

БИОИНОКУЛЯНТЫ НА ОСНОВЕ РИЗОСФЕРНЫХ STREPTOMYCES ДЛЯ УСТОЙЧИВОГО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

Тинатин Доолоткелдиева, Сандра Тынчтыкбек Кызы

Кыргызско-Турецкий Университет Манас, Кафедра Защиты Растений, город Бишкек, Кыргызстан

Кыргызская Республика обладает значительным потенциалом для выращивания зерновых, овощных и плодовых культур. С 2004 года в Кыргызстане производство экологически чистой продукции начинает интенсивно расти. Для успешного внедрения экологически чистого производства фермеры должны использовать методы и приемы, характерные для органического сельского хозяйства.

Микробные инокулянты и технологии могут быть использованы в свободном от химикатов сельском хозяйстве, заменяя вредные пестициды, химические удобрения биологическими средствами защиты сельскохозяйственных культур и повышения урожайности. Зарегистрировано более 22 000 биологически активных соединений микробного происхождения, из которых 7600 продуцируются актиномицетами рода *Streptomyces* [Demain and Sanchez, 2009; Bérdu, 2005; Lam, 2007]. Кроме того, 70 % всех известных антибиотиков были обнаружены у штаммов *Streptomyces* [Demain, 2010, Labeda et al., 2012].

Почвенные и ризосферные бактерии рода *Streptomyces* проявляют все больший интерес к исследователям из-за их огромного количества вторичных метаболитов: антибиотиков, витаминов, алкалоидов, факторов роста растений, ферментов и ингибиторов ферментов, применяемых в сельском хозяйстве, из-за их потенциала в биоконтроле и вклада в получении здоровой органической продукции [Copping and Menn, 2000; Adegboye and Babalola 2012; Goudjal et al. 2014; Vijayabharathi et al. 2015; Couillerot et al. 2013; Jog et al. 2016; Shrivastava and Kumar 2018; Hopwood 2007; Barka et al. 2016]. Еще одно полезное свойство актиномицетов, они играют важную роль в самоочищении почв от болезнетворных микроорганизмов, они способны дольше оставаться в почве, оказывать подавляющее действие на другие группы микроорганизмов, создавать плодородие почвы, способны солибилизировать фосфат в почвах с дефицитом фосфата.

Настоящее исследование было направлено на оценку *in vitro* и *in vivo* потенциала штаммов *Streptomyces* в отношении различных бактериальных и грибковых фитопатогенов зерновых, овощных и плодовых культур, для улучшения плодородия почвы и роста растений во время вегетации, для борьбы с проблемами, связанными с загрязнением окружающей среды и глобального потепления.

Штаммы *Streptomyces* из лабораторной коллекции отделения защиты растений, обладающие широким спектром антимикробной активности против грибковых и бактериальных фитопатогенов были использованы. Для этого исследования мы выбрали штаммы, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Происхождение и характеристики штаммов *Streptomyces*, использованных в этом исследовании

Название штамма	Место выделения	Культуральные характеристики на КАА
<i>Streptomyces diastatochromogenes</i> sk-6	Из ризосферы дикорастущего растения в долине Сон-Куль, на высоте 3200 м над уровнем моря	Образует воздушный мицелий с бело-желтоватым цветом; со специфическим запахом
<i>Streptomyces alfalfae</i> , CI-4	Из ризосферы дикорастущего растения в долине Сон-Куль, на высоте 3200 м над уровнем моря	Образует воздушный мицелий светло-зеленого цвета; со специфическим запахом
<i>Streptomyces</i> sp. Pch-3	Из почвы опытного поля сельскохозяйственного факультета КТУ "Манас"	Образует воздушный мицелий темно-серого цвета, субстратный мицелий темно-красного цвета
<i>Streptomyces mediolani</i> Pat -3	Из ризосферы дикорастущего растения в долине Сон-Куль, на высоте 3200 м над уровнем моря	Образует воздушный мицелий белого цвета, субстратный мицелий розового цвета
<i>Streptomyces lividans</i> TR-59	Из почвы опытного поля сельскохозяйственного факультета КТУ "Манас"	Образует воздушно-сине-фиолетовый мицелий и темно-синий цвета субстратный мицелий.

Патогенные бактерии (*Erwinia carotovora*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*), выделенные из пораженных органов растений, хранились в стерилизованном питательном бульоне при – 20° С. Патогенные грибы (*Alternaria tenuissima*, *Fusarium graminearum*, *Venturia inaequalis* и *Monilia fructicola*, *Aspergillus* sp.), Выделенные из пораженных органов растений, хранились на картофельно – декстрозном агаре (PDA) при 4° С.

Жидкие образцы биопрепарата на основе *Streptomyces* sp. получали при глубинном культивировании в биореакторе (LAMBDA Laboratory Instruments, CZ, 7 л). Через 72 ч. инкубации, фильтрованный стерильный бесклеточный супернант или клетки использовали для дальнейших экспериментов.

Фосфаторастворимую активность штаммов *Streptomyces* определяли в питательной среде, содержащей в своем составе $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (NBRIP) в качестве единственного источника фосфора. В эту среду проделали лунки размером 1 см^2 и в каждую лунку выливали 1 мл супернанта штаммов *Streptomyces* и инкубировали при 30°C в течение 2 недель. Образование зоны гидролиза вокруг колоний указывало на растворимость фосфата. Среди всех протестированных штаммов два – *Streptomyces alfalfae* CI-4 и *Strep. lividans* TR-59 продемонстрировали наивысшую активность солиubilизации фосфатов, образуя прозрачный ореол вокруг лунок со суспензией, у других испытанных штаммов, прозрачного ореола не наблюдалось (рис. 1). Эти результаты показывают, что штаммы *Streptomyces* способны продуцировать органическую глюконовую кислоту в окружающую среду, которая отрицательно заряженный нерастворимый фосфат через его карбоксильную группу превращает в растворимые и доступные для растения формы.

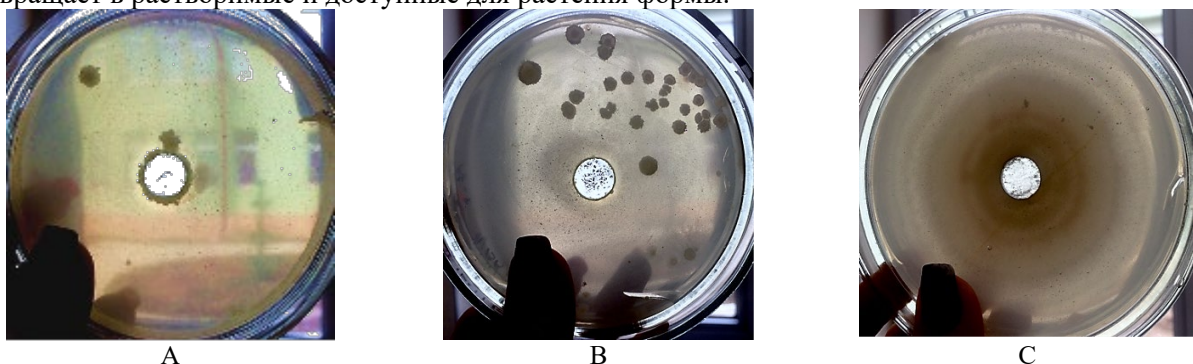


Рис. 1. Прозрачный ореол вокруг лунок штамма *Strep.alfalfae* CI-4 (a); прозрачный ореол вокруг лунок штамма *Strep.lividans* TR-59 (b) и штамм *Streptomyces wedmorensis* KK-4 не показал ореола (c)

Для определения присутствия летучих метаболитов *Streptomyces* и влияния на развитие мицелия фитопатогенных грибов без контакта использовали герметичную систему в чашках Петри с тонкой мембраной Parafilm. С одной стороны мембраны выращивали колонии штамма *Streptomyces*, с другой – фитопатогенные грибы – *Alternaria.tenuissima*, *Fusarium graminearum* и *Aspergillus* spp. Их инкубировали в такой герметичной системе в течение 3–10 дней. В контрольной системе колонии фитопатогенных грибов выращивали на среде без посева биологических агентов. После 92-часовой инкубации все протестированные штаммы *Streptomyces* подавляли рост *Fusarium graminearum*, причем возбудитель проявлял высокую чувствительность к летучим метаболитам *Streptomyces* после бесконтактного воздействия. Кроме того, штаммы *Streptomyces lividans* Tr-59 и *Streptomyces medioloni* Pat-3 показали высокую степень (90–95 %) противогрибковой активности против фитопатогенных грибов, таких как *Alternaria.tenuissima*, *Rhizoctonia solani* и *Aspergillus* spp. путем ингибирования роста грибковых колоний во время бесконтактного совместного культивирования, несмотря на то, что эти грибы способны образовывать множественные микотоксины.

Антагонистическую активность агентов биоконтроля против бактериальных патогенов изучали также путем совместного культивирования антагониста и тест-культуры в жидкой среде. Культуры *Erwinia amylovora*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* и *Ralstonia solanacearum* инкубировали в пробирках объемом 5 мл в мясопептонном бульоне в течение 48 часов. Затем в каждую пробирку добавляли 1 мл культуры-антагониста: после инкубации при 28°C в течение 24 часов содержимое пробирки анализировали и активность биоконтролирующих агентов оценивали с помощью микроскопии, а титр клеток определяли с использованием спектрофотометра UV / VIS. (Jenway, Stone, UK) при 550 нм.

В жидкой среде *Streptomyces alfalfae* штамм CI-4 проявлял высокую активность в отношении *Erwinia amylovora*. Клетки фитопатогена были полностью лизированы ферментами антагониста; на микрокартинах были видны только мицелий и гифы *Streptomyces* (фиолетовые стрелки), и не было клеток фитопатогенов (рис. 2a). Штамм *Streptomyces diastochromogenes* SK-6, также показал активное влияние на клетки фитопатогена при совместном культивировании.

Наблюдался полный лизис клеток *Erwinia amylovora* с антагонистическим эффектом *Streptomyces lividans* TR-59. *Streptomyces wedmorensis* KK-4 не продемонстрировал антагонистическое действие на возбудителя; и клетки *Erwinia amylovora* быстро размножались при совместном культивировании (рис. 2 в).

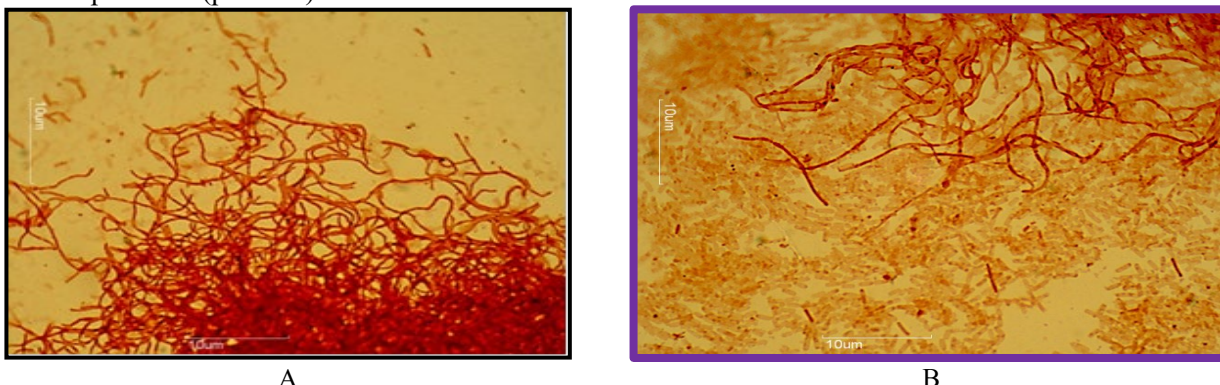


Рис. 2. (а): где в жидкой среде *Streptomyces alfalfae* CI-4 (1 мл) + *Erwinia amylovora* (5 мл) совместно культивировали, фиолетовые стрелки показывают мицелий и гифы *Streptomyces alfalfae*, CI-4; (б) где в жидкой среде совместно культивировали штамм *Streptomyces wedmorensis* KK-4 (1 мл) + *Erwinia amylovora* (5 мл)

При проверке активности штаммов *Streptomyces* в отношении возбудителя бактериального рака косточковых плодов было обнаружено, что те же самые штаммы *Streptomyces* были активными, проявляя либо антагонизм, либо гиперпаразитизм в течение 72 часов, на *Pseudomonas syringae*. Так, штаммы *Streptomyces diastatochromogenes* Sk-6, *Streptomyces mediolani* Pat -3 и *Streptomyces lividans* TR-59 показали значительный антагонистический эффект по отношению к возбудителю бактериального рака, обеспечивая подавление роста и развития колоний этой бактерии, зоны лизиса которой составляют $5,77-6,1 \pm 1,31$ мм, $5,25-5,70 \pm 1,27$ мм и $4,52-5,1 \pm 1,31$ (P ≤ 0,05) соответственно. Другие агенты биоконтроля, такие как *Streptomyces alfalfae*, CI-4 и *Streptomyces lactitubi*, Pch-3, продемонстрировали гиперпаразитарный эффект, используя колонии *Pseudomonas syringae* в качестве источника питательных веществ, растущих на клетках патогенных микроорганизмов.

Почву и рассады картофеля обрабатывали антагонистами, и их действие изучали в условиях *in vivo*. Микробные суспензии антагонистов и *R. solanacearum* доводили до концентрации 10^8 КОЕ / мл путем измерения на длине волны 585 нм (UV / VIS Spectrophotometer, JENWAY, UK, 2011). Внесение в почву, в корневую зону картофеля *Streptomyces diastatochromogenes* Sk-6 и *Streptomyces alfalfae* C1-4 в дозе 10^8 кл / мл значительно снизили заболеваемость бурой гнилью и увеличили рост картофеля. Прогрессирование заболевания было снижено на 60 % и 56 % (P ≤ 0,05) у растений, инокулированных штаммом *Streptomyces diastatochromogenes* Sk-6 и *Streptomyces alfalfae* C1-4, соответственно.

Streptomyces diastatochromogenes Sk-6 был выбран для биоконтроля мягкой бактериальной гнили, вызываемой *Erwinia carotovora* в условиях хранения картофеля. На четвертой неделе после инокуляции бактерией мягкой гнили *Erwinia carotovora* в дозе 10^6 кл/мл и обработки антагонистической бактерией *Streptomyces diastatochromogenes* Sk-6 в дозе 10^8 спор / мл у сорта Санти инфекции не наблюдалось. У сорта Пикассо признаки инфекции начали проявляться через четыре недели даже при дозе 10^8 спор / мл антагониста, а симптомы инфекции были более выраженными и наблюдались у 4,5–4,7 % клубней этого сорта в дозе антагониста 10^4 спор / мл. Контрольная группа или необработанный картофель всех сортов получил 100 % повреждение в течение четырех недель после начала эксперимента.

Streptomyces alfalfae C1-4 в качестве биоинокулянта применяли против бактериального рака косточковых деревьев, а также против бактериального ожога, парши и монилюоза семечковых деревьев, опрыскивая поверхности листьев и кроны пораженных растений, то есть биоконтрольный агент вводили в эпифитные ассоциации растений. Когда на листьях появляются признаки заболевания, двойное обильное опрыскивание пораженных растений суспензией штамма *Streptomyces* C1-4 (10^6 спор / мл) с интервалом в 7 дней предотвратило развитие заболевания. Через пятнадцать дней после того, как биологическое средство было применено дважды, растения полностью восстановились, появились новые листья и новые веточки.

Таким образом, использование биоинокулянтов *Streptomyces*, способных стимулировать рост растений, улучшать доступность питательных веществ, контролировать фитопатогены и снижать абиотический стресс у растений, является важной практикой для устойчивого сельского хозяйства, хорошей альтернативой экологически опасным химическим удобрениям и пестицидам.

ЛИТЕРАТУРА

- Adegboye, M.F., Babalola, O.O., 2012. Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *Afr J Agric Res.* 7: 2255–2261.
- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L et al. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of the Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol R.* 80:1–43.
- Bérdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites, *J. Antibiot.* 58: 1–26.
- Copping, L.G. & Menn, J.J. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag. Sci.* 56: 651–676.
- Couillerot, O., Vatsa, P., Loqman, S., Ouhdouch, Y., Jane, H., Renault, J.H, et.al. 2013. Biocontrol and biofertilizer activities of the *Streptomyces anulatus* S37: an endophytic actinomycete with biocontrol and plant-growth promoting activities. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens IOBC-WPRS Bulletin.* 86: 271–276.
- Demain A.L., Sanchez S. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress, *J. Antibiot.* 62: 5–16.
- Goudjal, Y., Toumatia, O., Yekkour, A., Sabaou, N., Mathieu, F., Zitouni, A. 2014. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiol Res.* 169: 59–65.
- Jog, R., Nareshkumar, G., Rajkumar, S. 2016. Enhancing soil health and plant growth promotion by actinomycetes. In: Subramaniam G., Arumugam S., Rajendran V. (eds) *Plant Growth Promoting Actinobacteria*. Springer, Singapore. 33–45.
- Labeda, DP, Goodfellow, M., Brown, R. et al. 2012. Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek.* 101:73–104
- Lam, K.S. 2007. New aspects of natural products in drug discovery, *Trends in Microbiol.* 15: 279–289.