

BIOLOGICAL AGENTS TO CONTROL PLANT AND ANIMAL PATHOGENS: APPROACH TO INCREASE EFFICIENCY AND COMPETITIVE ABILITY

KOLOMETZ E.I., ROMANOVSKAYA T.V., MOLCHAN O.V., SVERCHKOVA N.V., ZHUK G.V., EYSEGNEVA N.V.

Laboratory of biological control agents

Methods of producing preparations for plant and animal protection based on strains displaying competitive advantage and antifungal action were proposed. Their technical variants of antagonistic bacteria and entomopathogenic fungi based investigations to improve preparation form of bioinsecticides have been described.

UDK 579.64+606.63

БАКТЕРИИ-АНТАГОНИСТЫ КАК АГЕНТЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ КАГАТНОЙ ГНИЛИ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Колومیц Э.И.¹, Кильчевская О.С.¹, Кулцов В.Н.¹, Романовская Т.В.¹, Гирилович Н.И.¹, Свиридов А.В.²

¹ лаборатория средств биологического контроля ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси»,
² кафедра энтомологии и биологической защиты растений УО «Гродненский государственный аграрный университет»

Установлено, что в составе возбудителей кагатной гнили сахарной свеклы присутствуют фитопатогенные грибы родов *Fusarium*, *Pestalotia*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Alternaria* и *Phoma*. Выделены культуры бактерий, представляющие интерес в качестве потенциальных агентов биологического контроля указанных фитопатогенов. Выявлено ингибирующее действие метаболитов изученных фитопатогенов на прорастание спор и развитие мицелия грибов. По данным лабораторных исследований отобраны культуры бактерий с максимальной антагонистической активностью для надоботы опытных посадочных материалов. Отмечено, что хозяйственная эффективность некоторых биопрепаратов, используемых для обработки свеклы в буртах, достигает 45%. На основе полученных исследований рекомендован штамм бактерии *Bacillus subtilis* М-22 в качестве биологического агента для защиты сахарной свеклы от кагатной гнили.

Введение. Кагатная гниль — болезнь корнеплодов свеклы в период зимнего хранения в кагатах или буртах, вызываемая комплексом различных фитопатогенных грибных и бактериальных микроорганизмов, из которых наиболее часто встречаются грибы родов *Botrytis*, *Phoma*, *Trichothecium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* [1, 2]. Болезнь проявляется в разлохотении и отми-

рани тканей корнеплодов, которые покрываются пресной раз-
личного цвета или имеют характер мокрой гнили, вследствие чего
снижается пищевая и технологическая ценность сахарной свек-
лы. Как правило, комплекс защитных мероприятий включает об-
работку свеклы от вредителей и болезней в период вегетации
и предохранение от механических повреждений при уборке и
транспортировке, тщательную браковку перед укладкой в кагаты.
Наряду с этим большое значение имеет подавление жизнедея-
тельности фитопатогенной микрофлоры при хранении свеклы.
Применение различных химических средств защиты приводит к
остаточному загрязнению корнеплодов пестицидами и ограниче-
но санитарно-гигиеническими нормами. Широко практикуемая об-
работка корнеплодов и известковыми материалами перед заклад-
кой их на хранение не обеспечивает эффективную защиту свеклы
от кагатной гнили.

В связи с указанным, возрастает актуальность разработки
методов биологического контроля возбудителей кагатной гнили.
Исследования в этом направлении ведутся в различных странах
мира. Выделены бактерии рода *Bacillus*, *Segata*, *Pseudomonas*
[3], отличающиеся способностью к подавлению роста патогенных
грибов при низких температурах, характерных для условий со-
хранения овощной продукции в хранилищах. Показано целесоо-
бразность использования бактерий-антагонистов рода *Bacillus* в
качестве основы эффективных биопрепаратов [4, 5]. Так, россий-
ский препарат «Фитоспорин-М» (*Bacillus subtilis* 26Д) рекомендо-
ван для снижения развития и распространения гнилостных про-
цессов на различных сортах сахарной свеклы [6].

Проблема защиты сахарной свеклы от кагатной гнили всег-
да актуальна и для Республики Беларусь. Вместе с тем, мировой
состав возбудителей этого заболевания в республике не изучен
и зарегистрированы биопрепараты, способные эффективно по-
давить развитие кагатной гнили. Поэтому разработка отече-
ственного микробного препарата для защиты сахарной свеклы от
кагатной гнили с учетом особенностей видового состава и пато-
генных свойств возбудителей, распространенных в Беларуси,
обеспечивающего снижение потерь и качество продукции при
хранении является актуальной задачей.

В задачи исследования входили скрининг штаммов мик-
роорганизмов — антагонистов возбудителей кагатной гнили и
оценка их активности в отношении комплекса грибных патогенов
сахарной свеклы, распространенных в Беларуси, с целью созда-
ния микробного препарата.

Объекты и методы исследования. В работе использована
лаборатория рода *Bacillus* и *Pseudomonas*, выделенные в лабора-

Результаты и их обсуждение. Определен видовой состав и патогенность возбудителей кагатной гнили. Из пораженных тканей корнеплодов сахарной свеклы были выделены следующие грибы: *Penicillium oxalicum* Link, *Fusarium solanum* Sacc, *Fibrella vesiculosus* Wolf, *Aspergillus nidulans* Sacc, *Aspergillus niger* Fr., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary, *Phytophthora blanda* Frank.

По данным первичного отбора, проведенного методом точечного тестирования на агаризованных питательных средах, были отобраны бактериальные культуры, проявившие выраженную антагонистическую активность по отношению к исследуемым фитопатогенам. Далее изучаемые бактерии выращивали в глубинной культуре.

Наблюдения с использованием светового микроскопа выявили ингибирование прорастания спор и развития мицелия фитопатогенных грибов под действием метаболитов бактериальных антагонистов. Установлено, что бесклеточная КУЖ большинства исследуемых бактерий вызывает деформацию спор и ростовых трубок грибов *P. oxalicum* и *V. solana*, сопровождающуюся агрегацией и появлением ооухлособразных воздушных

Антагонистическое действие бактерий, оцененное методом лунки, проявляется как в полном отсутствии роста фитопатогенных грибов, так и в ослаблении их развития, диаметр зон лунки или задержки роста тест-объектов варьирует в диапазоне от 10 до 66 мм (таблица).

Из изученных псевдомонад, наибольшая антифунгальная активность отмечается у штамма *P. alcaliphila* 9, отличительной особенностью антагонистического действия которого является подавление роста всех исследуемых фитопатогенных грибов и образование чистой зоны лунки на тазоне тест-объектов. Характерной особенностью бактерий рода *Serratia* является их способность развиваться при пониженных температурах (3–5 °С), что позволяет протинизировать их конкурентоспособность *in vivo*, поскольку оптимальная температура при хранении свеклы в кагатах составляет 1–3 °С.

Наиболее перспективными агентами биологического контроля возбудителей кагатной гнили сахарной свеклы в климатических условиях Беларуси являются бактерии *Bacillus subtilis* Максимальную антагонистическую активность проявляет штамм *B. subtilis* 10/19, однако он не отличается высокой холодоустойчивостью (рост наблюдается лишь при 8 °С и выше). Штаммы *B. subtilis* М-22, *B. subtilis* М-19, *B. subtilis* 12, *B. subtilis* 14, *B. subtilis* 7/14 характеризуются не только высокой антимикробной активностью, но и холодоустойчивостью. Изоляты бактерий Г-3, Г-6, Г-10(4).

В результате биологического контроля Института микробиологии НАН Беларуси а также бактерии рода *Serratia* и *Pantoea* из белорусской коллекции патогенных микроорганизмов. Кроме этого, изучали изоляты бактерий Г-1 – Г-13, выделенные сотрудниками УО «Гродненский государственный аграрный университет». Основными тест-объектами для оценки антагонистической активности исследуемых культур бактерий служили фитопатогенные грибы, изолированные из пораженных кагатной гнилью корнеплодов свеклы и идентифицированные сотрудниками УО ГГАУ.

Определен видовой состав возбудителей кагатной гнили, выполняли по общепринятым в фитопатологии методам [7] культивирование выделенных изолятов грибов осуществляли на картофельно-глюкозном бульоне и агаре.

Бактерии-антагонисты выращивали на среде Мейнелла с использованием мелассы в качестве источника углерода в колбах Эрленмейера объемом 250–1000 мл на качалке (200 об/мин) при 28 °С в течение 72 ч. Первичный скрининг бактерий-антагонистов проводили методом точечного тестирования и методом лунки [8]. Результаты учитывали после 24–48 ч инкубации при температуре 28 °С по диаметру зон задержки роста тест-культур патогенов.

Идентификацию наиболее активных штаммов бактерий-антагонистов проводили с использованием электролитных питательных сред по общепринятым методикам [9] и определителю бактерий [10]. Титр колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий устанавливали методом предельных разведений [11]. Для определения титра спор проводили термическую обработку разведенной бактериальной суспензии при 80 °С в течение 10 мин с последующим высевом на МПА. Для изучения влияния метаболитов бактерий-антагонистов на прорастание спор и развитие мицелия фитопатогенных грибов использовали модифицированный метод агаровых пластинок [12]. При оценке холодоустойчивости бактерий культуры проводили наблюдения за их развитием на поверхности МПА в чашках Петри при температурах 3 °С, 5 °С и 8 °С.

Испытания опытных образцов биопрепаратов против кагатной гнили проводили в 2006–2007 годах в условиях крупногабаритных буртов УО СПК «Путришки» Гродненского района на свекле сортов Сильвано, Казино, Марс и малогабаритных буртов РУП «Несвижская опытная станция по сахарной свекле» на сорте Белорусская односемянная 69. Распространенность заболевания (Р, %) вычисляли по формуле $P = (n/N) \times 100$, где n – количество больных корнеплодов в пробе N – общее количество корнеплодов [13]. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием метода дисперсионного анализа [14].

Г-12(6), идентифицированные как *Bacillus subtilis*, также сочетают эти важные качества.

Таблица — Антифунгальная активность исследуемых культур бактерий

Культуры	Диаметр зоны задержки роста тест-культуры, мм						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Ps. variabilis</i> 3	22,0	19,0	26,0	33,0	25,0	17,0	24,0
<i>Ps. variabilis</i> 9	24,0	23,0	29,5	38,0	28,0	20,0	32,0
<i>Ps. sp. B-136</i>	14,5	17,5	14,5	46,0	20,0	22,5	25,0
<i>P. variabilis</i> 97	13,5	22,0	17,0	42,0	12,0	12,5	14,0
<i>S. dulcificans</i> B-162	14,0	14,0	20,0	35,0	26,5	22,5	18,5
<i>S. dulcificans</i> B-163	10,0	15,0	10,0	47,5	11,0	16,0	17,5
<i>B. subtilis</i> 7/14	22,0	29,5	17,0	46,0	25,0	24,0	29,0
<i>B. subtilis</i> 8/12	22,5	31,5	19,9	40,0	47,0	19,5	24,0
<i>B. subtilis</i> 9/6	18,5	30,5	26,5	41,5	44,0	26,0	29,0
<i>B. subtilis</i> 10/19	30,0	24,0	32,0	46,0	37,0	29,0	47,0
<i>B. subtilis</i> 12	22,0	20,0	30,0	47,0	45,0	22,0	45,0
<i>B. subtilis</i> 14	21,0	19,0	33,0	40,0	33,0	25,0	36,0
<i>B. subtilis</i> M-19	22,0	32,5	20,0	40,0	49,0	24,5	25,5
<i>B. subtilis</i> M-22	25,0	27,5	27,0	38,0	40,0	24,0	41,0
Изолят Г-1	21,0	22,0	17,0	30,0	29,0	28,5	29,5
Изолят Г-2	15,5	29,5	16,0	38,0	32,0	19,0	25,5
Изолят Г-3	25,0	23,0	21,0	48,0	43,0	21,0	30,0
Изолят Г-4	19,5	28,0	19,0	45,0	43,0	21,5	26,0
Изолят Г-5	13,5	27,0	10,0	25,0	39,0	20,0	31,0
Изолят Г-6	27,0	21,5	28,0	44,0	34,0	21,0	31,0
Изолят Г-7(1)	23,5	22,0	24,0	42,0	40,0	22,0	28,5
Изолят Г-8(1)	30,0	25,0	30,0	52,0	53,0	25,5	43,0
Изолят Г-9(3)	25,5	30,5	30,0	53,0	43,0	25,5	30,5
Изолят Г-10(4)	30,5	30,0	33,0	66,0	56,0	25,5	37,0
Изолят Г-11(5)	26,0	25,5	20,0	48,0	56,0	22,5	27,0
Изолят Г-12(6)	29,0	25,5	25,0	53,0	54,0	25,5	32,0

Примечание: * тест-культуры 1 — *F. variabilis*, 2 — *F. variabilis* 3 — *F. variabilis*, 4 — *B. subtilis*, 5 — *Sc. solenifolius* 6 — *A. niger*, 7 — *Ph. doederleinii*.

На основе наиболее активных культур бактерий были разработаны опытные образцы препаратов, титр КОЕ и титр спор которых составил $4,6 \cdot 10^8$ и $2,0 \cdot 10^8$ соответственно. Оценка их действия (*in vivo*) на сохранность корнеплодов свеклы в буртах в период зимнего хранения показала, что наиболее эффективными являются препараты на основе штаммов бактерий *B. subtilis* M-22, *B. subtilis* 14 и *B. subtilis* Г-3. Под их влиянием распространённость кагатной гнили на корнеплодах сахарной свеклы значи-

тельно снижается. Хозяйственная эффективность препарата на основе бактерий *B. subtilis* M-22 достигает 45%.

Заключение. Видовой состав возбудителей кагатной гнили сахарной свеклы представлен фитопатогенными грибами родов *Aspergillus*, *Fusicladium*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Alternaria* и *Phoma* в лабораторных условиях максимальной активностью в отношении грибных патогенов характеризуются штаммы бактерий *B. subtilis* 10/19, *B. subtilis* M-22, *B. subtilis* Г-3, а в условиях крупно- и мелкогабаритных буртов в период зимнего хранения — *B. subtilis* M-22, *B. subtilis* Г-3 и *B. subtilis* 14.

Полученные результаты являются основой для дальнейших исследований по разработке биотехнологии получения высокоэффективного экологически безопасного препарата для защиты сахарной свеклы от кагатной гнили.

Список литературы

- 1 Демченко, М. И. Фитопатология / М. И. Демченко. — М.: Агропромиздат, 1985. — 387 с.
- 2 Фунгициды против болезней / К. И. Гринюкская [и др.] // Сахарная свекла. — 1991. — №4. — С. 46-47.
- 3 Штамм бактерий для предотвращения грибкового заболевания свеклы в буртах после сбора урожая и получения антибиотиков для инсектицида возбудителей антракнозных заболеваний пат. 2126210 (РСФСР) № 63700, А. 01 F 25/00, С 12 S 3/00, заявитель К. Лексерт, Г. Артур, С. Френс, Д. Савин, опубл. 20.02.69 // Бюл. № 8 в 1 изобретения. — 1988. — № 6. — С. 112.
- 4 Эффективность бактерий рода *Bacillus* против кагатной гнили сахарной свеклы / Э. И. Колупаев [и др.] // Материалы Международ. науч. конф. Минск-Гомель, 1-2 июля 2006 г. / Минск, 2006. — С. 338-341.
- 5 Науменко и правительственные органы создания биопрепарата для защиты свеклы от кагатной гнили / Э. И. Колупаев [и др.] // Ифр. Всп. ВПРС МРББ. — 2007. — Т. 38. — С. 145-147.
- 6 Биозащитители кагатных грибов сахарной свеклы и меры борьбы с ними / А. В. Шарова [и др.] // Материалы V Всерос. конгр. по межд. микробиологии, 23-30 марта 2007 г. / М. 2007. — Т. 1. — С. 129-171.
- 7 Савин, И. Методы полевой микробиологии / И. Савин. — М.: Колос, 1983. — 286 с.
- 8 Пуреличско, Н. М. Грибы - паразиты культурных растений / Н. М. Пуреличско. — Т. 1-3. — Киев: Наукова думка, 1977. — 380 с.
- 9 Добровольская, Т. Г. Методы выделения и идентификации грибовых бактерий / Т. Г. Добровольская, И. Н. Савицкая, В. В. Лысак. — М.: МПЗ, 1989. — 70 с.
- 10 Каталог определителей бактерий Вегит / под ред. Дж. Хоупа. — М.: Мир, 1986. — 485 с.
- 11 Методы полевой микробиологии и биологии / под ред. Д. Г. Зенченко. — М.: МГУ, 1980. — 224 с.
- 12 Методы общей бактериологии / под ред. В. Г. Герасимова. Т. 1. — М.: Мир, 1983. — 472 с.

ществ. Однако основной их недостаток в том, что эти методы не являются эволютически чистыми, поскольку сопряжены с применением вредных для человека и медленно деградирующих во внешней среде химических агентов. Длительное применение химических дезинфектантов приводит также к возникновению проблем резистентности микроорганизмов, что делает указанные средства малопригодными для дальнейшего использования.

В связи с этим особую актуальность приобретает биологические препараты, обладающие эволюционной безопасностью, безвредностью для животных и человека и являющиеся эффективным средством направленным на профилактику болезней в стаде животных и в первую очередь инфекций, вызванных бактериями групп кишечной палочки, стафилококко-стрептококковой

[1].

Перспективным является создание дезинфицирующих средств на основе бактерий рода *Bacillus*. Известно, что спорообразующие бактерии находят широкое применение не только в борьбе с фитопатогенными микроорганизмами [2-5], но и патогенными животными [6-9]. Живые культуры спорообразующих аэробных бактерий рода *Bacillus* используются в животноводстве с целью профилактики и лечения желудочно-кишечных и респираторных заболеваний. Показано, что бактерии *B. cereus*, *B. pouterus*, *B. coarctatus*, *B. brevis*, *B. pasteurii*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* могут служить эффективным средством при лечении острых и хронических инфекций благодаря своим антагонистическим свойствам [10, 11]. Их применяют также для повышения эффективности использования корма и прироста живой массы животных [10]. Известен способ биологической дезинфекции операционных путем распыления живой культуры *B. subtilis* [12]. Микробные препараты, созданные на основе бактерий рода *Bacillus* наряду с безвредностью для макроорганизма и окружающей среды, обладают селективностью действия простотой технологии производства, стабильностью при хранении.

Использование бактерий рода *Bacillus* в качестве дезинфицирующих средств для снижения микробной обсемененности является новым направлением биотехнологии и требует глубокого и детального изучения [12, 13].

Нами выделен штамм бактерий *Bacillus pumilus* БИМ 0-263, исследованы его физиолого-биохимические особенности, влияние условий культивирования на проявление антимикробных свойств и на его основе разработана технология получения биопрепарата Энатин с широким спектром антибактериального действия.

Настоящее исследование направлено на изучение дезин-