

УДК 579.64

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ АССОЦИИИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ С ДРОЖЖАМИ
В ОТНОШЕНИИ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ****В.С. Ржевская, Л.М. Теплицкая, Е.Ф. Семенова***Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия*

Защита растений от болезней определяет стабильность сельскохозяйственного производства. Нерациональное применение агрономических приемов привело к формированию устойчивых рас возбудителей болезней, уменьшению численности практически всех эколого-трофических групп микроорганизмов и снижению биологической активности почв. Вследствие подавления автохтонной полезной микрофлоры увеличилась численность фитопатогенных видов, процесс саморегуляции и самоочищения почвы нарушен [5].

Известно, что в основе высокой антагонистической активности молочнокислых бактерий лежит генетически детерминированная способность к продукции антимикробных веществ, что позволяет им конкурировать с другими продуцентами антибиотиков. Молочнокислые бактерии, находясь в симбиотических отношениях между собой или с другими группами микроорганизмов, образуют ассоциации, которые могут обладать новыми и уникальными свойствами, в частности, антифунгальными.

Целью нашей работы является сравнение антагонистической активности молочнокислых бактерий, составленной из них и дрожжей *Pichia accidentalis* F7/20 микробной ассоциации по отношению к фитопатогенным микромицетам. Объектами исследования служили чистые культуры молочнокислых гомоферментативных стрептобактерий рода *Lactobacillus* (*L. casei* В 2/20 и *L. plantarum* В 1/20), молочнокислого гомоферментативного стрептококка *Lactococcus lactis* В 3/20 и их ассоциативная культура с дрожжами *Pichia accidentalis* F7/20. В качестве тест-культур использовали выделенные из почвы изоляты следующих видов фитопатогенных грибов: *Fusarium moniliforme*, *F. sulphureum*, *Alternaria alternata*, *Stachybotrys alternans*. Изучение антагонистической активности по отношению к микромицетам проводили методом агаровых блоков с отсроченным антагонизмом [1], при температуре 24 °С. Зоны отсутствия (подавления или ингибирования) роста тест-культуры рассматривали как проявление фунгицидного действия, а отклонения в развитии мицелия (задержка развития) по сравнению с контролем свидетельствовала о фунгистатическом действии [1]. Химический анализ биологически активных соединений в культуральной жидкости микробной ассоциации был проведен в Испытательном центре по контролю качества пищевой продукции "Магарач" методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и газовой хроматографии.

Результаты проведенного нами исследования показали, что по отношению к *F. moniliforme* штаммы *L. plantarum* В 1/20 и *L. casei* В 2/20 не обладают антагонистической активностью (рис. 1, табл. 1). Штамм *L. lactis* В 3/20 (рис. 1в) вызывал ингибирование роста фитопатогенного гриба в зоне до 13±0,2 мм. Ассоциация микроорганизмов образовывала зону подавления 25±0,5 мм (рис. 1г). В контрольном варианте по всей чашки Петри наблюдался рост мицелия, вплоть до блока (1д).



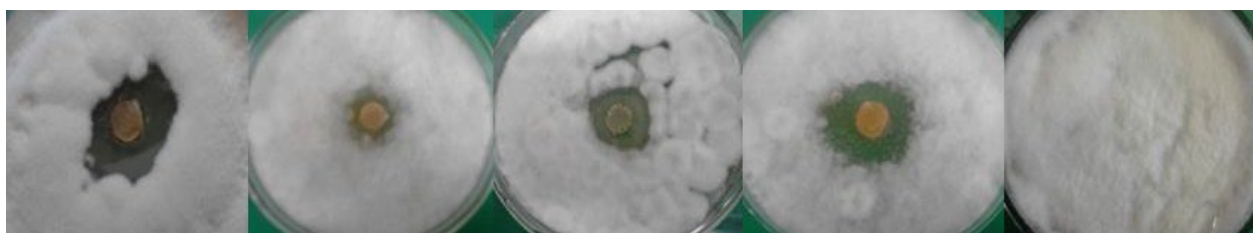
Рисунок 1. Антагонистическая активность штаммов молочнокислых бактерий и ассоциативной культуры по отношению к *F. moniliforme*: а – *L. casei* В 2/20, б – *L. plantarum* В 1/20, в – *L. lactis* В 3/20, г – микробная ассоциация, д – контроль

Таблица 1 Антагонистическая активность молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к *Fusarium moniliforme*

Культура	Диаметр зоны отсутствия роста или задержки развития мицелия, мм	
	фунгицидная активность	фунгистатическая активность
<i>L. casei</i> В 2/20	0	0
<i>L. plantarum</i> В 1/20	0	0
<i>L. lactis</i> В 3/20	13±0,2	0
микробная ассоциация	25±0,5	0

Таблица 2 Антагонистическая активность молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к *Fusarium sulphureum*

Культура	Диаметр зоны отсутствия роста или задержки развития мицелия, мм	
	фунгицидная активность	фунгистатическая активность
<i>L. casei</i> В 2/20	20±2,5	0
<i>L. plantarum</i> В 1/20	13±1	0
<i>L. lactis</i> В 3/20	18±1	0
микробная ассоциация	28±1,5	0



а б в г

Рисунок 2. Антагонистическая активность молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к *F. sulphureum*: а – *L. casei* В 2/20, б – *L. plantarum* В 1/20, в – *L. lactis* В 3/20, г – микробная ассоциация, д – контроль

Таким образом, изучаемая ассоциация микроорганизмов по отношению к *F. moniliforme* обладает фунгицидной активностью, обусловленной преимущественно метаболитами *L. lactis* В 3/20 (табл. 5), и не оказывает микостатического эффекта.

Штаммы *L. casei* В 2/20 и *L. plantarum* В 1/20 по отношению к *F. sulphureum* обладали антагонистической активностью и образовывали зону подавления роста микромицета 20±2,5 мм и 13±1 мм соответственно. Штамм *L. lactis* 3/20 подавлял рост *F. sulphureum* в зоне 18±1 мм. В контрольном варианте по всей чашки Петри наблюдался рост мицелия, в том числе и на блоке (2д).

Микробная ассоциация по сравнению с культурами молочнокислых бактерий образовывала наибольшую зону подавления роста *F. sulphureum* – 28±1,5 мм. Следовательно, фунгицидная активность микробной ассоциации превышает таковую у монокультур молочнокислых бактерий. Таким образом, микробная ассоциация в условиях проведенного эксперимента обладала высокой фунгицидной активностью (>20 мм) по отношению к фитопатогенному грибу *F. sulphureum*, и не оказывала на него микостатического эффекта.

Рост гриба *Alternaria alternata* штаммы *L. casei* В 2/20 и *L. lactis* В 3/20 подавляли в зоне 15±2 и 16±2 мм, соответственно (рис. 3а, б), нарушений в развитии гриба не отмечено (табл. 3). Штамм *L. plantarum* В 1/20 не оказывал влияния ни на рост, ни на развитие гриба. Микробная ассоциация образовывала зону отсутствия роста *A. alternata* 18±1 мм (рис. 3в). В контрольной чашке Петри вся агаровая пластинка была покрыта спороносящим мицелием.

Таким образом, микробная ассоциация обладала фунгицидной активностью по отношению к *Alternaria alternata* и не оказывала микостатического эффекта.

Рост *S. alternans* штаммы *L. casei* В 2/20 и *L. plantarum* В 1/20 подавляли в круге диаметром 25±1 мм и 26±2 мм, соответственно (рис. 4 а, б). В зонах 25±1 – 75±2 и 26±2 – 39±1 мм отмечен недостаточно выраженный рост грязно-белого неспорулирующего мицелия. В оставшейся части чашки Петри отмечен темный мицелий, находящийся на стадии образования органов спороношения.

Штамм *L. lactis* В 3/20 образовывал зону задержки роста микромицета диаметром 26 ± 1 мм. На остальной части чашки Петри наблюдался рост грязно-белого стерильного мицелия. Микробная ассоциация подавляла рост *S. alternans* в зоне 28 ± 1 мм. В зоне $28 \pm 1 - 65 \pm 2,5$ мм наблюдался рост стерильного грязно-белого мицелия. В зоне $65 \pm 2,5 - 90$ мм отмечен рост низкого темного мицелия с образующимися органами спороношения. В контрольном варианте по всей поверхности чашки Петри наблюдали рост спорующего мицелия.



Рисунок 3. Антагонистическая активность молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к *Alternaria alternata*: а – *L. casei* В 2/20, б – *L. plantarum* В 1/20, в – *L. lactis* В 3/20, г – микробная ассоциация, д – контроль

Таблица 3 Антагонистическая активность молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к *Alternaria alternata*

Культура	Диаметр зоны отсутствия роста или задержки развития мицелия, мм	
	фунгицидная активность	фунгистатическая активность
<i>L. casei</i> В 2/20	15 ± 2	0
<i>L. plantarum</i> В 1/20	0	0
<i>L. lactis</i> В 3/20	16 ± 2	0
микробная ассоциация	18 ± 1	0

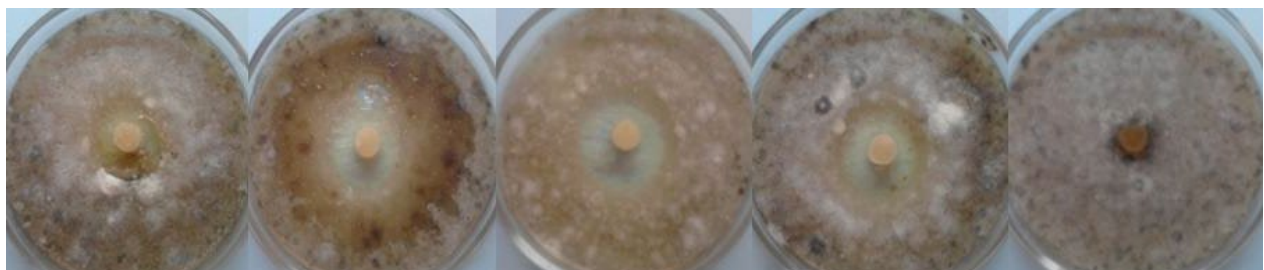


Рисунок 4. Антагонистическая активность молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к *Stachybotrys alternans*: а – *L. casei* В 2/20, б – *L. plantarum* В 1/20, в – *L. lactis* В 3/20, г – микробная ассоциация, д – контроль

Таблица 4 Антагонистическая активность молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к *Stachybotrys alternans*

Культура	Диаметр зоны отсутствия роста и задержки развития мицелия, мм	
	фунгицидная активность	фунгистатическая активность
<i>L. casei</i> В 2/20	25 ± 1	$25 \pm 1 - 75 \pm 2$
<i>L. plantarum</i> В 1/20	26 ± 2	$26 \pm 2 - 39 \pm 1$
<i>L. lactis</i> В 3/20	26 ± 1	$26 \pm 1 - 90$
микробная ассоциация	28 ± 1	$28 \pm 1 - 65 \pm 2,5$

Микробная ассоциация по отношению к *S. alternans* обладает высокой фунгицидной активностью – 28 ± 1 мм, превышающей таковую у монокультур молочнокислых бактерий, а также проявляет фунгистатическую активность.

Проведенные исследования показали, что штаммы молочнокислых бактерий обладают различной антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным микромицетам, которая проявляется в виде фунгицидного и фунгистатического эффекта. Так, *L. casei* В 2/20 проявлял низкую фунгицидную активность (зона задержки роста менее 20 мм) по отношению к *A. alternata*, высокую активность (зона задержки роста более 20 мм) в отношении *F. sulphureum* и *S. Alternans*, не обладал антагонистической активностью по отношению к *F. moniliforme*.

Штамм *L. plantarum* В 1/20 обладал высокой антагонистической активностью в отношении *S. Alternans*, не подавлял рост *A. alternata*, *F. moniliforme*, по отношению к *F. sulphureum* фунгицидная активность была менее 20 мм.

Штамм *L. lactis* В 3/20 проявлял низкую фунгицидную активность в отношении *F. moniliforme*, *F. sulphureum* и *A. alternata*, высокую фунгицидную активность в отношении *S. alternans*.

Микробная ассоциация проявила слабую фунгицидную активность в отношении *A. alternata*. А по отношению к *F. moniliforme*, *F. sulphureum*, *S. alternans* микробная ассоциация показала высокую фунгицидную активность (>20 мм). Фунгистатическую активность монокультуры молочнокислых бактерий и микробная ассоциация проявили в отношении *Stachybotrys alternans*.

Результаты проведенных исследований показали, что фунгицидная активность микробной ассоциации превышает таковую у монокультур молочнокислых бактерий. Так, в отношении *F. moniliforme* *L. casei* В 2/20 и *L. plantarum* В 1/20 не проявляли антагонистической активности. При этом зоны отсутствия роста при воздействии составили *L. lactis* В 3/20 – 17 мм, а консорциума – 25 мм. Такая же закономерность отмечена при действии микробной ассоциации на такие микромицеты, как *A. alternata*, *F. sulphureum*.

Биохимический анализ культуральной жидкости микробной ассоциации показал содержание разнообразных метаболитов, обладающих антибактериальным и антимикотическим действием (табл. 5). Дрожжи *P. accidentalis*, входящие в состав микробной ассоциации, выделяют спирты, что усиливает антибиотическое действие органических кислот – основных метаболитов лактобактерий [4]. Синергетическое действие спиртов и органических кислот приводит к более высокой антагонистической активности микробной ассоциации по сравнению с монокультурами молочнокислых бактерий.

Таблица 5 Противомикробные вещества, обнаруженные в культуральной жидкости микробной ассоциации

Вещество	Антибактериальный эффект	Антимикотический эффект	Содержание, мг/л
сквален	+	+	89,7
диметилфумарат	-	+	8,06
каприновая кислота	+	+	8,77
молочная кислота	+	-	1030,0

Помимо антибиотических свойств метаболитов микробной ассоциации, продукты обмена веществ молочнокислых бактерий и дрожжей стимулируют развитие друг друга. Так, молочнокислые бактерии выделяют органические кислоты, которые создают кислую среду, благоприятную для развития дрожжей. Кроме того, органические кислоты служат источником углеродного питания дрожжевых клеток. В свою очередь, дрожжи стимулируют рост молочнокислых бактерий, устраняя избыток молочной кислоты и обогащая субстрат витаминами. Отмирающие клетки дрожжей содержат много белков, являющихся хорошим источником азота для бактерий [3].

Таким образом, увеличение зоны подавления тест – организма ассоциацией микроорганизмов по сравнению с действием монокультур, свидетельствует о том, что взаимоотношения микроорганизмов образованной ассоциации можно охарактеризовать как синергизм. Явление синергизма, позволяющее молочнокислым бактериям и дрожжам успешно конкурировать с микромицетами за источники питания в естественной среде обитания, позволяет использовать его при разработке микробиологических препаратов, направленных на защиту растений от фитопатогенных микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлена фунгицидная и фунгистатическая активность монокультур молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к фитопатогенным грибам.

Показано, что эффективность подавления фитопатогенов выше у микробной ассоциации, по сравнению с монокультурами лактобактерий.

Определено наличие в культуральной жидкости веществ, обладающих антибактериальными и антимикотическими свойствами: сквален, диметилфумарат, каприновая кислота, молочная кислота.

ЛИТЕРАТУРА

- Зенова, Г.М. Практикум по биологии почв / Г.М. Зенова, А.Л. Степанов, А.А. Лихачев, Н.А. Манучарова. М.: Изд-во МГУ, 2002. – 120 с.
- Куприянов, А.А. Перемещение бактерий из экскрементов животных в почву и сопряженные с ней местообитания / А.А. Куприянов, Н.Н. Куненкова, А.Х.К. Ван Бругген, А.М. Семенов // Почвоведение, 2009. – № 11. – С. 1354–1361.
- Лысак, В.В. Микробиология: учебное пособие / В.В. Лысак. Минск: БГУ, 2007. – 426 с.
- Ратникова, И.А. Биологические основы создания пробиотиков направленного действия для медицины, сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности / Автореф. дисс. на соиск. учен. степ. докт. биол. наук. Алматы, 2010. – 43 с.
- Solomon, E.B. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization / E.B. Solomon, S. Yaron, K.R. Matthews // Appl. Environ. Microbiol., 2002. – Vol. 68. – P. 397–400.