

УДК 576.8

¹И.Э. Смирнова*, ²А.А. Мауи, ¹Р.Ш. Галимбаева¹РГП «Институт микробиологии и вирусологии» Министерства образования и науки Комитет науки РК, Казахстан, г. Алматы²ТОО «Институт защиты и карантина растений», Министерства сельского хозяйства РК, Казахстан, п. Рахат, Алматинская область

*E-mail: iesmirnova@mail.ru

Целлюлолитические бактерии, перспективные для разработки биопрепаратов для защиты сахарной свеклы

Из ризосферы и ризоплана здоровых растений сахарной свеклы выделены 12 штаммов целлюлолитических бактерий, обладающих высоким антагонизмом по отношению к фитопатогенным грибам рода *Fusarium*, вызывающих корневые гнили сахарной свеклы. Получено два штамма бактерий, характеризующихся одновременно высокой антифунгальной и ростостимулирующей активностью. При инокуляции семян бактериями в полевых опытах пораженность всходов фузариозами снижалась в 2,0-2,4 раза, корнеплодов – в 2,5-3,0 раза по сравнению с контролем, прибавка урожая сахарной свеклы составляла 30-34 ц/га.

Ключевые слова: целлюлолитические бактерии, фитопатогенные грибы, сахарная свекла, антифунгальная активность, ростостимулирующая активностью, корневые гнили.

И.Э. Смирнова, А.А. Мауи., Р.Ш. Галимбаева

Целлюлитикалық бактериялар, қант қызылшасын қорғау үшін биопрепарат өндірісі

Қант қызылшасының сау өсімдігінен ризосфера және ризопланасынан целлюлитикалық бактериялардың 12 штамы бөлініп алынды, қант қызылша тамырының іріндеуін туғызатын, *Fusarium* туысының фитопатагенді саңырауқұлақтарына жоғары антагонизмдік қасиетке төзімді болып келеді. Антифунгальді және өсуді стимулдейтін жоғары белсенді бактериялардың екі штамы бөлініп алынды. Зерттеу тәжірибелерінде тұқымдарды осы бактериялармен өңдеу кезінде, бақылау үлгісімен салыстырғанда тамыр жемісі 2,5-3,0 есе; фузариозамен ауруы 2,0-2,4 есе төмендеді, ал қант қызылша өнімі 30-34 ц/га есеге өсті.

Түйін сөздер: целлюлитикалық бактериялар, фитопатагенді саңырауқұлақтар, қант қызылшасы, анти-фунгальді белсенділігі, өсуді стимулдеуші белсенділігі, тамыр іріні.

I.E. Smirnova, A.A. Maui, R.Sh.Galimbayeva

Cellulolytic bacteria, perspective for development biopreparations for protection of the sugar beet

From the rhizosphere and rizoplana of healthy sugar beets, culture 43 cellulolytic bacteria were isolated. 12 strains that have expressed antagonism against phytopathogenic fungi of the genus *Fusarium*, causing root rot and seedling of sugar beet, were selected. Selected two strains of cellulolytic bacteria, characterized a high antifungal activity and the growth promoting of beets. Field tests have shown great promise strains use. Inoculation seeds of the cellulolytic bacteria infestation of fusariosus seedling decreased by 2,0-2,4 times, and the prevalence of root crops - 2,5-3,0 times as compared with the control and increase sugar beet harvest amounted to 30-34 kg/ha.

Keywords: cellulolytic bacteria, pathogenic fungi, sugar beet, antifungal activity, growth- promoting activity, rot root.

В настоящее время в Республике Казахстан остро стоит проблема улучшения экологической обстановки, и в этой связи большое внимание уделяется вопросам биобезопасности сельскохозяйственного производства. Одной из ценнейших технических культур является сахарная свекла. В тоже время сахарная промышленность Казахстана работает, в основном, на привозном сырье. Также в большом количестве готовый продукт импортируется в страну. Поэтому постановлением Правительства планируется расширение посевных площадей под эту культуру и увеличение ее производства в Республике.

Из-за недостатка средств у товаропроизводителей упрощена технология возделывания сельскохозяйственных культур, и в этой связи ухудшилось фитосанитарное состояние пахотных земель. Изменение экономического уклада страны привело к нарушению технологии возделывания сахарной свеклы. Особенно ощутимы потери от влияния биотических стрессовых факторов на орошаемых землях, где возделывается сахарная свекла. Так, в 2010 году потери урожая сахарной свеклы от болезней, вызываемых фитопатогенными микроорганизмами, достигли 30%. На полях сахарной свеклы в Казахстане регистрируется более 20 видов возбудителей заболеваний, среди которых наиболее распространены и наиболее опасны болезни корнеплодов, вызываемые грибами рода *Fusarium* [1-3]. По данным ряда авторов, корневые гнили снижают урожай сахарной свеклы на 50% и более в [4-6].

Поэтому без решения проблем защиты растений от патогенных микроорганизмов нельзя повысить эффективность и стабильность производства сахарной свеклы.

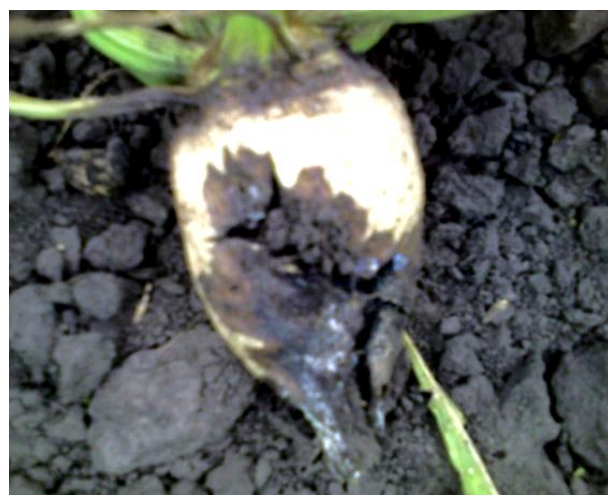
Применение химических средств защиты растений имеет ряд негативных последствий: формирование устойчивых рас фитопатогенов, уменьшение численности полезных микроорганизмов в микробиоценозах и накопление токсических веществ в почве [7]. Альтернативный подход предполагает создание биологических способов защиты растений от болезней с использованием биопрепаратов. Основа таких биопрепаратов – высокоактивные штаммы микробов-антагонистов возбудителей болезней [8-9]. В этом плане наиболее перспективным является использование целлюлолитических бактерий рода *Bacillus* [10], физиолого-биохимические свойства которых (высокая скорость роста, неприхотливость к источникам питания, простота культивирования и др.) обеспечивают их высокую технологичность при производстве биомассы. Кроме того, в силу своих биологических особенностей, таких, как популяционная устойчивость и способность к синтезу антифунгальных метаболитов, они являются активными антагонистами грибов. В этой связи предположили, что среди них возможно присутствие активных антагонистов патогенных грибов, вызывающих корневые гнили сахарной свеклы.

Задачей исследования явилось выделение из ризосферы здоровых растений сахарной свеклы



здоровое растение

пораженное растение



корневая гниль корнеплода

Рисунок 1 - Поражение корней проростков и корнеплодов сахарной свеклы корневыми гнилями

целлюлолитических бактерий-антагонистов и стимуляторов роста, отбор наиболее активных штаммов с целью создания на их основе биопрепаратов для защиты сахарной свеклы от корневых гнилей.

Материалы и методы исследования

Из ризосферы и ризоплана здоровых растений сахарной свеклы на полях Алматинской области были выделены 43 изолята целлюлолитических бактерий. Чистые культуры бактерий были получены после их селекции на селективной среде Гетчинсона с пшеничной соломой, взятой в качестве источника углерода и энергии. При детальном исследовании было отобрано 12 штаммов, характеризующих повышенной антифунгальной активностью.

В качестве фитопатогенных тест-культур использовали грибы рода *Fusarium*: *Fusarium oxysporum* M2 и три штамма *F. solani*: *F. solani* (ros.), *F. solani* M3, *F. solani* M4. Эти фитопатогены были выделены из пораженных проростков и корнеплодов сахарной свеклы в 2010-2011 году в Алматинской и Джамбульской областях Республики Казахстан и идентифицированы авторами статьи (рисунок 1-2).

Культивирование бактерий проводили на жидкой и твердой среде Гетчинсона. В качестве источника целлюлозы использовали пшеничную солому. Грибы выращивали на среде Чапека-7 и Сабуро.

Антагонистическую активность определяли по зонам угнетения роста фитопатогенных гри-

бов [11]. Для этого целлюлолитические бактерии выращивали на жидкой среде Гетчинсона. Тест-культуры фитопатогенных грибов засеивали глубинным способом в расплавленную и охлажденную до 400С среду и разливали в чашки Петри. После застывания агара из среды вырезали блоки. В полученные лунки заливали суспензию клеток бактерий с концентрацией 1×10^6 кл./мл из расчета 0,2 мл в каждую лунку. Чашки инкубировали при температуре 280-300С в термостате в течение 10 и более суток. Учет результатов проводили по величине зон подавления роста тест-культур. В качестве тест-культур фитопатогенных грибов использовали штаммы рода *Fusarium*, приведенные выше.

Для изучения ростостимулирующей активности штаммы бактерий выращивали на среде Гетчинсона в течение 5-7 суток. Семена сахарной свеклы перед посевом обрабатывали суспензией бактерий в концентрации 1×10^6 клеток на 1 г семян в течение 6-8 ч при комнатной температуре. В контроле семена зерновых замачивали в стерильной водопроводной воде. Через 7 суток определяли всхожесть семян, а через 10 суток проводили измерение надземной части и корней. Все результаты исследований были статистически обработаны [12].

Результаты исследований и их обсуждение

Из ризосферы и ризоплана здоровых растений сахарной свеклы были выделены культуры целлюлолитических бактерий, относящихся к

Таблица 1 - Антифунгальная активность целлюлолитических бактерий.

№ п./п.	Культуры бактерий	Средний диаметр зон подавления роста грибов, мм			
		<i>F. oxysporum</i> M2	<i>F. solani</i> (ros.)	<i>F. solani</i> M3	<i>F. solani</i> M4
1	21(8)	26±	25±	п.п.р.	22±
2	21N	0	15±	0	0
3	22Т	27+±	25±	20±	п.п.р.
4	60(5)4	17±	18±	п.п.р.	16±
5	80	0	23±	п.п.м.	п.п.м.
6	82	34±	27±	22±	п.п.р.
7	95	0	п.п.м.	п.п.м.	0
8	150	п.п.м.	п.п.м.	п.п.м.	18±
9	158	12±	п.п.р.	п.п.р.	201,9
10	177	14±	п.п.р.	п.п.р.	22±
11	212(м)	12±	п.п.м.	0	0
12	604	28±	п.п.р.	п.п.р.	28±

Примечание: п.п.м. – полное подавление образования воздушного мицелия по всему газону чашки; п.п.р. - полное подавление роста гриба по всему газону чашки.

родам *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium* and *Flavobacterium*. Из них было отобрано 18 штаммов, обладающих антагонизмом по отношению к фитопатогенным грибам рода *Fusarium*, вызывающим корневые гнили сахарной свеклы. При детальном исследовании было отобрано 12 штаммов, характеризующих по-вышенной антифунгальной активностью. С этими штаммами была продолжена дальнейшая работа.

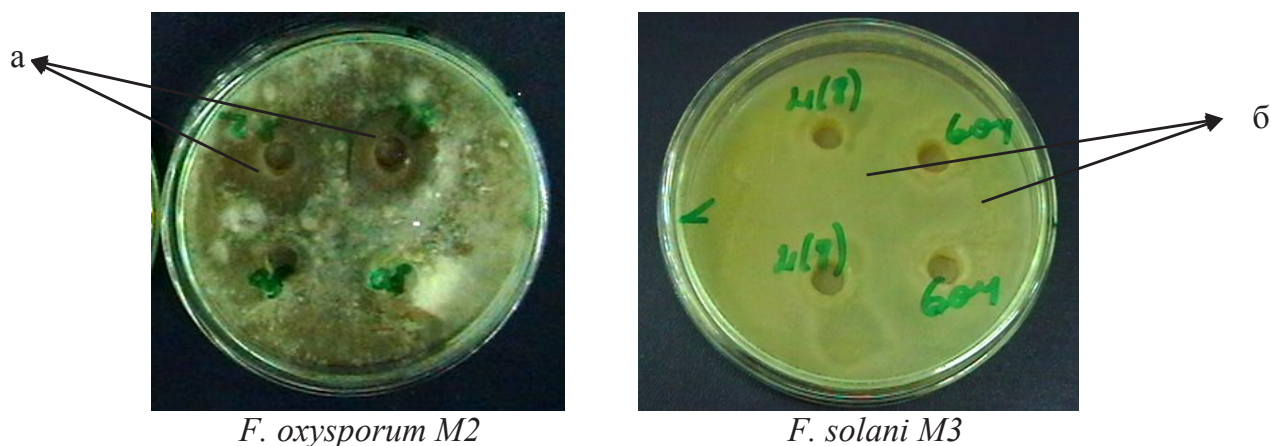
Данные по исследованию антагонистической активности целлюлолитических бактерий по отношению к фитопатогенным грибам, вызывающим корневые гнили сахарной свеклы представлены в таблице 1.

Из данных таблицы 1 следует, что все исследованные штаммы обладают антифунгальной активностью по отношению к грибным тест-организмам. Показано, что активность значительно варьирует в зависимости от штамма бактерий и исследуемого грибного фитопатогена. Установлено, что антагонистическая активность бактерий по отношению к фитопатогенным грибам проявлялась в виде фунгицидной или фунгистатической активности. Фунгистатическая активность выражалась в частичном или полном подавлении образования воздушного мицелия и спорообразования грибов или разреженным ростом по всему газону чашки, фунгицидная в виде полного или частичного подавления роста гриба (рисунок 1). В ряде вариантов отмечено также изменение цвета пигментации грибов.

Установлено, что из 12 культур 8 штаммов целлюлолитических бактерий подавляли рост и развитие гриба *F. oxysporum* M2, три штамма не оказывали на него антагонистического влияния. Все исследованные штаммы обладали антифунгальной активностью по отношению к грибу *F. solani* (ros.). Также показано, что практически все культуры бактерий подавляли рост фитопатогенных грибов *F. solani* M3 и *F. solani* M4, исключение составляли три штамма 21N, 212(м) и 95, которые не оказывали влияния на эти фитопатогены. По результатам полученных исследований отобрали 6 штаммов, характеризующихся высокой антагонистической активностью по отношению к тест-культурам фитопатогенных грибов: 21(8), 22Т, 82, 177 и 604. Исследование ростостимулирующей способности отобранных штаммов бактерий представлено в таблице 2.

По полученным данным было отобрано два штамма целлюлолитических бактерий 604 и 60(5)4, характеризующихся одновременно высокой антифунгальной активностью и способностью стимулировать рост сахарной свеклы.

Испытания эффективности отобранных штаммов в полевых условиях проводили совместно с ТОО «Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений» Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан. Семена сахарной свеклы сорта «Ялтушковская 30», рекомендованные для выращивания в Алматинской области Казахстана, инокулировали суспензией бакте-



а - зоны подавления роста гриба целлюлолитическими бактериями;
б - полное подавление роста гриба по всему газону чашки

Рисунок 2 - Влияние штаммов целлюлолитических бактерий на фитопатогенные грибы рода *Fusarium*

Таблица 2 - Влияние штаммов целлюлолитических бактерий на всхожесть и рост растений сахарной свеклы.

Штаммы бактерий	Длина стебля, см	Длина корня, см	Всхожесть, %
Контроль	12,8±	8,8±	82,6±
21(8)	17,1±	10,2±	89,7±
22Г	15,1±	9,7±	85,6±
60(5)4	18,3±	15,9±	89,9±
82	16,1±	14,2±	86,9±
177	14,1±	11,2±	89,1±
604	19,1±	17,9±	92,7±

рий и высевали на полях. Эталон служили семена, протравленные химическими препаратами ТМТД и Скор, зарегистрированные в Ка-

захстане, контролем служили необработанные семена. Полученные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Влияние инокуляции семян сахарной свеклы целлюлолитическими бактериями на всхожесть, пораженность проростков и урожай.

Варианты опыта	Густота всходов, шт./м ²	Поражение болезнями, %		Урожай, ц/га
		корнеед	фузариозная гниль корнеплодов	
604	74,0	17,2	7,1	304,0
60(5)4	73,1	17,8	8,3	300,0
ТМТД, 80% с.п. - 6,0 кг/т + Скор (0,4 л/га) (эталон)	72,7	18,5	10,0	280,0
Контроль	68,9	39,0	21,0	270,0

По результатам полевого опыта показана высокая перспективность применения целлюлолитических бактерий для обработки семян сахарной свеклы. В вариантах опыта, где семена обрабатывали целлюлолитическими бактериями, пораженность всходов фузариозами в 2,0 - 2,4 раза была ниже, чем в контроле, а пораженность корнеплодов снизилась в 2,1 - 3,1 раза по сравнению с контролем. При использовании бактерий значительно возросла

устойчивость растений к болезням, и прибавка урожая сахарной свеклы составила на 30-34 ц/га.

Таким образом, отобранные штаммы целлюлолитических бактерий 604 и 60(5)4, обладают высокой антагонистической и ростостимулирующей активностью и на их основе возможна разработка биопрепаратов комплексного действия для защиты посевов сахарной свеклы от корневых гнилей.

Литература

- 1 Джанузаков А.Д., Агатаев М.А. Болезни сахарной свеклы // Сельское хозяйство Казахстана. - 2001. - №4. - Р. 27-29.
- 2 Мауи А.А. Исходный материал для селекции сахарной свеклы на устойчивость к болезням корнеплодов // Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана. - 2003. - №4. - С. 31-32.
- 3 Абугалиев И.А., Костин Н.В. 2007. Свекловичные севообороты. Технология механизированного возделывания сахарной свеклы в условиях орошения Казахстана. – Алматы: Издательство Кайнар. - С. 28-39.

- 4 Казенас Л.Д. Список болезней сельскохозяйственных растений в Казахстане // Труды Республиканской Станции защиты растений. - 1990. - Т.98. - Р. 45-51.
- 5 Агатаев М.А. Болезни сахарной свеклы и меры борьбы с ними // Сельское хозяйство Казахстана. - 2002. - № 2. - С. 32-33.
- 6 Мауи А.А., Исмухамбетов Ж.Д. и др. Комплексная система защиты посевов сахарной свеклы от вредителей, болезней и сорняков для условий юга и юго-востока Казахстана (Рекомендации). - Алматы: Изд-во «Бастау», 2012. - 32 с.
- 7 Reddy M. S., Krishna Kumar K. Vijey et al. , Scope and potential of First Asian Congress for Sustainable Agriculture // Abstr. First Asian PGPR Congress. Hyderabad, India. - 2009. - P.1-4.
- 8 Новикова И.И., Литвиненко А.И., Бойкова И.В., Ярошенко В.А., Калько Г.В. Биологическая эффективность новых микробиологических препаратов Алиринов Б и С для защиты растений от болезней в разных природно-климатических зонах // Микология и фитопатология. - 2003. - Т.37. - Вып.1.- С. 92-97.
- 9 Лабутова Н. М. Альтернатива минеральным удобрениям и пестицидам // Коммерческая биотехнология. - 2011 (<http://www.cbio.ru>).
- 10 Suo Y.L., Guo R.G, Li Sh. D., Zhu B. Rapid assessment of the potential of *Bacillus* strains against the infection with *Phytophthora capsici* // Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. Editors in Chief Reddy M.S., Qi Wang. Beijing, PR China: China Agr. Sci.& Technol. Press. - 2011.- P.176-181.
- 11 Егоров Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. - М.: Высшая школа, 2001. - 221 с.
- 12 Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. - Минск: Высшая школа. 2007. - 328 с.

References

- 1 Dzhanuzakov A.D., Agataev M.A. Bolezni saharnoj svekly // Sel'skoe hozjajstvo Kazahstana. - 2001. - №4. - R. 27-29.
- 2 Maui A.A. Ishodnyj material dlja selekcii saharnoj svekly na ustojchivost' k bo-leznjam korneplodov // Vestnik sel'skohozjajstvennoj nauki Kazahstana. - 2003. - №4. -S. 31-32.
- 3 Abugaliev I.A., Kostin N.V. 2007. Sveklovichnye sevooboroty. Tehnologija mehani-zirovannogo vzdelyvanija saharnoj svekly v uslovijah oroshenija Kazahstana. Almaty, Iz-datel'stvo Kajnar. P. 28-39.
- 4 Kazenas L.D. Spisok boleznej sel'skohozjajstvennyh rastenij v Kazahstane // Trudy Respublikanskoj Stancii zashhity rastenij. - 1990. - Т.98. - R. 45-51.
- 5 Agataev M.A. Bolezni saharnoj svekly i mery bor'by s nimi // Sel'skoe hozjajstvo Kazahstana. - 2002. - № 2. - S. 32-33.
- 6 Maui A.A., Ismuhambetov Zh.D. i dr. Kompleksnaja sistema zashhity posevov saharnoj svekly ot vreditel'ej, boleznej i sornjakov dlja uslovij Juga i Jugo-vostoka Kazahstana (Re-komendacii). Almaty: Izd-vo «Bastau», 2012. - 32 s.
- 7 Reddy M. S., Krishna Kumar K. Vijey et al. , Scope and potential of First Asian Congress for Sustainable Agriculture // Abstr. First Asian PGPR Congress. Hyderabad, India. - 2009. - P.1-4.
- 8 Novikova I.I., Litvinenko A.I., Bojkova I.V., Jaroshenko V.A., Kal'ko G.V. Biolo-gicheskaja jeffektivnost' novyh mikrobiologicheskikh preparatov Alirinov B i S dlja zashhity rastenij ot boleznej v raznyh prirodno-klimaticheskikh zonah // Mikologija i fitopatologija. - 2003. - Т.37. - Vyp.1.- S. 92-97.
- 9 Labutova N. M. Al'ternativa mineral'nym udobrenijam i pesticidam // Kommerche-skaja biotehnologija. - 2011 (<http://www.cbio.ru>).
- 10 Suo Y.L., Guo R.G, Li Sh. D., Zhu B. Rapid assessment of the potential of *Bacillus* strains against the infection with *Phytophthora capsici* // Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. Editors in Chief Reddy M.S., Qi Wang. Beijing, PR China: China Agr. Sci.& Technol. Press. - 2011.- P.176-181.
- 11 Egorov N.S. Mikroby-antagonisty i biologicheskie metody opredelenija antibio-ticheskij aktivnosti. M.: Vysshaja shkola. – 2001. - 221 s.
- 12 Rokickij P.F. Biologicheskaja statistika. Minsk: Vysshaja shkola. - 2007. - 328 s.