
УДК 579.646 31.46, 573.6.086.8/35

**С. А. Бурцева, Т.Ф. Сырбу, В.А. Сланина,
С.А. Толочкина, С.Н. Кодряну**

Институт микробиологии и биотехнологии АНМ, ул. Академическая 1, МД-2028, Кишинев, Молдова, тел: (373 22)725754,
e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ МОЛДОВЫ

У выделенных из почв Молдовы новых 7 штаммов грибов рода *Penicillium*, 6 штаммов бактерий рода *Bacillus*, 2 — рода *Pseudomonas*, 6 — актиномицетов рода *Streptomyces* изучены антагонистические свойства в отношении ряда фитопатогенных бактерий и грибов, а также возбудителей микозов пчел. Выявлены штаммы бактерий родов *Bacillus* и *Streptomyces*, активно задерживающих или полностью подавляющих рост грибов *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* и *Fusarium graminearum*.

К л ю ч е в ы е с л о в а: почвенные грибы, бактерии, актиномицеты, антагонистические свойства.

Широкое использование микроорганизмов в биотехнологии основано на их разнообразии. В литературе последних лет приводятся многочисленные примеры использования микроорганизмов в промышленности: получение традиционных пищевых продуктов, аминокислот, нуклеотидов, антибиотиков, ферментов, биodeградируемых пластмасс, применение которых играет важную роль в решении экономических вопросов и проблемы загрязнения окружающей среды [1-5].

При получении новых лекарственных веществ более эффективен, в сравнении с химическим синтезом, поиск природных соединений, специфически действующих на определенные биохимические процессы. Так, поиск ингибитора роста клеточных стенок привел к обнаружению цефамицинов и нокардиоцинов, а изучение таких мало исследованных ранее родов актиномицетов как *Micromonospora*, *Actinoplanes* и *Chromobacterium* позволили выявить аминогликозиды, гликопептиды. Успешным оказался и направленный поиск веществ с иными типами фармакологической активности — антигельминтных соединений, иммуномодуляторов, ингибиторов ферментов и веществ с противоопухолевой активностью [6-8].

В настоящее время в арсенале сельскохозяйственной микробиологии имеется значительное количество препаратов и научных рекомендаций, целью использования которых являются экологизация сельского хозяйства и получение экологически безопасных видов микроорганизмов, имеющих практическое значение для растениеводства, животноводства, защиты растений, хранения и переработки сельхозпродукции [9].

© С.А. Бурцева, Т.Ф. Сырбу, В.А. Сланина, С.А. Толочкина, С.Н. Кодряну



Находят дальнейшее продолжение и исследования биологического метода борьбы с патогенными грибами и бактериями с помощью актиномицетов и бактерий [10-14]. Известны многочисленные сообщения об антагонистическом действии актиномицетов, бактерий рода *Bacillus* и рода *Pseudomonas* на фитопатогенные грибы и бактерии [10, 11, 14-18].

Целью нашего исследования являлось изучение антагонистических свойств новых штаммов микроорганизмов, выделенных из почв Молдовы, и выявление потенциальных штаммов для борьбы с фитопатогенными микроорганизмами и возбудителями микозов у пчел.

Материалы и методы

Объектами исследований служили 7 штаммов грибов рода *Penicillium*, 6 штаммов бактерий рода *Bacillus*, 2 — бактерии рода *Pseudomonas*, 6 — актиномицетов рода *Streptomyces*, которые были выделены из почвенных образцов чернозема карбонатного, слабогумусного (гумус 2,4 - 2,5 %) под кукурузой (без удобрений).

Изучение антимикробных свойств почвенных изолятов проводили с помощью метода агаровых блоков [20].

Исследуемые штаммы выращивали на средах, соответствующих их физиологическим потребностям: грибы — на агаризованном пивном сусле, бактерии рода *Bacillus* и *Pseudomonas* — на питательном агаре, актиномицеты рода *Streptomyces* — на среде Чапека с глюкозой.

Тест-организмами служили фитопатогенные бактерии *Xanthomonas campestris* 8003, *Corynebacterium michiganense* 13a, *Pseudomonas fluorescens* B-970; грибы фитопатогенные и грибы, вызывающие микозы у пчел: *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum*; дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula gracilis* и грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* B-60.

После инкубирования тест-микроорганизмов в термостате при 28 °C (бактерии — 24 часа, грибы — 48 - 72 и дрожжи — 24 - 48 часов) измеряли диаметр зон задержки роста под действием исследуемых почвенных изолятов. Повторность опыта 6-кратная (по 2 блока каждого из изолятов в 3-х чашках Петри с соответствующим тест-организмом).

Результаты и их обсуждение

Сравнивая способность почвенных изолятов задерживать рост *E.coli* B-60 в наших исследованиях, следует отметить, что у 7 изолятов грибов рода *Penicillium*, 2 штаммов бактерий рода *Bacillus*, штамма бактерий рода *Pseudomonas* и штамма актиномицетов рода *Streptomyces* sp.37 она отсутствовала, тогда как 3 штамма бактерий рода *Bacillus* (*Bacillus* sp.12K, *Bacillus* sp.15K и *Bacillus* sp.33K), штамм бактерий рода *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp. 107) и 3 штамма актиномицетов (*Streptomyces* sp.10, *Streptomyces* sp.14 и *Streptomyces* sp.17) задерживали рост этого тест-организма (диаметр зон задержки роста 15,0 — 20,0 мм), и только у штамма бактерий рода *Bacillus* (*Bacillus* 64K) и 2 штаммов стрептомицетов (*Streptomyces* sp.23, *Streptomyces* sp.33) активность была больше (22,5 — 30,0 мм).



Таблица 1

Антимикробная активность микроорганизмов, выделенных из почв Молдовы
(диаметр зоны ингибирования роста, мм)

Антагонисты	<i>E.coli</i> B-60	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Corynebacterium michiganense</i> 13a	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B-970	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> N 11	<i>Rodotorula gracilis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
<i>Penicillium</i> sp.2	-	12,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.4	-	14,0	12,0	-	-	-	-	-	-	12,0	12,0
<i>Penicillium</i> sp.6	-	12,0	-	-	-	-	8,0	-	-	15,0	20,0
<i>Penicillium</i> sp.7	-	12,0	-	-	-	-	-	-	15,0	18,0	20,0
<i>Penicillium</i> sp.16	-	10,0	-	-	-	-	-	-	17,0	20,0	22,0
<i>Penicillium</i> sp.17	-	10,2	15,0	-	13,0	-	16,0	-	15,0	20,0	25,0
<i>Penicillium</i> sp.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,0	12,0
<i>Streptomyces</i> sp.10	15,0	14,0	14,0	-	13,0	14,0	16,0	П.п.	П.п.	14,0	П.п.
<i>Streptomyces</i> sp.14	17,0	16,0	15,0	-	-	15,0	11,0	16,0	17,0	14,0	15,0
<i>Streptomyces</i> sp.17	15,0	15,0	18,0	-	-	-	18,0	25,0	П.п.	11,0	13,0
<i>Streptomyces</i> sp.23	30,0	1,0	25,0	-	13,0	27,0	-	П.п.	22,0	-	30,0
<i>Streptomyces</i> sp.33	28,0	-	23,0	-	13,0	25,0	-	П.п.	24,0	-	25,0
<i>Streptomyces</i> sp.37	-	10,0	-	-	14,0	-	16,0	П.п.	24,0	14,0	25,0
<i>Bacillus</i> sp.12K	17,0	17,0	17,5	38,0	25,5	16,0	19,5	29,0	21,0	19,5	21,0
<i>Bacillus</i> sp.15K	20,0	20,0	21,0	14,0	16,0	20,0	14,0	20,5	22,5	21,0	20,5
<i>Bacillus</i> sp.31K	-	-	-	19,5	-	-	18,0	30,0	23,5	19,0	15,0
<i>Bacillus</i> sp.33K	18,5	18,6	16,5	14,5	25,0	-	19,5	30,0	-	23,5	20,0
<i>Bacillus</i> sp.38K	13,5	-	11,0	12,5	-	14,5	37,5	-	-	12,0	17,5
<i>Bacillus</i> sp.64K	17,5	22,5	22,5	21,0	19,0	19,0	14,5	28,0	-	12,0	17,0
<i>Pseudomonas</i> sp.107	14,0	16,0	18,0	-	-	-	10,0	18,0	20,0	16,0	12,0
<i>Pseudomonas</i> S-II	-	-	6,0	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: * — диаметр зоны ингибирования роста тест-культуры микроорганизмов.

Проявление антимикробных свойств в отношении *Pseudomonas fluorescens* B-970 замечено у выделенных нами грибов и актиномицетов. У бактерий рода *Bacillus* антимикробная активность к этому тест-организму варьировала в широких пределах (диаметр зон задержки роста от 12,5 до 38,0 мм). Так, например, слабая антимикробная активность была у штаммов *Bacillus* sp. 38K, *Bacillus* sp. 33K и *Bacillus* sp. 15K (12,5 — 14,5 мм), средняя — у штамма *Bacillus* sp. 64K (до 21,0 мм) и самая высокая — у штамма *Bacillus* sp. 12K (до 38,0 мм).

Рост представителей фитопатогенных бактерий *Xanthomonas campestris*, вызывающих сосудистый бактериоз капусты, слабо задерживали грибы рода *Penicillium*, актиномицеты рода *Streptomyces* и бактерии рода *Pseudomonas* (диаметр зон ингибирования — от 12,0 до 16,0 мм). Из бактерий рода *Bacillus* 4 штамма (*Bacillus* sp. 12K, *Bacillus* sp. 15K, *Bacillus* sp. 33K и *Bacillus* sp. 64K) обладали средней активностью (17,0 — 20,0 мм).

Способность задерживать рост другого представителя фитопатогенных бактерий *Corynebacterium michiganense* 13a, который вызывает бактериальный рак томатов, не обнаружена у 5 штаммов грибов, штамма актиномицетов (*Streptomyces* sp. 37), тогда как у бактерий рода *Bacillus* антагонистические свойства проявлялись в разной степени (зоны задержки роста — от 11,0 до 24,0 мм). Наиболее активным антагонистом оказался штамм *Bacillus* sp. 64K (22,0 — 24,0 мм).



Не выявлена антимикробная активность по отношению к дрожжам у грибов и бактерий рода *Pseudomonas*. По-разному проявлялись антимикробные свойства по отношению к дрожжам у бактерий рода *Bacillus* и актиномицетов. Так, например, бактерии активнее, чем актиномицеты, задерживали рост *Saccharomyces cerevisiae*: у 2-х штаммов (*Bacillus sp. 12K* и *Bacillus sp. 33K*) чувствительность была средней (25,5 и 25,0 мм соответственно). В отношении *Rhodotorula gracilis* антимикробная активность бактерий рода *Bacillus* проявлялась в меньшей степени (у 4-х штаммов она составляла 14,5 – 20,0 мм).

Среди актиномицетов штамм *Streptomyces sp. 17* не проявлял антагонистических свойств по отношению к дрожжам, стрептомицеты *Streptomyces sp. 14* и *Streptomyces sp. 37* задерживали рост только 1 штамма дрожжей, тогда как штамм *Streptomyces sp. 10* обладал способностью задерживать рост обеих дрожжевых тест-культур, хотя диаметр зон задержки роста был небольшим (13,0 - 14,0 мм). У 2 других штаммов стрептомицетов (*Streptomyces sp. 23* и *Streptomyces sp. 33*) антагонистические свойства проявились в большей степени по отношению к *Rhodotorula gracilis* (27,0 и 25,0 мм соответственно), чем к *Saccharomyces cerevisiae* (13,0 мм).

К выбранным в качестве тест-организмов грибам у исследуемых почвенных изолятов, антагонистические свойства отличались большой вариабельностью. Так, например, у бактерий рода *Pseudomonas* штамм *S-11* не обладал способностью задерживать рост грибов рода *Fusarium*, тогда как штамм *Pseudomonas sp. 107* обладал этой способностью. Диаметр зон ингибирования варьировал от 12,0 до 17,0 мм. У *Fusarium solani* зоны были 15,0 – 17,0 мм.

Под воздействием бактерий рода *Bacillus*, у тест-штаммов грибов рода *Fusarium* зоны задержки роста варьировали от 12,0 до 23,5 мм, причем зоны больше были у *Fusarium solani* (19,0 – 23,5 мм).

У 6 штаммов грибов рода *Penicillium* проявлялась способность задерживать рост грибов рода *Fusarium*. Диаметр зон варьировал от 15,0 до 25,0 мм. Большие зоны ингибирования наблюдались у *Fusarium graminearum* (20,0 – 25,0 мм).

Значительное разнообразие в проявлении антагонистических свойств к представителям рода *Fusarium* замечено у почвенных изолятов, относящихся к разным видам рода *Streptomyces*. Так, например, у 2 штаммов они практически отсутствуют, 4 штамма стрептомицетов слабо задерживают рост этих тест-организмов (11,0 – 15,0 мм). Под действием метаболитов 3 штаммов стрептомицетов зоны задержки роста *Fusarium graminearum* достигали диаметра 25,0 – 30,0 мм. Среди стрептомицетов выявлен активный антагонист, вызывающий в условиях наших опытов полное подавление роста указанной тест-культуры (*Streptomyces sp. 10*). Данные, представленные в таблице 1, показывают, что у изучаемых штаммов рода *Pseudomonas* антимикробная активность в отношении такого фитопатогенного гриба как *Alternaria alternata* очень слабая, тогда как среди изучаемых бактерий рода *Bacillus* выявлено 4 активных антагониста. Из грибов рода *Penicillium* не удалось выявить штаммы с антимикробной активностью по отношению к этому тест-организму. Согласно проведенным исследованиям, самыми активными антагонистами среди изучаемых почвенных изолятов, оказались 4 штамма актиномицетов, которые полностью подавляли рост этого штамма.

Из всех изученных почвенных изолятов только у бактерий рода *Bacillus* были обнаружены антагонистические свойства по отношению к *Pseudomonas fluorescens B-970*. Из них 3 штамма были с низкой антагонистической активностью (зоны от 12,5 до 14,5 мм), 2 штамма со средней активностью (19,5 – 21,0 мм) и 1 штамм (*Bacillus sp. 12K*) — с высокой активностью (38,0 мм).



Таким образом, проведенные исследования показали, что почвенные изоляты (бактерии рода *Bacillus* и *Pseudomonas*, грибы рода *Penicillium*, актиномицеты рода *Streptomyces*) в той или иной степени способны подавлять рост культур, используемых в качестве тест-организмов, в т.ч. представителей фитопатогенных бактерий и грибов, а также дрожжей. Наибольшую чувствительность фитопатогенные бактерии проявили к почвенным изолятам — представителям рода *Bacillus* и актиномицетам рода *Streptomyces*.

Выявлены штаммы бактерий рода *Bacillus* (*Bacillus* sp. 15К и *Bacillus* sp. 64К), а также 2 штамма стрептомицетов (*Streptomyces* sp. 23 и *Streptomyces* sp. 33), которые активно подавляли рост *E.coli*. Установлена способность бактерий рода *Bacillus* задерживать рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, а рост *Rhodotorula gracilis* — у 2 штаммов стрептомицетов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bull Alan T. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. // Annu. Rev. Microbiol. Vol. 46. Palo Alto (Calif.), 1992 — p. 219 — 252.
2. Fox F.M. The importance of microbial biodiversity to biotechnology. ICCS — VII; 7 th Int. Congr. Culture Collections, Beijing, Oct. 12 — 16, 1992, (Beijing, 1993), p.13-14.
3. Komazata Kazuo. Microbial diversity and application of microorganismes. Res. Commun. Inst. Ferment. Osaka. 1995, 17, p. 31 — 43.
4. Brandl Helmut. Von Nutzen der Mikroben: Bakterien als Helfer bei der Produktion von industriellen Werkstoffen. Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zurich. — 1998. — 143, N 4. p.157 — 164.
5. Флинт В.Е., Смирнова О.В. и др. Сохранение и восстановление биоразнообразия. — М. Науч. и учеб. метод. центр, 2002. 289 с.
6. Garrity George M., Bostian Keith A. A chieving chemical diversity through microbial diversity. The search for new therapeutic agents.// ICCS — VII; 7 th Int. Congr. Culture Collections, Beijing, Oct. 12 — 16, 1992, (Beijing, 1993). С.11.
7. Sussmuth R.D., Wohlleben W. The biosynthesis of glucopeptide antibiotics - a model for complex, non-ribosomally synthesized peptidic secondary metabolites. //Appl. Microbiol. and Biotechnol. — 2004. — 63, 4, P. 344 - 450.
8. Петрук Т.В. Синтез, біологічна активність авермектинового комплексу *Streptomyces avermitilis*: Автореф. дис. канд. біол. наук. К., 2005. — 21 с.
9. Ослежкин Ю.С. Место и роль коллекций микроорганизмов в системе биотехнологического контроля. //Агро XXI. — 1997.— № 5. — С. 8-9.
10. Захарова Н.Г., Алимova С.К., Егоров С.Ю. Скрининг микроорганизмов, перспективных для биотехнологии. //Конф. «Интродукция микроорг. в окруж. среду», (М. 17-19 мая, 1994г.): тез. докл. — М., 1994. — С. 36.
11. Колomieц Э.И., Згор Н.А., Романовская Т.В. и др. Антигрибная и антибактериальная активность актиномицетов, разлагающих лигноцеллюлозу. // Прикладная биохимия и микробиология. — 1994. — т. 30, в. 4-5. — С. 644-649.
12. Nishimura Tomio, et.all. An endophytic actinimycete, *Streptomyces* sp. АОК — 30, isolated from mountain laurel and its antifungal actyvity. // J. Gen. Plant Pathol. — 2002. — 68, 4, P. 390 — 397.
13. Bressan Wellington. Biological control of maize seed patogenic fungi by use of actinomycetes. //Biocontrol. — 2003. — 48, 2, P. 233 — 240.
14. Sahin Nurettin. Antimicrobial activity of *Streptomyces species* against blotch disease pathogen. //J. Basic microbiol. — 2005. — 45, N 2. — P. 64—71.
15. Родигин В.Н., Железняк М.В. Антагонистические действия *Bacillus fluoringiensis bert.* на фитопатогенные грибы. //Всес. конф. «Микроорганизмы, стимулирующие и регенерирующие рост растений и животных».



(Ташкент, 3 – 5 октября 1989 г.): тез. докл. — Ташкент, 1989. — С. 165.

16. *Смирнов В.В., Куприанова Е.А.* и др. Антимикробные и энтомопатогенные свойства *Pseudomonas aureofaciens*. //Прикладная биохимия и микробиология. — 1999. — т. 35, № 4. — С. 413 – 416.

17. *Тодорова С.* Таксономично определене на *B. subtilis* подтискалщ растежа на фитопатогении микроорганизми. //Докл. Научната сессия РУ/СУО2, Русе. — науч.тр. Сер. 4.3. Русен.унив. 2002. — 39. С. 103 – 108.

18. *Мелентьев А.И.* Бактерии — антагонисты фитопатогенных грибов. //Агро. XXI. — 2001. — № 11. С. 10 – 11.

**С.А. Бурцева, Т.Ф. Сирбу, В.О. Сланина, С.А. Толочкина,
С.М. Кодряну**

Институт микробиологии та биотехнологии АНМ, вул. Академична, 1,
МД-2028, Кишинев, Молдова, тел: (373 22)725754,
e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

АНТАГОНІСТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ, ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ ҐРУНТІВ МОЛДОВИ

Реферат

Встановлено, що активними антагоністами фітопатогенних грибів *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* та *Fusarium graminearum* є вилучені з ґрунту Молдови представники роду *Streptomyces* та бактерії роду *Bacillus*. Значно менше антимікробні властивості виявляли гриби роду *Penicillium* та бактерії роду *Pseudomonas*. Ріст дріжджів ці штами затримували активніше за інших.

К л ю ч о в і с л о в а: ґрунтові гриби, бактерії, актиноміцети, антагоністичні властивості.

S.A. Burtseva, T.F. Syrbu, V.A. Slanina, S.A. Tolochkina, S.N. Kodryanu

Institute of Microbiology and Biotechnology of ASM
Akademicheskaya str., 1, MD-2028, Chisinau, Moldova, tel: (373 22)725754,
e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

ANTAGONISTIC PROPERTIES OF NEW MICROORGANISMS STRAINS ISOLATED FROM THE SOILS OF MOLDOVA

Summary

There was established that active antagonists against phytopathogenic fungi *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium graminearum* were representatives of *Streptomyces spp.* and *Bacillus spp.*, isolated from Moldova soil. The fungi of *Penicillium spp.* and *Pseudomonas spp.* bacteria have possessed antimicrobial qualities to a smaller extent. These strains have more actively inhibited the growth of yeast than others.

Key words: fungi, bacteria, actinomycetes, antagonistic properties.

