

УДК 579.646 31,5173.6.086.8/35

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СРЕПТОМИЦЕТОВ ПОЧВЫ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЗОНЫ МОЛДОВЫ

С. БУРЦЕВА, Т. СЫРБУ, В. СЛАНИНА, Л. НАМОЛОВАН, С. КОДРЯНУ
Институт микробиологии и биотехнологии АНМ

Abstract. The antimicrobial properties of 17 strains of *Streptomyces*, isolated from the soils of the central zone of Moldova were investigated. There were determined the active antagonists against phytopathogenic fungi of the genera *Fusarium*, *Alternaria* and *Botrytis*.

Key words: Antimicrobial activity, Bacteria, Phytopathogenic fungi, Streptomyces, Yeasts.

ВВЕДЕНИЕ

Современные тенденции развития сельского хозяйства предполагают широкое использование микробиометодов в качестве одного из элементов интегрированных систем защиты растений. Основу биопрепаратов могут составлять микробы-антагонисты, энтомопатогены и продукты их жизнедеятельности – биологически активные метаболиты. Весьма привлекательными для разработчиков являются естественные обитатели почв – актиномицеты. Около половины известных микробных биологически активных веществ синтезируются актиномицетами, при этом на стрептомицеты приходится более 75%.

В настоящее время создано более десятка коммерческих препаратов для защиты растений на основе актиномицетов: авермектины, макротетралиды, спиносинны, пиерицидины, антимицины

и др. Тем не менее, интерес к этой группе микроорганизмов не ослабевает, т.к. для успешного применения микробного метода необходимо иметь в арсенале биопрепараты различной химической природы. В США выдан патент на новый штамм *Streptomyces* sp., названный СИМАРА, который выделен из почвы и обладал способностью подавлять рост фитопатогенных грибов *Sclerotinia sclerotiorum* - на 90%, *Alternaria phragmospora* – на 66% и других грибов (*Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*) (M. Alam et al., 2002).

Перед исследователями стоит задача не только создания новых высокопродуктивных препаратов, но по-прежнему актуален и постоянный поиск новых штаммов - активных продуцентов веществ с антимикробными свойствами (Л. Евтушенко, 2003; Л. Калакуцкий, 2004).

В работе представлены результаты экспериментов, проведенных с целью изучения антимикробных свойств стрептомицетов выделенных из почвы центральной зоны Молдовы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД

Исследование проводили в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии и биотехнологии АНМ.

17 штаммов стрептомицетов были выделены в 2005-2006 г.г. из 3 почвенных образцов центральной зоны Молдовы на кракмалоамиачном агаре.

1-й почвенный образец - чернозём карбонатный, слабогумусный (гумус 2,4- 2,5) под монокультурой – кукурузой (без удобрений);

2-й почвенный образец - чернозём типичный, мощный, тяжелосуглинистый (плантажированный) (гумус – 2,6);

3-й почвенный образец – почва бурая лесная (заповедник с. Корнешть) (гумус 6,8).

Антимикробные свойства исследуемых стрептомицетов определяли методом агаровых блоков (Н. Егоров, 1986; К. Тулемисова, Н. Чормонова, 1990). В качестве тест-культур были использованы кислотоустойчивые бактерии – *Bacillus subtilis*, грамотрицательные бактерии – *Escherichia coli*, дрожжи – *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula gracilis*, фитопатогенные бактерии – *Xanthomonas campestris*, *Corinebacterium michiganense*, *Pseudomonas fluorescens* и фитопатогенные грибы – р. *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ДИСКУССИИ

Для определения антимикробной активности были выбраны 17 штаммов из выделенных 200 стрептомицетов 3 почвенных образцов с учетом хорошего роста, споруляции, цвета воздушного и субстратного мицелия светлых тонов, отсутствием растворимых пигментов. Сравнение способности стрептомицетов задерживать рост грамотрицательной бактерии *E.coli* (таб. 2) показало, что среди представителей 1 почвенного образца есть штаммы с небольшой антимикробной активностью (15,0-17,0мм), а 2 штамма – *Streptomyces* sp. 23 и *Streptomyces* sp. 33 достаточно активны в отношении этого тест-организма (30,0 и 28,0 мм соответственно).

Из 6 штаммов 2-го почвенного образца 4 штамма не действовали на рост *E.coli*, у 2 штаммов этого же образца (*Streptomyces* sp. 89 и *Streptomyces* sp. 110) антимикробная активность была незначительной (зоны 14,0 и 13,5мм).

Только 2 штамма из 5, выделенных из почвы лесного заповедника (образец 3), отличались хорошим ростом и обладали небольшой способностью задерживать рост *E. coli* (*Streptomyces* sp. 190 и *Streptomyces* sp. 198). Их метаболиты вызывали появление зон задержки роста этой тест-культуры диаметром 14,0 и 17,0 мм.

Рост другого бактериального теста – *B. subtilis* задерживал единственный штамм – *Streptomyces* sp. 198 из группы штаммов 3-го почвенного образца (14,0 мм), а также 2 штамма (*Streptomyces* sp. 89 и *Streptomyces* sp. 110) из 2-го почвенного образца (12,5 и 14,0 мм соответственно).

Не были выявлены антагонисты к *P. fluorescens*.

Способность задерживать рост представителя фитопатогенных бактерий – *X. campestris* у изучаемых стрептомицетов была небольшой (10,0 – 16,0 мм). Среди штаммов, выделенных из 2-го почвенного образца, не удалось найти антагонистов к другому фитопатогену – *C. michiganense*. Только 2 штамма из 3-го почвенного образца задерживали рост этой бактерии (зоны 14,0 мм). Неодинаковой была антимикробная активность к фитопатогенным бактериям

у стрептомицетов 1-го почвенного образца: 1 штамм не был активен по отношению к *X. campestris*, у трёх штаммов активность была небольшой (зоны 14,0 – 18,0 мм), а у 3 штаммов она была выше других (штаммы 23; 33 и 37 – зоны 25,0; 23,0 мм и 23,0 мм соответственно) по отношению к *C. michiganense*. (таб. 2).

Таблица 2

Задержка роста бактерий и дрожжей стрептомицетами

	Номер штамма	Диаметр зон задержки роста тест - микроорганизмов, мм						
		E. coli	B. subtilis	Ps. fluorescence	X. campestris	C. miciganense	S. cerevisiae	Rh. gracillis
Почвенный образец 1	10	15,0	-	0	14,0	14,0	13,0	14,0
	14	17,0	-	0	16,0	15,0	0	15,0
	17	15,0	-	0	15,0	18,0	0	0
	23	30,0	-	0	10,0	25,0	13,0	27,0
	33	28,0	-	0	0	23,0	13,0	25,0
	37	0	-	0	10,0	23,0	14,0	0
Почвенный образец 2	56	0	0	0	0	-	-	18,0
	60	0	0	0	0	-	-	14,0
	70	0	0	0	0	-	-	16,0
	86	0	0	0	0	-	-	14,0
	89	14,0	12,5	0	16,0	-	-	15,0
	110	13,5	14,0	0	14,0	-	-	17,5
Почвенный образец 3	185	0	0	0	0	0	0	0
	190	14,0	0	0	12,0	14,0	13,0	12,0
	196	0	0	0	12,0	0	25,0	0
	197	0	0	0	10,0	0	10,0	0
	198	17,0	14,0	0	14,0	14,0	0	0

В наших опытах дрожжи были представлены 2 штаммами – пекарские дрожжи *S. cerevisiae* и каротинообразующие дрожжи *Rh. gracilis*.

Стрептомицеты 2-го почвенного образца были неактивны против *S. cerevisiae*, у 4 штаммов 1-го почвенного образца антимикробная активность была невысокой (13,0- 14,0 мм). Среди стрептомицетов, выделенных из почвы заповедника, 2 штамма не проявляли активности, 2 штамма обладали низкой активностью (зоны 10,0 – 13,0 мм), а штамм *Streptomyces sp.196* был со средней активностью (зона задержки роста *S.cerevisiae* – 25,0 мм).

Способность задерживать рост *Rh. gracilis* (таб.2) в большей степени проявлялась у стрептомицетов 1 и 2-го почвенных образцов: зоны задержки роста были диаметром 14,0 – 18,0 мм, а у 2 штаммов – *Streptomyces sp.23* и *Streptomyces sp.33* она была выше других - размеры зон достигали 27,0 и 25,0 мм соответственно.

В таблице 3 представлены результаты определения способности стрептомицетов почв Молдовы проявлять антагонистические свойства в отношении низших грибов.

Так, например, у стрептомицетов, выделенных из почвы под монокультурой (кукуруза) без внесения удобрений, способность задерживать рост *A. niger* была невысокой (16,0- 18,0 мм). Из 6 штаммов 2-го почвенного образца 3 стрептомицета были неактивны к этому грибу, 2 штамма стимулировали спорообразование (зоны стимуляции 12,0-17,0 мм), а под действием метаболитов *Streptomyces sp.86* наблюдали рост вегетативного воздушного мицелия с задержкой спорообразования по сравнению с контролем (28,0 мм). Ни один из выделенных стрептомицетов из почвы лесного заповедника практически не влиял на рост и спорообразование этого тест-гриба.

Замечены резкие отличия в способности стрептомицетов задерживать рост *Alt. alternata*. Так, 4 штамма, выделенных из почвы под монокультурой (кукуруза) вызывали полное подавление роста этого тест-микроорганизма, 1 штамм был средней активности (зоны до 25,0 мм), а другой штамм *Streptomyces sp14*- слабой активности (до 16,0 мм). 4 штамма 2-го почвенного образца не обладали способностью задерживать рост *Alt. alternata*, а у двух штаммов была замечена способность задерживать процесс образования спор (зоны 14,0 и 25,0 мм).

Задержка роста грибов стрептомицетами

Номер штамма	Диаметр зон задержки роста тест- микроорганизмов, мм						
	F. solani	F. graminearum	F. culmorum	F. nivale	A. niger	Alt. alternata	B. cinerea
10	14,0	П.п	-	-	22,0	П.п	П.п
14	14,0	24,0	-	-	11,0	16,0	17,0
17	11,0	23,0	-	-	23,0	25,0	П.п
23	0	30,0	-	-	0	П.п	22,0
33	0	30,0	-	-	0	П.п	24,0
37	14,0	25,0	-	-	25,0	П.п	24,0
56	12,0	12,0	17,0	15,0	17,0 стим	0	-
60	10,0	0	12,0	15,0	20,0 стим	0	-
70	0	0	17,0	10,0	12,0	0	-
86	0	0	15,0	0	28,0	25,0	-
89	0	0	17,0	0	0	0	-
110	10,0	0	14,0	0	0	14,0	-
185	-	18,0	13,5	14,0	12,5	15,5	10,0
190	-	15,0	14,0	12,0	12,0	19,0	0
196	-	14,0	14,0	18,0	0	18,0	12,0
197	-	13,5	14,0	11,0	0	12,0	0
198	-	14,0	14,5	18,0	11,0	17,5	15,0

Стрептомицеты, выделенные из почвы лесного заповедника, характеризовались низкой или средней антимикробной активностью – зоны задержки роста этого тест-гриба варьировали от 12,0 -15,5 мм до 17,5-19,0 мм.

Для гриба *B. cinerea* удалось найти активных антагонистов только среди стрептомицетов из почвы под монокультурой-кукурузой: штаммы *Streptomyces sp.10* и *Streptomyces sp. 17* полностью подавляли рост этого гриба. У штаммов стрептомицетов № 23, 33 и 37 активность была несколько меньшей: зоны задержки роста этого гриба составляли 22,0-24,0 мм. Штаммы 2 и 3 почвенных образцов либо не проявляли антимикробной активности, либо она была слабой.

Проведенный поиск антагонистов по отношению к возбудителям фузариозов выявил один штамм из почвы под кукурузой – *Streptomyces sp.10*, способный полностью подавлять рост *F.graminearum*. 3 других штамма из этого же почвенного образца (штаммы № 23, 33 и 37) отличались достаточно высокой антимикробной активностью к этому тест-грибу: отсутствие роста гриба было в зоне диаметром 25,0-30,0 мм. Под действием остальных актиномицетов размер зон задержки роста варьировал от 12,0 до 18,0 мм. Изучаемые стрептомицеты слабее задерживали рост таких тест-организмов, как *F. solani* и *F. nivale* (от 10,0 до 18,0 мм).

Сравнительный анализ биологической активности изучаемых стрептомицетов, выделенных из 3 почвенных образцов центральной зоны Молдовы показал, что штаммы, выделенные из чернозёма суглинистого под монокультурой кукурузой, выращиваемой без внесения удобрений, проявили высокую антимикробную активность в отношении фитопатогенных грибов – *Alt. alternata*, *B. cinerea* и *F. grameniarum*.

Найдены штаммы, способные активно задерживать рост *E.coli*: под действием штаммов *Streptomyces sp 23* и *Streptomyces sp 33* диаметр зон задержки роста этой тест-бактерии составлял 28,0-30,0 мм. Эти же штаммы обладали способностью задерживать рост фитопатогенной бактерии *C. michiganense*, каротинообразующих дрожжей *Rh. gracilis*.

ВЫВОДЫ

Проведенные исследования показали, что выделенные из почв Молдовы стрептомицеты в той или иной степени способны подавлять рост фитопатогенных грибов, бактерий и дрожжей. Наиболее активными антагонистами против фитопатогенных грибов р. *Fusarium* и р. *Alternata*

ria являются стрептомицеты, выделенные из чернозёма слабогумусного, на котором постоянно выращивают кукурузу без дополнительного внесения удобрений и гербицидов.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Alam, Mensoor; Saltiar, A.; Kumar, S. et al. Streptomyces strain with potential anti-microbial activity against phytopathogenic fungi Пат. 6558940 США, МПК 7 С12 N 1/00, С12 N1/12, 2002.
2. Калакуцкий, Л.В. Лучистые грибки и родственные им организмы (actinomicetales). Микробиология, 2004, т.33, №5, с. 613-621.
3. Евтушенко, Л.И. Актинобактерии: развитие систематики на примере семейств порядка Actinomicetales. Автореф. диссертации докт. биол. наук, 2003, Пушино, 58 с.
4. Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках. М. Высшая школа, 1986, с. 448.
5. Тулемисова, К.А.; Чормонова, Н.Т. Актиномицеты – антагонисты фитопатогенных грибов. В сб.: Поиск продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов. Алма-Ата, Гылым, 1990, с. 83-95.

Data prezentării articolului – 10.04.2008