во фракциях определяли с помощью ИФА в тест-системе с расширен-

ной кросс-реактивностью. Около 640 нг-экв./мл зеатина (в пересчете на культуральную жидкость) иммунологически определялось в высокомолекулярной фракции и 12 нг/мл обнаруживалось низкомолекулярной фракции. В тест системе на производные зеатина в высокомолекулярной фракции обнаружилось 600 нг/мл и 12 и 4 нг цитокининов детектировалось в тест системах на производные дигидрозеатина и изопентениладенина соответственно. Следовательно, иммунореактивность фракции определяется в основном наличием зеатина или его производных.

Исследование состава цитокининов, входящих в комплекс с полисахаридом с помощью тонкослойной хроматографии в сочетании с иммуноанализом показало, что большая часть иммунореактивности присутствует в зоне выхода метчика рибозида зеатина. Соединения, способные реагировать с антителами к зеатинрибозиду, также были обнаружены в зоне с Rf 0-0,1, где можно ожидать присутствия сильно гидрофильных нуклеотидов зеатина (рис.17а). С помощью тест-системы для определения ИП/ИПА незначительная иммунореактивность была выявлена в зонах выхода метчиков ИП и ИПА (рис.17б).

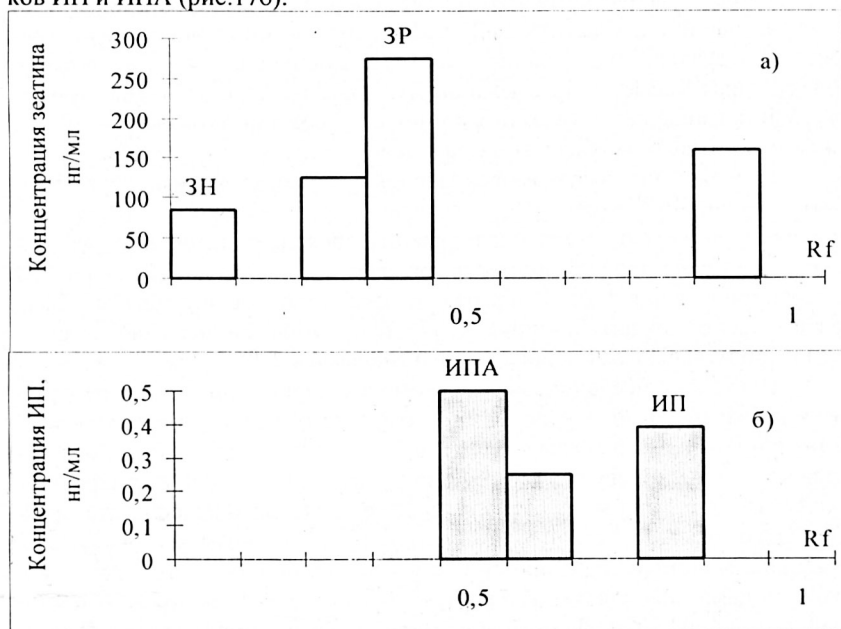


Рис. 17. Хроматографическое распределение цитокининов, входящих в состав высокомолекулярного комплекса в тест-системах для определения: а) зеатина; б) ИП.

Природа материала хроматографической зоны с Rf 0,9, реагировавшего с анти-ЗР сывороткой, осталась не ясна. Таким образом, высокомоле-

кулярный компонент, удерживаемый на колонке с антителами к зеатинрибозиду, содержит преимущественно рибозилированные формы зеатина (зеатинрибозид, зеатиннуклеотид) и небольшое количество изопентениладенозина и изопентениладенина. Комплекс полисахарида с гормоном диссоциировал, поскольку при хроматографии цитокинины разделялись в виде свободных гормонов, а полисахаридный компонент выявлялся на старте. Согласно литературным данным, некоторые гормоны, например ауксины, обнаруживаются в растениях в форме комплекса с полисахаридом, однако, цитокинины в такой форме до сих пор обнаружены не были.

Обнаруженная нами способность отдельных представителей аэробных спорообразующих бактерий продуцировать фитогормоны цитокининового ряда имеет важное значение. Гормоны этого класса ответственны за процесс деления клеток (Кулаева, 1973), регулируют их рост и дифференциацию (Полевой, 1982), индуцируют органогенез (Муромцев, 1984), повышают устойчивость растений к неблагоприятным факторам окружающей среды (Баскаков, 1988). Возможно, благодаря обнаруженной способности бацилл продуцировать цитокинины происходит и индукция устойчивости растений к болезням, установленная нами для штаммов *Bacillus sp. 739* и *B. subtilis* ИБ-15. Цитокинины, продуцируемые штаммами *Bacillus sp. 739*, *B. subtilis* ИБ-15, *B. subtilis* ИБ-22 в достаточно большом количестве, присутствуют, в основном, в форме комплекса с полисахаридом. На наш взгляд это может иметь важное значение, т.к. диссоциация цитокининов из такого комплекса способна обеспечить пролонгированное и нетоксическое действие фитогормонов на растения.

6. Миколитические ферменты бацилл-антагонистов

В составе клеточных стенок большинства мицелиальных грибов хитин является одним из структурных компонентов. Лизис клеточных стенок, часто наблюдаемый при действии бактерий-антагонистов на фитопатогенные грибы, обычно связывают с воздействием комплекса экстрацеллюлярных ферментов, продуцируемых агентом биологического контроля. Важнейшая роль в комплексе гидролитических ферментов принадлежит хитиназе (поли-[1,4- β -(2-ацетиамидо-2-дезоксидеокси-D-глюкозид)]-гликаногидролаза; КФ 3.2.1.14) и ламинариназе (глюкан-эндо-1,3-бета-глюкозидаза, КФ 3.2.1.39). Считается, что хитиназная активность является обычной для многих видов *Bacillus* (Слабоспицкая с соавторами, 1992), тем не менее, часто антагонистическая активность бацилл проявляется при отсутствии проявления хитинолитической или иной гидролазной активности. В связи с этим, представляло интерес определить - существует ли строгая взаимосвязь между способностью бацилл-антагонистов подавлять развитие мицелиальных грибов и способностью к синтезу экстрацеллюлярных хитиназ.

6.1. Характеристика гидролазного комплекса хитинолитических бактерий

В ходе работы со штаммом *Bacillus sp.* 739 было обнаружено, что при культивировании на хитинсодержащих субстратах кроме ферментов, осуществляющих гидролиз коллоидного хитина, в среду секретируются также такие гидролитические ферменты, как β -амилаза - глюкан-1,4- α -D-мальтогидролаза (К.Ф.3.2.1.2), бета-глюканаза - глюкан-эндо-1,3- β -D-глюкозидаза (К.Ф.3.2.1.39), хитозаназа - хитозан-N-ацетилглюкозаминигидролаза (К.Ф.3.2.1.132) и циклодекстринглюканотрансфераза (К.Ф.2.4.1.19). Целлюлазная и КМЦ-азная активности у этого штамма не обнаруживаются. Ферменты - бета-глюканаза, хитиназа и хитозаназа потенциально могут принимать участие в лизисе грибных клеточных стенок. При анализе ферментативной активности культуральной жидкости других хитинолитических изолятов также обнаружилось наличие бета-глюканазной и хитозаназной активностей. Данные по ферментативной активности некоторых изолятов бактерий, представлены в таблице 11.

Таблица 11.

Активность литических ферментов изолятов бактерий-антагонистов

Штамм	Хитиназа, ед/мл		Хитозаназа, ед/мл		Ламириназа, ед/мл	
	среда 1*	среда 2	среда 1	среда 2	среда 1	среда 2
<i>B.subtilis</i> -517	0,036	0,073	0,030	0,093	6,111	5,555
<i>B.subtilis</i> -522	0,045	0,078	0,040	0,171	1,000	0,391
Почвенные изоляты неопределенного вида <i>Bacillus spp.</i> :						
F-2 i-3	0,043	0,084	0,038	0,181	1,111	
EAstr	-	0,065	-	0,123	-	0,435
SS	0,048	0,073	0,031	0,031	0,722	0,351
ArmMell	0,024	0,053	0,030	0,121	1,322	2,555
Ci	0,025	0,054	0,030	0,117	1,322	2,488
B-96(a)	0,027	0,067	0,030	0,202	6,667	6,444

*Примечание: среда 1 включала 0,5% нативного хитина, среда 2 - 0,5% измельченных плодовых тел гриба *Macrolepiota procera* (Трутовик чешуйчатый).

Представленные данные свидетельствуют о том, что хитинолитические бактерии способны продуцировать наряду с хитиназой другие ферменты, участвующие в лизисе грибных клеточных стенок. Следует отметить, что на средах, содержащих в качестве субстрата измельченные плодовые тела грибов, уровень хитиназной и хитозаназной активностей был выше, чем на среде с нативным хитином. Для ламириназной (β -глюканазной) активности это правило не соблюдалось. Возможно, β -1,3-

глюканаза является конститутивным ферментом, поскольку она в равной степени продуцируется на средах с коллоидным хитином и грибном субстрате. Интересно, что все протестированные хитинолитические изоляты, вошедшие в группу неопределенного вида, проявили и циклодекстринглюканотрансферазную активность на обеих средах. Уровень активности этого фермента сравним с таковым у *Bacillus sp.* 739, что свидетельствует об их таксономической близости.

6.2. Влияние компонентов питательных сред на продукцию ферментов гидролитического комплекса

Для исследования роли хитиназ в проявлении антагонистического действия бацилл предстояло наработать препаративные количества фермента, для чего, в свою очередь необходимо было изучить условия максимального накопления фермента. Работу проводили с культурой *Bacillus sp.* 739, перспективным агентом биологического контроля болезней растений. Характеристика роста штамма и накопления хитиназной активности в периодической культуре представлена на рис. 18.

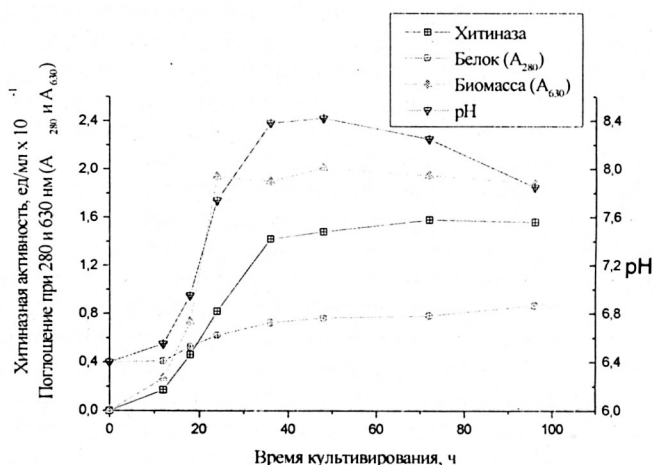


Рис. 18. Динамика роста, синтеза хитиназы и внеклеточных белков в ходе периодического культивирования *Bacillus sp.* 739

Наряду с хитиназой обнаруживалась и активность β -1,3-глюканазы и хитозаназы. Использование в качестве основного источника углерода грибной биомассы привело к значительному повышению синтеза этих ферментов (табл.12).

Продукция миколитических ферментов штаммом *Bacillus sp. 739*
на различных субстратах (72 ч культивирования).

Фермент	Активность, ед/мл		
	Коллоидный хитин из панцирей крабов, 0,5 % (в/о)	Измельченные плодовые тела гриба <i>Macrolepiota procera</i> , 0,5 % (в/о)	Коллоидный хитин (0,2%) в сочетании с коллоидным хитозаном, 0,1 % (в/о)
Хитиназа	0,158±0,003	0,089±0,003	0,203±0,003
Хитозаназа	0,058±0,003	0,255±0,003	0,347±0,003
β-1,3-глюканаза	2,41±0,01	5,67±0,01	4,27±0,01

Повышенное образование β-1,3-глюканазы и хитозаназы обусловлено, вероятно, тем, что биомасса грибов содержит непосредственные индукторы их синтеза в отличие от чистого хитина. В серии экспериментов по подбору состава питательных сред было установлено влияние природы хитинсодержащего субстрата, источников органического азота и некоторых возможных индукторов синтеза ферментов. В результате этих работ было установлено, что наибольший выход хитиназы обеспечивает биомасса гриба *Botrytis cinerea* и хитин-глюкановый комплекс, выделенный из некоторых базидиомицетов, например, *Armillariella mellea* (опенок осенний). Повышенная секреция бациллами хитиназ при использовании биомассы грибов вместо чистого хитина в питательных средах связана вероятно с тем, что в клеточных стенках этих грибов, присутствуют неспецифические индукторы синтеза. Использование в качестве аддитива к основному субстрату β-глюкана, пектина и хитозана индуцировало синтез хитиназы, тогда как N-ацетилглюкозамина угнетал образование фермента. Лучшими источниками органического азота оказались пептон, гидролизат казеина и кукурузный экстракт. Синтез фермента культурой осуществлялся в относительно узком интервале значений начального pH среды, - от 6,0 до 7,0. При pH выше 7,0 начиналось снижение хитиназной активности на 10-20%, а при pH ниже 6,0 синтез фермента полностью прекращался. Оптимум продукции хитиназы *Bacillus sp. 739* находился в интервале температур от 28 до 38°C.

6.3. Выделение, очистка и характеристика хитиназы *Bacillus sp. 739*

Наработку хитиназы для препаративных целей осуществляли на средах с использованием хитин-глюканового комплекса из клеточных стенок *P.squamosus* (Трутовик чешуйчатый). Очистку проводили по ниже приведенной схеме (табл.13).

Таблица 13.

Схема очистки хитиназы *Bacillus sp.* 739

Этап	Объем, мл	Активность		Белок, мг	Степень очистки	Выход, %
		всего единиц	ед/мг белка			
КЖ	500	51,000	0,017	2970	1	100
Осаждение 40-70% нас. сульфатом аммония	10	33,857	0,052	645,6	3	66
Гель-фильтрация на Се- фадексе G-15	42	22,176	0,120	185,1	7	44
Адсорбция на коллоид- ном хитине	7	12,242	0,540	22,67	32	24
Гель-хроматография на Биогеле Р-100	37	8,177	0,961	8,51	56	16

Электрофорез в 7,5%-ном ПААГ с 1% ДДС-Na отдельных фракций, собранных в процессе хроматографии на Биогеле Р-100 показал присутствие в них белков различной молекулярной массы (рис. 19).

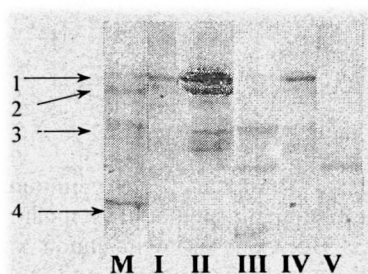


Рис. 19. Электрофореграмма фракций хитиназы. 7,5% ПААГ, 1% ДДС-Na. I, II, III, IV, V - фракции хитиназы, отобранные при гель-хроматографии на Биогеле Р-100; М - маркеры: 1 - овотрансферрин (Mr 76-78,000); 2 - бычий сывороточный альбумин (Mr 66,250); 3 - овальбумин (Mr 43,000); 4 - карбангидраза (Mr 30,000).

Молекулярная масса двух доминирующих полос в наиболее активном препарате фермента составляла около 70 кДа и 65 кДа. Дополнительно выявляемый белок с хитиназной активностью имел молекулярную массу около 48 кДа. Близкие по массе белки были обнаружены ранее у *Bacillus circulans* WL-12 (хитиназы А2 и D), *B. licheniformis* X-7и (хитиназа III), *B.*

cereus (хитиназа 68 кДа) и *B. circulans* No.4.1 (Трачук и др., 1996, Takayanagi et al., 1991, Watanabe et al., 1990, Wiwat et al., 1999). Наибольшей хитиназной активностью обладала фракция, содержащая первые два белка. Несмотря на свою гетерогенность, препарат очищенной хитиназы имел ярко выраженный рН-оптимум, равный 6,0 и сохранял стабильность в диапазоне рН 4,0-9,0. Для температурного профиля активности фермента было характерно наличие двух пиков – максимального, при 50°C и более низкого при 65°C. Фермент был относительно стабилен при температурах от 50 до 60°C, сохраняя 70 - 80% первоначальной активности.

Изучение специфичности хитиназы *Bacillus sp. 739* проводили по действию образцов фермента различной степени гомогенности на кристаллический и коллоидный хитин из панцирей краба, хитозан, а также на некоторые хромогенные производные хитоолигосахаридов (табл. 14). Самым активным был наиболее гетерогенный препарат фермента, обозначенный в таблице как фракция II.

Таблица 14.

Гидролиз различных субстратов образцами хитиназ *Bacillus sp. 739*

Фракция*	Активность по субстрату в ферментативной реакции, ед/мл					
	Нативный хитин, 1,0%	Коллоидный хитин, 1,0%	Хитозан, 1,0%	П-НФ- GlcNAc 5 мМ	П-НФ- (GlcNAc) ₂ 5 мМ	П-НФ- (GlcNAc) ₃ 5 мМ
I	0,041±0,005	0,178±0,007	Нет	Нет	0,75±0,06	0,09±0,04
II	0,079±0,006	0,498±0,008	Нет	Нет	2,00±0,07	0,25±0,07
III	0,026±0,005	0,190±0,007	≈0,010	Нет	1,10±0,07	0,24±0,08
IV	-	0,047±0,005	-	Нет	0,58±0,007	0,25±0,08

* Обозначения как на рис.19.

Результаты исследований показали, что принципиальной разницы между фракциями фермента в специфичности гидролиза того или иного субстрата не наблюдалось. Все образцы очищенной хитиназы обладали способностью гидролизовать коллоидный хитин и п-нитрофенил-N,N'-диацетил-β-D-хитобиозу. Помимо этого, ферменты гидролизировали кристаллический хитин, но не проявляли N-ацетилглюкозаминидазной активности. Скорость гидролиза п-нф-триацетилхитотриозы была примерно на порядок ниже, чем п-нф-диацетилхитобиозы. Таким образом, основным объектом действия хитиназного комплекса *Bacillus sp. 739* являлась N,N'-диацетил-β-D-хитобиоза, что позволяет считать его основным компонентом хитобиозидазу, фермент с экзо-механизмом действия. Большинство изученных бактериальных хитиназ являются именно хитобиозидазами. О механизме действия исследуемых образцов свидетельствует и то, что они воздействуют на кристаллический хитин, расщеплять который способны только экзо-хитиназы. Динамика гидролиза коллоидного хитина наиболее активным препаратом очищенной хитиназы сохраняет линейный характер

в течение довольно долгого времени инкубации, что также свойственно только экзо-хитиназам.

6.4 Антагонистическая активность хитиназы *Bacillus sp.* 739

Антагонизм бактерий к фитопатогенным грибам многие исследователи связывают с их способностью синтезировать хитиназу. Для выяснения роли хитинолитических ферментов в проявлении антагонизма бацилл к мицелиальным грибам нами была проведена серия экспериментов, включающих биологические и биохимические тесты. В работе использовали препараты хитиназы *Bacillus sp.* 739 различной степени очистки.

В биологических тестах на проявление способности препаратов хитиназы ингибировать рост мицелиальных грибов методом лунок было показано, что увеличение концентрации сырого препарата фермента приводит к увеличению зон ингибирования (табл. 15). Термическая инактивация фермента приводила к полной потере антагонистической активности. Фракция белков, не имевшая аффинного сродства к хитину, не проявила антагонистической активности. Напротив, активность аффинноочищенного препарата возросла по сравнению с исходным, хотя его активность была ниже. Более того, эта активность сохранялась и после 7 суток инкубации. Казалось бы, что все эти данные свидетельствуют о несомненной связи хитинолитической активности с проявлением антагонизма.

Таблица 15.
Антигрибная активность препаратов хитиназы *Bacillus sp.* 739

Тестируемый препарат хитиназы	Диаметр зон подавления, мм*				
	<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>B. sorokiniana</i>	<i>Alt. alternata</i>
1. Сырой препарат, 0,169 ед.	7,0/0,0	8,0/0,0	8,0/0,0	6,0/0,0	6,0/0,0
2. Сырой препарат, 0,339 ед.	10,0/0,0	12,0/8,0	10,0/8,0	9,0/0,0	12,0/0,0
3. Термоинактивированный сырой препарат, 0,000 ед.	0	0	0	0	0
4. Несорбирующаяся на хитине белковая фракция, 0,010 ед.	0	0	0	0	0
5. Аффинноочищенный препарат, 0,087 ед.	22,0/14,0	17,0/13,0	14,0/10,0	24,0/21,0	14,0/14,0

* Диаметр зон на 3-и / 7-е сутки инкубации

Однако, следует критически подойти к этим результатам. Термоинактивация может свидетельствовать о лабильности антибиотических веществ, которые очевидно присутствуют в сыром ферментном препарате. Далее, аффинноочищенный препарат содержал продукты гидролиза хитина, которые, как известно, обладают широким кругом биологической активности, в том числе и фунгицидной (Максимов и др., 1997, Кривцов и др., 1996). В связи с этим мы провели дополнительные сравнительные эксперименты с использованием высокоочищенного ферментного препарата, не содержащего продуктов гидролиза хитина и сульфат-аммонийных фракций, полученных после культивирования *Bacillus sp. 739* как на среде с хитином, так и на среде с крахмалом (табл.16).

Как следует из представленных данных, способностью подавлять развитие грибов обладал только сырой препарат хитиназы. Вокруг лунок с высокоочищенным препаратом хитиназы, сопоставимой активности, ингибирования роста грибов не обнаружено. В сульфат-аммонийной фракции белков, выделенной из культуральной жидкости *Bacillus sp. 739*, также не выявлено антагонистической активности, что может быть следствием утраты способности культуры синтезировать вещества антибиотической природы при длительной адаптации к одному источнику углерода.

Таблица 16.

Антагонистическая активность препаратов хитиназы *Bacillus sp. 739*

Тест-объект	Диаметр зон ингибирования роста грибов, мм		
	Сырой препарат, 0,160 ед.	Высокоочищенный препарат, 0,138 ед.	Сульфат-аммонийная фракция (рост на крахмале), 0,0 ед.
<i>F. solani</i>	7,0±0,5	0	0
<i>F. oxysporum</i>	8,0±0,5	0	0
<i>F. culmorum</i>	8,0±0,5	0	0
<i>B. sorokiniana</i>	6,0±0,5	0	0
<i>Alt. alternata</i>	6,0±0,5	0	0

Таким образом, результаты данной серии экспериментов свидетельствуют, что проявление антагонизма культуры *Bacillus sp. 739* не связано напрямую с действием хитиназ. Вместе с тем, нельзя отвергать роли хитиназ в антагонистических отношениях бацилл к микромицетам в целом. Результаты ряда работ свидетельствуют, что этот фермент способен усиливать действие антибиотиков и других метаболитов (Joosten et al., 1995; Nielsen & Sorensen, 1997). Вполне возможно, что такое проявление корпоративного действия антибиотических веществ и фермента наблюдалось и в нашем случае, о чем свидетельствует отсутствие ингибирования грибов сульфат-аммонийной фракцией культуры, выращенной на крахмале (табл.

16.) и, наоборот, подавление роста сырым препаратом хитиназы. Можно было бы предположить, что исследуемый фермент вообще не имеет антигрибной активности. Однако микроскопические исследования влияния ферментных препаратов различной степени очистки свидетельствуют об участии фермента в деструкции клеточной оболочки спор и мицелия грибов. При инкубации нативного мицелия тестируемых грибов с препаратами ферментов происходила визуально наблюдаемая деградация наружной и внутриклеточной структуры. Наблюдались такие явления, как вакуолизация мицелия и лизис гиф. Наиболее яркое проявление литического действия хитиназы на мицелий было отмечено для грибов рода *Fusarium* (рис.20).

Действие сырого и частично очищенного препаратов хитиназы имело во многом сходный характер и различалось лишь по степени деградации. Безусловно, что лизис гиф не может происходить без участия хитиназы.

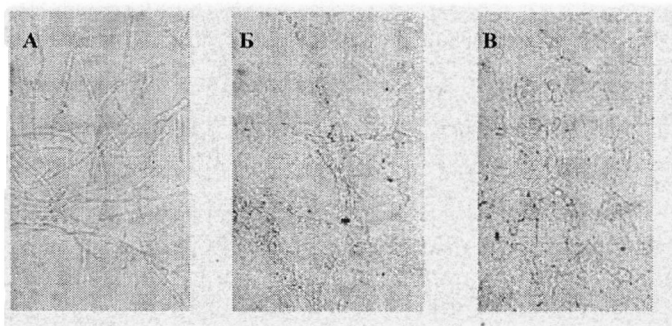


Рис. 20. Литическое действие хитиназы *Bacillus sp. 739* на мицелий *Fusarium solani*. 24 часа инкубации при 20°C. Световая микроскопия. x 400.

А - контроль; Б - сырой препарат; В - очищенный фермент.

Об участии фермента в процессе деградации мицелия можно судить по образованию редуцирующих сахаров.

Для доказательства ферментативной природы разрушения грибных клеточных стенок проводили инкубацию живого мицелия в растворах препаратов хитиназы *Bacillus sp. 739* и отслеживали динамику накопления редуцирующих сахаров (рис.21). Как следует из представленных данных, в результате инкубации нативного мицелия *F. solani* и *A. alternata*, при 37°C с ферментным препаратом, происходит накопление редуцирующих сахаров в реакционной смеси.

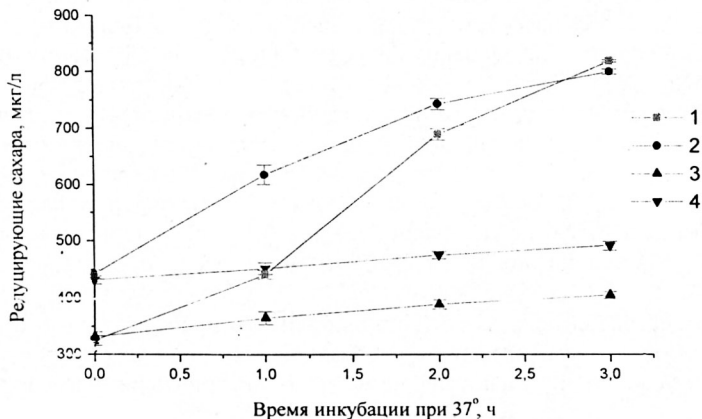


Рис. 21. Образование редуцирующих сахаров при действии препарата хитиназы *Bacillus sp.* 739 на мицелий *Fusarium solani* и *Alternaria alternata*. Температура 37°C. Обозначения: 1, 3 - *Fusarium solani*, опыт и контроль; 2, 4 - *Alternaria alternata* (контроль и опыт). Содержание хитиназы - 0,510 ед/мл инкубационной смеси (0,05 М фосфатно-цитратный буфер, pH 6,0).

Таким образом, как визуальные, так и биохимические тесты подтверждают участие хитиназы в процессе деградации клеточных стенок мицелиальных грибов. Вместе с тем, очевидно, что для проявления антагонистических свойств бацилл к микромицетам, признака образования экстрацеллюлярных хитиназ недостаточно. Высокоочищенный фермент не подавляет роста грибов. Это, в целом, согласуется с данными о весьма слабой антигрибной активности многих бактериальных хитиназ (Joosten et al., 1995, Lorito et al., 1993, 1994). Причина этого состоит очевидно в преобладании у бактерий хитиназ экзо-типа (Roberts, Selitrennikoff, 1988). Для известного грибного антагониста *Trichoderma viride* было показано, что эндохитиназа по ингибирующему эффекту в 2-3 раза превосходит хитобиозидазу (Lorito et al., 1993). По видимому, антагонистическая активность препаратов неочищенной хитиназы *Bacillus sp.* 739 обусловлена присутствием низкомолекулярных соединений антибиотической природы. Безусловно, фунгицидное действие подобных соединений усиливается комплексом литических ферментов.

ВЫВОДЫ

1. Из почвенных образцов Республики Башкортостан выделены, идентифицированы и охарактеризованы изоляты почвенных бактерий рода *Bacillus*, - антагонистов фитопатогенных грибов. Установлено, что в почвах Башкирского региона среди аэробных спорообразующих бактерий преобладают виды *B.subtilis* и *B.polymyxa*. Коллекция антагонистов положена в основу создаваемой в Институте биологии УНЦ РАН региональной коллекции микроорганизмов.

2. Установлено, что среди грибов, принадлежащих к роду *Fusarium*, наиболее устойчивы к действию бацилл-антагонистов виды *F.culmorum*, *F.graminearum*, *F.sporotrichiella*- возбудители фузариоза колоса.

3. Выявлены видовые различия в проявлении антигрибного действия бацилл. Метаболиты бактерий группы *B.subtilis* вызывают образование сферопластов на кончиках грибных гиф и последующий лизис, а группы *B.polymyxa* - нарушения строения цитоскелета.

4. Установлено, что при бактеризации семян пшеницы бактериями рода *Bacillus* колонизация поверхности прорастающего семени и формирующихся корней осуществляется путем образования микроколоний, состоящих из нескольких бактериальных клеток. Микроколонии связаны с эпидермальным слоем слизистым материалом, подобным гликокаликсу. Отдельные клетки развивающихся бактерий проникают в утолщенную часть семенной кожуры и каллеоризу и выступают как слабые патогены. По характеру заселения корневой системы растений пшеницы существуют видовые различия. Для *B.subtilis* и *B.polymyxa* характерно распространение клеток по всей корневой системе, включая молодые фрагменты в апикальной части корня. *Bacillus* sp.739 заселяет корневую систему в зоне радиусом не более 10 см от основания корня.

5. Установлено влияние внешних факторов на численность интродуцированных бацилл-антагонистов в ризосфере. Плотность популяции интродуцированных бактерий в ризосфере не зависит от уровня влажности почвы, но в значительной мере определяется температурой.

6. В процессе онтогенеза растений численность популяций интродуцированных бацилл-антагонистов в ризосфере инокулированных растений не постоянна и не превышает 0,2 % от общего количества ризосферных бактерий. Максимальная численность отмечается в начальные периоды развития растений.

7. Интродукция бацилл-антагонистов в ризосферу сопровождается увеличением супрессивности прикорневой зоны почвы и не вызывает отрицательного влияния на аборигенную микрофлору и ее метаболическую активность (нитрогеназная активность, дыхание почвы). При бактеризации семян пшеницы бациллами-антагонистами эффективное подавление развития корневых гнилей происходит в раннем периоде вегетации растений, до наступления стадии выхода в трубку или цветения.

8. Впервые установлено явление индукции защитных реакций растений пшеницы к аэрогенным инфекциям, вызываемых предпосевной бактериализацией семян бациллами-антагонистами.

9. Применение биопрепаратов на основе бацилл-антагонистов способствует значительному повышению продуктивности сельскохозяйственных растений. Препарат Бациспектин БМ (на основе штамма *Bacillus* sp.739) по эффективности действия не уступает таким химическим протравителям как Байтан, Фундазол и ТМТД. Биопрепарат совместим с фунгицидом Байтан.

10. Предпосевная обработка семян бациллами-антагонистами вызывает изменение фитогормонального статуса растений, вызывая значительное повышение содержания ауксинов (I_2I_4K) и цитокининов.

11. Впервые у бактерий рода *Bacillus* обнаружена способность синтезировать растительные гормоны группы цитокининов. Выделен штамм *B. subtilis* ИБ-22 - суперпродуцент цитокинина. Выявлена новая форма биологически активных цитокининов, представляющая собой нековалентный комплекс гормонов с полисахаридом. Цитокинины в макромолекулярном комплексе, главным образом, представлены рибозидом зеатина и нуклеотидом зеатина. В состав минорных компонентов входят изопентениладенин и изопентениладенозин.

12. Обнаружена способность ряда бацилл-антагонистов продуцировать комплекс миколитических ферментов, включающих хитиназу (КФ. 3.2.1.14), β -1,3-глюканазу (КФ 3.2.1.6) и хитозаназу (КФ. 3.2.1.132).

13. Охарактеризована новая бактериальная хитиназа *Bacillus* sp. 739, относящаяся по механизму действия к экзо-хитиназе (хитобиозидазе). Фермент имеет оптимум pH, равный 6,0, стабилен в диапазоне pH от 4,0 до 9,0. Температурный профиль активности препарата характеризуется двумя пиками, соответствующими 50°C и 65°C.

14. Установлено, что высокоочищенный препарат хитиназы *Bacillus* sp. 739, в отличие от сырого препарата, не угнетает развития фитопатогенных грибов *in vitro*, и не проявляет ингибирующего действия на процессы прорастания спор, удлинения ростовых трубок и скорости радиального роста грибов. Обнаружена способность высокоочищенного препарата хитиназы лизировать нативный мицелий грибов с освобождением редуцирующих сахаров. Проявление антагонизма хитинолитических бактерий к фитопатогенным грибам обусловлено совместным действием низкомолекулярных антибиотических веществ и комплекса литических ферментов, продуцируемых бактериальной клеткой.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Толстиков Г.А., Джемилев У.М., Муринов Ю.И., Конкина И.Г., Ямалеев А.М., Сахипов Н.Р., Мелентьев А.И., Селимов Ф.А., Хафизов В.Р., Давыдова В.А. Способ борьбы с корневой гнилью пшеницы: А. с. СССР 1509013.-1989, Бюл. N 35.
2. Мелентьев А.И., Еркеев А.М. Изучение антагонизма между почвенными бациллами и микромицетами рода *Fusarium* Lk:FR.// Микробиол. журн.. -1990. -Т.52, N 1.-С.53-56.
3. Мелентьев А.И., Кочемасова А.П., Галимзянова Н.Ф. Использование микроорганизмов для защиты сельскохозяйственных растений от болезней // Актуальные вопросы биотехнологии.-Уфа, 1990.-С.4-12.
4. Мелентьев А.И. Видсвой состав и активность бацилл-антагонистов из выщелоченных черноземов Башкирии. // II Симпозиум стран -членов СЭВ по микробным пестицидам.- М, 1990.-С.7.
5. Кудоярова Г.Р., Мелентьев А.И., Бойко Т.Ф., Фархутдинов Р.Г. Продукция цитокининов бациллами-антагонистами почвенных фитопатогенов // II Симпозиум стран -членов СЭВ по микробным пестицидам.-М, 1990.-С.39.
6. Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю., Галимзянова Н.Ф. Колонизирующая активность интродуцированных бацилл-антагонистов в ризосфере яровой пшеницы // Микробиология в сельском хозяйстве: Тез.докл.-Кишинев:Штиинца,1991.-С.28.
7. Мелентьев А.И., Камалетдинова Р.Н., Яхин И.А., Хасанов Р.А. Опыт применения бацилл-антагонистов как агентов биоконтроля болезней злаковых культур // Достижения биотехнологии - агропромышленному комплексу: Тез.докл.-Черновцы: Изд-во ЧГУ,1991.С.118.
8. Мелентьев А.И., Вялых А.К. Индукция устойчивости к ржавчине у ячменя и пшеницы, вызываемая препаратом Бациспесин БМ // Микробиология охраны биосферы в регионах Урала и Северного Прикаспия: Тез.докл. -Оренбург,1991.-С.23-24.
9. Мелентьев А.И., Галимзянова Н.Ф., Кузьмина Л.Ю., Гильванова Е.А. Изучение способности бацилл-антагонистов к колонизации корней пшеницы // Микробиология охраны биосферы в регионах Урала и Северного Прикаспия: Тез.докл.- Оренбург,1991.-С.24 - 25.
10. Кудоярова Г.Р., Мелентьев А.И., Юсупов А.А., Иванов И.И., Веселов С.Ю. Образование фитогормонов некоторыми почвенными бациллами, антагонистами фитопатогенных грибов // Основные направления биотехнологии в решении народнохозяйственных задач: Сб.статей.- Уфа, 1991.- С.57 -66.
11. Усанов Н.Г., Логинов О.Н., Мелентьев А.И. Способ выделения бактерий *Bacillus macerans* из почвы: А. с. СССР 1703681.- 1992, Бюл. N 1.
12. Мелентьев А.И. Усанов Н.Г., Логинов О.Н. Штамм бактерий *Bacillus* sp.739 для получения препаратов против грибных возбудителей болезней злаковых культур: Пат. РФ N 1743019.

13. Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю. Влияние температуры и влажности на заселение ризосферы пшеницы интродуцированными бациллами-антагонистами // Микроорганизмы в сельском хозяйстве: Тез. докл. IV Всес. науч. конф. - Пушино, 1992. - С. 132.

14. Мелентьев А.И., Яхин И.А., Камалетдинова Р.Н., Исаев Р.Ф., Хасанов Р.А., Вахитов В.А. Эффективность Бациспецина БМ против болезней зерновых культур // Новые средства и методы защиты растений: Сб. науч. тр. Уфа: БНЦ УрО РАН, 1992. - С. 93 - 99.

15. Иванова Т.Н., Веселов С.Ю., Мелентьев А.И. Влияние некоторых почвенных бацилл-антагонистов фитопатогенов на содержание эндогенных гормонов и урожайность растений пшеницы // Регуляторы роста и развития растений: Тез. докл. II конф. - М., 1993. - С. 28.

16. Морозов Ю.М., Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю. Ультраструктура клеток пшеницы при развитии бактерий *Bacillus* spp.- активного начала бактериального инокулянта Бациспецин БМ // Физиология растений. - 1994. - Т. 41, N 1. - С. 36 - 43.

17. Андросон Р.К., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И. Микробиологические процессы в ризосфере яровой пшеницы при обработке семян штаммами бацилл-антагонистов почвенных фитопатогенов // Сельско-хозяйственная биология. - 1994. - N 5. - С. 91-95.

18. Кузьмина Л.Ю., Гильванова Е.А., Мелентьев А.И. Распространение интродуцированных бацилл-антагонистов в ризосфере пшеницы // Интродукция микроорганизмов в окружающую среду: Тез. докл. М., 1994. - С. 56-57.

19. Алексеева Т.П., Вялых А.К., Мелентьев А.И., Ваганова О.Ф., Касьяненко А.Г. Изучение эффективности применения Бациспецина и его штаммов против болезней пшеницы // Вопросы биотехнологии. Уфа: БГУ, 1995. - С. 47-52.

20. Иванова Т.Н., Мелентьев А.И., Веселов С.Ю. Использование иммунологических подходов для скрининга микроорганизмов-продуцентов цитокининов // Науч. конф. по программе "Университеты России": Тез. докл. - Уфа: Изд-во БГУ, 1995. - С. 78-80.

21. Мелентьев А.И., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф. Влияние инокуляции семян пшеницы бациллами-антагонистами на продуктивность растений и устойчивость к грибным патогенам // Биология почв антропогенных ландшафтов: Тез. докл. науч. конф., г. Днепропетровск, 15-17 окт., 1991г., - Днепропетровск: ДГУ, 1995. - С. 105.

22. Бойко Т.Ф., Андросон Р.К., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И. Микробиологическая активность и супрессивность почвы в прикорневой зоне растений пшеницы, инокулированных бациллами-антагонистами // Биология почв антропогенных ландшафтов: Тез. докл. науч. конф., г. Днепропетровск, 15-17 окт., 1991г. - Днепропетровск: ДГУ, 1995. - С. 126-127.

23. Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю., Морозов Ю.М. Колонизация корней пшеницы некоторыми агентами биоконтроля болезней, принадлежащими к роду *Bacillus* // Международная конф. "Микробное разнообразие:

состояние, стратегия сохранения, экологические проблемы": Тез. докл., - Пермь, Россия, 1996. -С.68. Melentjev A.I., Kuzmina L.Y., Morozov Y.M. Colonization of wheat root by some agents of biocontrol of diseases belonging to the genus *Bacillus* // Microbial diversity: current situation, conser and ecological aspects.: Proceedings of the Int. Conf., 8-11 Oct., 1996, Perm/ Institute of E Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences .- Perm, 1996. -P.203.

24. Мелентьев А.И., Исаев Р.Ф. Возможность биологической защиты яровой пшеницы от *Tilletia caries* (DC.) Tul. путем инокуляции семян некоторыми почвенными бациллами // Там же. - С.67. Melentjev A.I., Isaev R.F. Possible biological protection of spring wheat from *Tilletia caries* (DC.) Tul. using seed inoculations .with some soil bacilli // (In the same edition) .-P. 202.

25. Актуганов Г.Э., Исаев Р.Ф., Мелентьев А.И., Ямалеев А.М. Эффективность хитиноподобных бактерий рода *Bacillus* в подавлении фитопатогенов картофеля // Там же.- С.11. Aktuganov G.E., Isaev R.F., Melentjev A.I., Yamaleev A.M. The efficiency of chitinolytic bacteria of the genus *Bacillus* to protect Phytophthora infection on potato // (In the same edition).-P. 148.

26. Кашаева С.Р., Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю., Влияние инокуляции гороха клубеньковыми и ризосферными бактериями на азотфиксирующую активность и устойчивость к корневым гнилям // Тез. докл. Всерос.съезда по защите растений.- С.-Петербург, 1995. -С.320-321.

27. Веселов С.Ю., Мелентьев А.И. Высокомолекулярные конъюгаты цитокининов, продуцируемые ризосферными бактериями // Второй съезд биохимического общества РАН :Тез. стендовых сообщений.- Пушкино, 1997.- Ч.1.-С.103.

28. Веселов С.Ю., Иванова Т.Н., Симонов М.В., Мелентьев А.И. Исследование цитокининов, продуцируемых ризосферными микроорганизмами // Прикл. биохимия и микробиология. -1998. -Т.34, N2. -С. 175-179.

29. Veselov S., Ivanova T., Symonyan M., Melentiev A., Kudoyarova G. Immunoassay of cytokinins produced by rhizosphere microorganisms// Proceedings of the 5-th symposium of the International Society of Root Research. Kluwer Academic Publishers, 1998. -P.641-649.

30. Ибрагимов Р.И., Мелентьев А.И. Агглютинирующая активность и углеводная специфичность ингибитора трипсина из семян пшеницы // Междунар. школа "Проблемы теоретической биофизики": -Тез. докл. М.: МГУ,1998.-С.129.

31. Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И. Конструирование жидких питательных сред для продуцентов рода *Bacillus* на основе мицелия и плодовых тел некоторых высших грибов // Материалы Международ. конф. "Молекулярная генетика и биотехнология".- Минск, 1998. -С.136-137.

32. Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э. Хитиназа *Bacillus* sp.739 и ее роль в биологическом контроле фитопатогенов // Материалы Международной конф. "Молекулярная генетика и биотехнология".- Минск, 1998. -С.228-230.

33. Кузьмина Л.Ю., Мелентьев А.И. Колонизация ризосферы пшеницы бактериями-антагонистами рода *Bacillus* Cohn // Тез. Респ. конф. "И.П.Павлов и современные проблемы биологии и медицины", Уфа, УГНТУ 29 октября 1999 г.-Уфа:-УГНТУ, 1999.- С.

✓ 34. Мелентьев А.И., Галимзянова Н.Ф. Влияние метаболитов бацилл-антагонистов на прорастание спор и развитие возбудителей обыкновенной корневой гнили // Прикл. биохимия и микробиол. -1999.-Т.35 , N3 . -С.353-357.

✓ 35. Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э. Выделение, очистка и характеристика хитиназы *Bacillus* sp. 739 // Прикл. биохимия и микробиология.-1999. – Т. 35, N 6. – С. 624-628.

36. Кузьмина Л.Ю., Мелентьев А.И. Влияние интродукции бацилл-антагонистов на численность почвенных бактерий в прикорневой зоне пшеницы // Тезисы докл. III съезда Докучаевского общества почвоведов (11-15 июля 2000г., Суздаль). -М.: Почвенный институт им. В.В.Докучаева РАСХН, 2000. -Кн.2. -С.31-32.

✓ 37. Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю., Галимзянова Н.Ф. Влияние температуры и влажности почвы на колонизацию ризосферы пшеницы бактериями *Bacillus* Cohn., антагонистами фитопатогенов // Микробиология.-2000.-Т.69 , N3. -С. 426-432.

861-13, 12.01

МЕЛЕНТЬЕВ АЛЕКСАНДР ИВАНОВИЧ

**АЭРОБНЫЕ СПОРООБРАЗУЮЩИЕ БАКТЕРИИ
РОДА *VACILLUS* Cohn. КАК АГЕНТЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО
КОНТРОЛЯ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ**

Специальность: 03.00.07 – микробиология
03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Тираж 100. Заказ № 96.

450000, г.Уфа, ул.Октябрьской революции, 3а
Отпечатано в типографии БГПУ
Лиц. на полигр. деят. Б № 848076 от 11.09.96 г

2-00