

СРАВНИТЕЛЬНАЯ АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ

BACILLUS SUBTILIS И *BACILLUS THURINGIENSIS* IN VITRO

Аркадий НИКОЛАЕВ, Светлана НИКОЛАЕВА

Институт генетики, физиологии и защиты растений АН Молдовы

ACTIVITATEA COMPARATIVĂ ANTIFUNGICĂ A IZOLATELOR DE *BACILLUS SUBTILIS* ȘI *BACILLUS THURINGIENSIS* IN VITRO

Sunt arătate rezultatele evaluării comparative a acțiunii antifungice a trei culturi de *B. subtilis* și a reprezentanților a trei subspecii de *B. thuringiensis* împotriva ciupercilor fitopatogene *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* și *Alternaria alternata* în condițiile experimentului *in vitro*. Subspeciile de *B. thuringiensis* au activitate antifungică mai slabă decât *B. subtilis*. Cel mai activ s-a dovedit a fi *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Cuvinte-cheie: acțiune antifungică, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras*, *Alternaria alternata*.

COMPARATIVE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *BACILLUS SUBTILIS* AND *BACILLUS THURINGIENSIS* ISOLATES IN VITRO

The results of antifungal activity comparative assessment of three *B. subtilis* culture and representatives of three *B. thuringiensis* subspecies against phytopathogenic fungi *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* and *Alternaria alternata* in the *in vitro* experience are presented. *B. thuringiensis* subspecies antifungal activity was less than *B. subtilis* one. *B. thuringiensis* var. *kurstaki* was the most active among *B. thuringiensis* subspecies.

Keywords: Antifungal activity, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras*, *Alternaria alternata*.

Введение

При разработке биологических методов борьбы с болезнями растений широко испытываются и применяются биофунгициды на основе споровых бактерий рода *Bacillus*.

Виды *Bacillus* имеют широкий спектр антимикробной активности, поэтому используются как антигрибные [11], антивирусные [16], антиамебные [5] и антимикоплазменные агенты [13].

В борьбе с грибковыми болезнями растений и, в частности, против мучнисто-росяных болезней, большой интерес представляет применение биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* [14, 20].

Среди видов рода *Bacillus* существует вид *B. thuringiensis*, широко используемый в мире в качестве продуцента инсектицидных средств защиты растений. Инсектицидные свойства *B. thuringiensis* обусловлены его способностью образовывать в процессе споруляции параспоровые кристаллы дельта-эндотоксина [6, 7, 10].

Кроме того, его подвиды могут синтезировать несколько видов биологически активных молекул, таких как бактериоцины, инсектицидные белки и гидролитические ферменты, в том числе хитиназы [1, 2, 9, 12].

Мокрушина О.С. и др. показали, что штамм *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleriae* АК-4 обладает антибиотической активностью к таким патогенным микроорганизмам, как *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thiphimurium*, *Shigella sonnei*, *Candida albicans* и ряду других, что позволяет считать его перспективным для дальнейшей разработки инсектицидных, антимикробных и противовирусных препаратов [19].

Климентова Е.Г. показала, что различные подвиды *B. thuringiensis* проявляют антимикробное действие в отношении ряда широко распространенных аэробных бактерий-фитопатогенов. Полученный эффект зависел как от вида микроорганизма, объекта воздействия, так и от свойств самих подвидов *B. thuringiensis*. Наиболее активным оказался подвид *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* штамм Z-52, который в разной степени подавлял развитие культур фитопатогенных бактерий [17].

Левина Т.А. также показала, что дельта-эндотоксин *B. thuringiensis* является перспективным средством в борьбе с бактериозами растений – бактериозом огурцов, бурым бактериозом овса, полосатым бактериозом фасоли [18].

В последнее время более пристальное внимание было обращено на антифунгальное действие *B. thuringiensis*. Так, Stabb E.V. и др. показали биологическую эффективность его против черной ножки люцерны, вызываемой *Phytophthora medicaginis* [15].

Kim P.I. и др. сообщили о фунгициноподобном липопептиде *B. thuringiensis*, который обнаруживал *in vitro* антифунгальное действие против *Colletotrichum gloeosporioides* – возбудителя антракнозов [8]. Кроме того, хитиназа *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, принадлежащая к классу хитобиозидаз, ингибировала рост мицелия *Aspergillus niger* – возбудителя черной гнили арахиса и лука [4].

Choi Gyung Ja и др. показали, что среди изолятов *Bacillus thuringiensis* имеются такие, которые помимо инсектицидного действия обладают довольно сильным фунгицидным действием [3]. *In vitro* они проявляли антифунгальное действие против *Botrytis cinerea*, *in vivo* – были активными против четырех патогенов: фитофтороза томатов (*Phytophthora infestans*), бурой ржавчины пшеницы (*Puccinia recondite*), серой гнили томатов (*Botrytis cinerea*) и мучнистой росы ячменя (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) в опытах в ростовых камерах и против мучнистой росы огурцов – в теплице. Авторы проверили антифунгальное действие пяти подвидов *B. thuringiensis*: subsp. *aizawai*, subsp. *galleriae*, subsp. *kurstaki*, subsp. *morrisoni*, subsp. *sotto*. Активные антагонисты фитопатогенов были обнаружены среди всех подвидов.

Нами в 2007 году были обнаружены изоляты споровых бактерий рода *Bacillus*, активные против мучнистой росы ячменя [20]. Мы наблюдали также положительное действие *Bacillus* против мучнистой росы огурцов в полевых условиях [21]. Однако среди наших споровых культур не было кристаллообразующих видов.

В связи с тем, что получение биопрепаратов с инсектицидным и одновременно фунгицидным действием является довольно заманчивой идеей, мы приводим результаты испытаний *in vitro* трех изолятов *B. thuringiensis* в сравнении с тремя изолятами *B. subtilis*.

Объект и методы исследований

Объектом исследований были 3 бактерии *B. thuringiensis* и 3 бактерии *B. subtilis*.

Кристаллообразующие бактерии *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, var. *dendrolimus*, var. *thuringiensis* длительное время хранились в лабораторных условиях и впоследствии были реанимированы с сухих косяков.

Споровые бактерии *Bacillus subtilis* – оригинальные культуры, выделенные нами из разных источников.

В опыте использовали пятисуточные культуры бактерий, выращенных на картофельно-глюкозном агаре (20 мл среды на чашку Петри). На такой же среде при таком же объеме в чашках выращивали пять суток тест-культуры фитопатогенов: *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* (быстрорастущих на питательной среде), *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* и *Alternaria alternata* (медленнорастущих). При закладке опыта блоки патогенов и бактерий диаметром 8 мм накладывали по шаблону на картофельно-глюкозный агар (20 мл на чашку Петри), блок с патогеном – в центр чашки Петри, а блоки с бактериями – по ее периметру. Чашки Петри инкубировали при комнатной температуре. Опыт проводился в 4-кратной повторности.

При учетах измеряли радиус стерильной зоны, образованной антибиотическими веществами бактериальных культур. Так как тест-культуры фитопатогенов росли с разной скоростью, учеты делали по мере четкого образования зон отсутствия роста патогена.

Результаты замеров обрабатывали статистически.

Результаты исследований и их обсуждение

Из данных, представленных в таблице, можно видеть, что изоляты *B. subtilis* по сравнению с *B. thuringiensis* в большинстве случаев более активны и дают большие зоны задержки роста фитопатогенов. Различия между изолятами *B. subtilis* менее значительны, чем различия между изолятами *B. thuringiensis*. Среди изолятов *B. thuringiensis* более активным является изолят *B.thuringiensis* var. *kurstaki*. По действию на *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* и *Alternaria alternata* он не уступал *B. subtilis*. Можно также отметить, что у всех изолятов *B.thuringiensis* с медленнорастущими фитопатогенами зоны ингибирования больше, чем в случае быстрорастущих патогенов.

На быстрорастущих патогенах помимо 1-го учета (18.03), данные по которому представлены в таблице, спустя 6 суток был сделан второй учет (данные не приводятся), который показал, что все 3 культуры патогенов полностью выросли на блок №6 (культура *B.thuringiensis* var. *thuringiensis*) и в районе только этого блока образовалось своеобразное «ожерелье» из склероциев *Botrytis cinerea* (см. рис.).

Таблица

Результаты сравнительного испытания антифунгальной активности *Bacillus subtilis* и различных разновидностей *Bacillus thuringiensis*

Фито-патогены	Бактериальные культуры, № блока, радиус стерильной зоны (мм)					
	<i>B.subtilis</i> -2	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>dendrolimus</i>	<i>B.subtilis</i> -3	<i>B.thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	<i>B.subtilis</i> -4	<i>B.thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>
<i>Botrytis cinerea</i> *	12,5±0,3	6,3±0,9	14,8±0,6	10,3±1,4	14,0±0,5	6,5±0,7
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> *	11,3±1,1	5,0±0,5	13,3±0,4	13,8±0,7	14,5±0,3	7,5±0,3
<i>Rhizoctonia solani</i> *	14,3±0,6	8,8±1,3	16,8±1,4	11,0±0,5	13,5±0,6	2,5±1,7
<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>orthoceras</i> **	12,5±0,3	13,3±0,7	14,5±0,7	13,8±0,9	15,3±0,7	9,8±1,0
<i>Alternaria alternata</i> ***	22,3±0,3	19,8±1,2	22,3±0,6	22,0±0,8	21,3±1,4	13,3±1,4

Условные обозначения: * учет 18.03.2015; ** учет 23.03.2015; *** учет 30.03.2015

Из приведенного рисунка видно, что разные фитопатогены по-разному взаимодействуют с бактериальными антагонистами. В этом отношении бросается в глаза реакция *B.cinerea*, который при контакте с антибиотическими веществами бактерий начинает образовывать склероции. По границе роста мицелия и фронта антибиотиков бактерий мицелий *B.cinerea* темнеет. Сходным образом реагирует и *S. sclerotiorum*, мицелий которого также пигментируется. На примере этого патогена видно, что зона пигментирования зависит от изолята – под влиянием одних изолятов бактерий зона побурения мицелия шире (блок № 5, *B. subtilis*-4), тогда как у других она более узкая и не столь интенсивно окрашена. Иногда самое интенсивное побурение имеет место на границе контакта мицелия с зоной антибиотических веществ (блок №1, *B. subtilis*-2 и блок №5, *B. subtilis*-4), а в других случаях зона побурения образуется на некотором расстоянии от линии контакта мицелия с антибиотическими веществами (блок №3, *B. subtilis*-3).

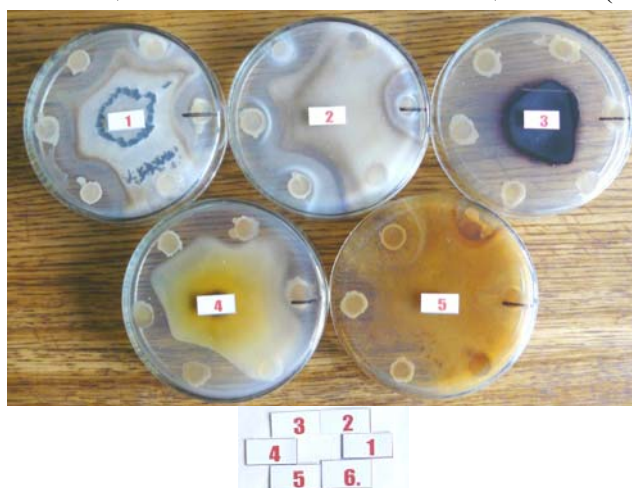


Рисунок. Взаимодействие изолятов *B.subtilis* и *B.thuringiensis* с разными возбудителями микозов растений (вид с подложки)

Условные обозначения:

- нумерация чашек: 1 – *Botrytis cinerea*; 2 – *Sclerotinia sclerotiorum*; 3 – *Alternaria alternata*;
 4 – *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras*; 5 – *Rhizoctonia solani*;
 порядок расположения блоков бактерий на чашке соответствует схеме под рисунком: 1 – *B. subtilis*-2;
 2 – *B. thuringiensis* var. *dendrolimus*; 3 – *B.subtilis*-3; 4 – *B.thuringiensis* var.*kurstaki*; 5 – *B.subtilis*- 4;
 6 – *B.thuringiensis* var. *thuringiensis*

Учитывая, что в нашем опыте было испытано недостаточное количество изолятов кристаллообразующих бактерий, с большой долей вероятности можно предположить, что есть шанс найти среди них культуры со значительно высокой фунгицидной активностью. Подтверждением тому может служить работа Choi, Gyung Ja и др. [3].

Выводы

При тестировании продуцентов биопрепаратов необходимо брать широкий круг патогенов, что позволит выявить особенности действия тех или иных продуцентов.

Наличие среди *Bacillus thuringiensis* подвидов с высокой антифунгальной активностью свидетельствует о целесообразности более широкого поиска таких изолятов и о перспективности создания на их основе полифункциональных биопрепаратов, обладающих фунгицидным и инсектицидным действием.

Представляет интерес проверка возможности совместного применения препаратов на основе *B. subtilis* и *B. thuringiensis* для одновременной оценки их действия и против болезней, и против вредителей.

Литература:

1. AHERN, M., VERSCHUEREN, S. and Van SINDEREN, D. Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003. 220 p.127-131.
2. CHERIF, A., S. CHEHIMI, F. LIMEM, B.M. HANSEN, N.B. HENDRIKSEN, D. DAFFONCHIO, and A. BOUDABOUS. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9. *J. Appl. Microbiol.* 2003.95, p. 990-1000.
3. CHOI GYUNG JA, JIN-CHEOL KIM, KYOUNG SOO JANG, AND DONG-HYUN LEE. Antifungal activities of *Bacillus thuringiensis* isolates on barley and cucumber powdery mildews. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2007), 17(12), p.2071-2075.
4. DRISS, F., M. KALLASSY-AWAD, N. ZOUARI, and S. JAOUA. Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Appl. Microbiol.* 2005. 93, p.374-379.
5. GALVEZ, A., MAQUEDA, M., CORDOVILLA, P., MARTINEZ-BUENO, M., LEBBADI, M., VALDIVIA, E. Characterization and biological activity against *Naegleria fowleri* of amonebicins produced by *Bacillus licheniformis* D-13. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994. 38 (6), p.1314-1319.
6. GLARE, T.R., O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, U.K., 2000.
7. HÖFTE, H., WHITELEY, H. R. Insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 1989. 53, p.242-255.
8. KIM, P.I., H. BAI, H. CHAE, S. CHUNG, Y. KIM, R. PARK, and Y.-T. CHI. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J. Appl. Microbiol.* 2004. 97, p.942-949.
9. KIM, J.S., J.Y. CHOI, J.H. CHANG, H.J. SHIM, J.Y. ROH, B.R. JIN, Y.H. JE. Characterization of an improved recombinant baculovirus producing polyhedra that contain *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac crystal protein. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2005. 15, p.710-715.
10. LERECLUS, D., DELECLUSE, A., LECADET, M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: *P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, and S. Higgs (eds.), Bacillus thuringiensis, a Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley & Sons Ltd., U.K., 1993, p.37-69.
11. MILNER, J.L., RAFFEL, S.J., LETHBRIDGE, B.J., HANDELSMAN, J. Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin a by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995. 43 (4), p.685-691.
12. OH, S.-T., J.-K. KIM, S.-Y. YANG, and M.-D. SONG. Characterization of *Bacillus thuringiensis* having insecticidal effects against larvae of *Musca domestica*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2004. 14, p.1057-1062.
13. PEYPOUX, F., BONMATIN, J.M., WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. 51 (5), p.553-563.
14. ROMERO, D.A., PEREZ-GARCIA, M.E., RIVERA, F.M., CAZORLA, and DE VICENTE, A. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. 64, p.263-269.
15. STABB, E.V., JACOBSON, L.M. HANDELSMAN, J. Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. 60, p.4404-4412.
16. STELLER, S., VOLLENBROICH, D., LEENDERS, F., STEIN, T., CONRAD, B., HOFEMEISTERR, J., JAQUES, P., THONART, P., VATER, J. Structural and functional organization of the fengycin synthase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3. *Chem. Biol.* 1999. 6 (1), p.31-41.

17. КЛИМЕНТОВА, Е.Г. Антимикробное действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* в отношении ряда фитопатогенных бактерий / Автореферат диссертации канд. биол. наук, Ульяновск. 2001.
18. ЛЕВИНА, Т.А. Особенности антибактериального действия дельта-эндотоксинов *Bacillus thuringiensis* как перспективного агента защиты растений / Автореферат дисс. канд. биол. наук. Казань, 2005.
19. МОКРУШИНА, О.С., АНДРЕЕВА, И.С., МАЗУРКОВА, Н.А., БУРЦЕВА, Л.И., ЗАКАБУНИН, А.И. Антагонистические свойства штамма *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleriae* АК-4, выделенного из осадочных пород озера Байкал. Опубликовано в 2013. В: *Биологические науки. Все статьи*, Выпуск – август 2013.
20. НИКОЛАЕВ, А.Н., НИКОЛАЕВА, С.И. Методологические аспекты разработки микробиологического метода борьбы с мучнисто-росяными болезнями растений. В: *Studia Universitatis. Seria „Științe ale naturii”*. 2007, nr.1, p.157-161.
21. НИКОЛАЕВ, А., НИКОЛАЕВА, С. Биологическая эффективность штаммов *Bacillus subtilis* против возбудителя мучнистой росы огурцов *Podosphaera xanthii*. В: *Materialele Conferinței științifice internaționale (ediția a 5-a) „GENETICA, FIZIOLOGIA ȘI AMELIORAREA PLANTELOR”*, Chișinău 23-24 octombrie 2014. Chișinău, 2014. с.397-401.

Prezentat la 09.05.2015