

УДК: 632.4:635.64:632.937

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ЗАЩИТЫ СЕЯНЦЕВ ХВОЙНЫХ ПУТЕМ ТВЕРДОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА 19/97M *STREPTOMYCES LATERITIUS SVESCHNIKOVA*

Т.И. Громовых, И.И. Гайдашева В.А. Ушанова, В.С. Садыкова, Г.А. Сизых

ГОУ ВПО «Сибирский государственный технологический университет»
660049 Красноярск, пр. Мира, 82

Проведены исследования по твердофазному культивированию биологически активного штамма 19/97 M *Streptomyces lateritius* на коре пихты и лиственницы и древесной зелени пихты. Показано, что штамм утилизирует субстраты и сохраняет свою активность и жизнеспособность в течение 6 месяцев. Полученный продукт после твердофазной ферментации может быть использован при создании биопрепаратов для защиты сеянцев хвойных от болезней, вызываемых микромицетами из родов *Fusarium* и *Alternaria*.

The solid phase cultivation of biological active strain 19/97 M *Streptomyces lateritius* on the larch bark and fir bark were investigated. It was shown that the strain can utilize the substrates and maintained the activity and vitality during six months. These kind of products can be recommended as a biopreparation for protection of coniferous seedlings from diseases caused *Fusarium Alternaria* genera.

ВВЕДЕНИЕ

Важной задачей современной экологии является выработка стратегии фитосанитарной оптимизации процессов лесовосстановления, направленной на обеспечение и внедрение новейших средств борьбы в систему интегрированной защиты растений. Наиболее распространенным и вредоносным заболеванием при выращивании сеянцев хвойных в лесных питомниках Средней Сибири является инфекционное полегание. Это заболевание вызывается грибами различных родов: *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Verticillium*, *Rhizoctonia* и *Cladosporium*. Наибольшую опасность для всходов и сеянцев хвойных представляют грибы рода *Fusarium*. Вызываемые видами этого рода заболевания включают поражение наземной и корневой части растений. Наиболее сильно страдают посевы хвойных (*Pinus*, *Picea* и *Larix*), в меньшей степени – посевы лиственных пород [1-4].

Составной частью стратегии защиты является разработка биологического метода, основанного на сохранении и насыщении биоценозов антагонистически активными в отношении фитопатогенов микроорганизмами. Биометод, в широком понимании, подразумевает изменение количественного, видового состава и взаимоотношений популяций микроорганизмов, а также влияние метаболитов на патогенную микробиоту при различных способах использования биопрепаратов в общей технологии возделывания культур. В настоящее время имеется небольшое количество работ, в которых приводятся сведения об использовании актиномицетов в защите от почвенных грибов – фитопатогенов сельскохозяйственных культур и сеянцев древесных растений. Большинство работ посвящено изучению возможности использования отдельных представителей рода *Streptomyces* в качестве потенциальных агентов биоконтроля [5-9]. Многие актиномицеты являются активными антагонистами фитопатоген-

ных грибов. Субстратный мицелий актиномицетов может проникать в ткани растений, не только поражая возбудителей различных заболеваний, но и предоставляя растению некоторые метаболиты, оказывающие оздоравливающий эффект. Известно, что антибиотические вещества, выделяемые актиномицетами, могут накапливаться в растениях, при этом повышается бактерицидность растительного сока и устойчивость растения к инфекциям [5-7].

К микроорганизмам-продуцентам биопрепаратов, представляющих собой живую культуру, предъявляются определенные требования. Они должны выживать и размножаться в новых для них условиях существования, выдерживая конкуренцию со стороны постоянных обитателей почвенного микробного сообщества. При этом они должны сохранять высокие агрессивные и патогенные свойства селективно по отношению к объекту воздействия биопрепарата, не подавляя при этом безвредную сапротрофную микрофлору и не разрушая структуру почвенного микробного сообщества [1,2, 7,10,11].

Во всероссийском научно-исследовательском институте защиты растений представлено некоторое количество актиномицетов – потенциальных продуцентов препаратов защиты растений. Новый штамм актиномицета *Streptomyces felleus*, выделенный из зоокомпоста, является антагонистом по отношению к фитопатогенным грибам и рекомендован для получения биопрепарата арилина. Штамм Р-21 актиномицета *Streptomyces chrysomallus*, выделенный из почв Прибалтики (Литва) и отобранный по признакам антагонистической и фиторегуляторной активности, депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов ВИЗР (коллекционный номер 150) и предназначен для получения полифункционального биопрепарата против фитопатогенных грибов и вирусов, стимулирующего рост и развитие растений [12].

В Сибирском государственном технологическом университете из почвы лесного питомника

Красноярского края выделен штамм 19/97M *Streptomyces lateritius* *Sveschnikova* и впервые предложен для стимулирования роста и защиты сеянцев хвойных от возбудителей болезней, вызываемых грибами родов *Fusarium* и *Alternaria* [13]. Однако внедрение полученного перспективного штамма возможно только при массовом получении на его основе биопрепарата. С этой целью проводятся исследования по разработке биотехнологии и подбору питательных сред для его культивирования.

При выявлении потенциальных возможностей микроорганизмов образовывать антибиотические вещества подбору сред необходимо уделять самое серьезное внимание. К настоящему времени предложено большое количество сред для культивирования актиномицетов. Недостатком этих сред является то, что на них также хорошо растут и многие бактерии. Для изучения разнообразия почвенных актиномицетов рекомендуют среды, содержащие в качестве углеродного субстрата крахмал, моно- и дисахара, процеженный отвар картофеля, пептон, гороховую муку, мясной, кукурузный, дрожжевой экстракт и другие [14,15]. В сравнении с другими бактериями почвенные актиномицеты более устойчивы к высушиванию и могут развиваться при низкой влажности питательного субстрата (8-10%). За исключением термофилов, актиномицеты характеризуются сравнительно небольшой скоростью роста даже в условиях лабораторных культур и достаточного снабжения легкоусвояемыми питательными веществами.

Перспективным биотехнологическим процессом получения биомассы актиномицетов может быть твердофазная ферментация растительных материалов [16]. Твердофазная ферментация – микробиологический процесс, протекающий в массе измельченного и влажного твердого сырья, имеющего различную форму и размеры частиц. Субстрат, используемый для твердофазной ферментации, должен содержать доступные питательные вещества для роста микроорганизмов: целлюлозу, крахмал, сахара – в качестве источников углерода; аммиак, мочевины, белки – в качестве источников азота, и минеральные соли.

По своим физическим свойствам субстрат может быть практически нерастворимым в воде (например, опилки), набухать в ней, принимать гелеобразное состояние или даже частично растворяться (например, крахмал), а также обладать достаточной влажностью. Влага может пропитывать частицы или образовывать пленку на их поверхности. Эффективность метода твердофазной ферментации зависит от используемого сырья, типа целевого продукта, особенностей микробной культуры и других причин. В мировой практике известны несколько технологических вариантов твердофазной ферментации, направленных на промышленное получение синтезируемых микроорганизмами ферментов, биологически активных веществ, антибиотиков и обогащенных белком кормовых препаратов [14-16].

Для массовой наработки биопрепарата путем твердофазной ферментации в разных странах мира

используются: зерно, отруби, солома пшеницы и сорго, свекловичный жом, торф, гуза-пая (коробочки хлопка, после сбора хлопковой ваты), шелуха подсолнечника и стебли кукурузы, виноградные выжимки. Состав сред оказывает существенное влияние на рост микроорганизмов [16]. Исследования по использованию остатков древесной массы (коры, опилок, хвои) для культивирования актиномицетов крайне мало. В связи с этим целью работы было провести подбор питательных сред для культивирования антагонистически активного штамма 19/97M *Streptomyces lateritius* и оценить его активность после культивирования на различных питательных субстратах.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служил штамм 19/97M вида *Streptomyces lateritius* (ВКПМ Ас 1637), выделенный из почвы лесного питомника Красноярского края. Для оценки антибиотической активности в качестве тест-объекта использовали изолят *Fusarium oxysporum*. Изучение биологической активности метаболитов штамма проводили на семенах *Larix sibirica* L.

МЕТОДЫ ВЫРАЩИВАНИЯ ПРОДУЦЕНТА

Изучение процесса микробного биосинтеза обычно начинается с исследования динамики роста периодической культуры. Цикл развития периодической культуры начинается с засева среды. Засев осуществляется в таком количестве, которое обеспечивает начало роста микроорганизмов с минимальной задержкой или даже лаг-фазы. Оценку антибиотической активности штамма 19/97M *Streptomyces lateritius* на шестые сутки культивирования на твердых субстратах осуществляли путем высева продуцента на жидкую крахмало-аммиачную среду.

Процесс твердофазного культивирования осуществляли на древесной зелени пихты, коре лиственницы и коре пихты после CO₂-экстракции, каждую из которых использовали в виде трех фракций: 0,25-1 мм, 1-3 мм, 3-5 мм. Культивирование проводили в конических колбах на 500 мл на субстратах (20 г), увлажненных до 80 %, добавляли разные источники азота (NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, KNO₃) и подвергали стерилизации. Субстраты инокулировали агаровыми блочками штамма 19/97M *Streptomyces lateritius*. Культивирование проводили при температуре от 25 до 27 °С в течение 30 сут. После культивирования исследуемого штамма массу тщательно перемешивали, образцы в количестве 1 г смывали водой в объеме 50 мл. Учет продуктивности штамма проводили определением численности колониеобразующих единиц (КОЕ) методом посева серийных разбавлений из смыва с 1 г полученного продукта после культивирования на твердых питательных средах.

Биологическую активность препарата изучали на водных экстрактах. Для получения экстрактов продукт после твердофазного культивирования

штамма 19/97 М *Streptomyces lateritius* помещали в стерильную воду в количестве 1 г на 50 мл и экстрагировали в течение 24 часов при температуре 28-30 °С. Полученный экстракт использовали для оценки на токсичность в отношении семян лиственницы сибирской и антибиотическую активность в отношении тест-фитопатогена.

Семена растений выдерживали в экстрактах в течение 24 ч при температуре 25 °С. Для каждого варианта брали по 50 семян в четырехкратной повторности. После суточного замачивания семена раскладывали на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри, увлажняли равным количеством водопроводной воды и проращивали в течение 5-7 дней при постоянной температуре. Учитывали показатели энергии прорастания и всхожести семян. Токсичными считаются вещества, вызывающие снижение всхожести семян или угнетение роста проростков и корней не менее чем на 30 % по сравнению с контролем.

Сохраняемость штамма в полученном продукте определяли при хранении его в течение 6 месяцев. Биомассу штамма 19/97М *Streptomyces lateritius*, полученную на твердых питательных субстратах (древесная зелень, кора пихты, кора лиственницы), помещали в стерильные бюксы, высушивали в сушильном шкафу до постоянной массы при температуре 40 °С в течение шести суток. По истечении данного времени проводили оценку жизнеспособности штамма ежемесячно на модифицированной крахмало-аммиачной среде методом посева серийных разбавлений из смыва с 1 полученного продукта. Численность *Streptomyces lateritius* пересчитывали по значениям титров после хранения в сравнении с исходным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение биопестицидов в настоящее время является трудно решаемой задачей, так как не разработаны технологии массового наращивания продуцентов. Большая часть продуцентов биологических препаратов защиты растений представляет собой продуценты на основе грибов. Для получения биопрепаратов на основе актиномицетов подобные исследования не проводились. В связи с этим представлялось интересным оценить способность штамма 19/97 М *Streptomyces lateritius* расти на твердых питательных субстратах.

Исследования показали, что для культивирования лучше использовать растительные субстраты размером фракций 1-3 мм, фракции других размеров менее эффективны для роста *Streptomyces lateritius* с целью получения биопрепаратов. Продуцент хорошо растет на коре лиственницы и древесной зелени пихты, о чем свидетельствовали показатели его численности (рис. 1). В массе коры лиственницы и на древесной зелени пихты, начиная с четвертых суток культивирования, появляется пигмент, синтезируемый продуцентом.

Численность актиномицета уже на 10-е сутки культивирования на древесной зелени пихты составила $1,91 \cdot 10^{11}$ КОЕ·г⁻¹, а на 30 - е сутки – $2,19 \cdot 10^{11}$

КОЕ·г⁻¹. На коре пихты численность продуцента была существенно ниже, хотя имела вполне высокий титр для использования в почве в качестве биологического пестицида. Таким образом, данные доказывают, что кору хвойных, а также древесную зелень пихты можно использовать в качестве питательных субстратов для твердофазной ферментации с целью накопления биомассы продуцента.

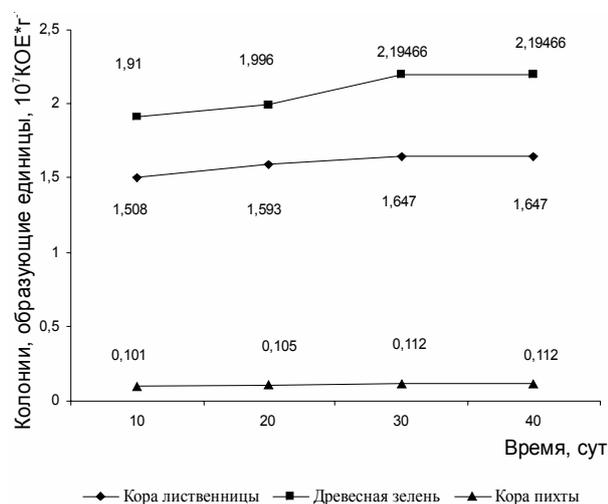


Рисунок 1 – Динамика численности (КОЕ) штамма 19/97 М *Streptomyces lateritius* на растительных субстратах в течение 40 суток

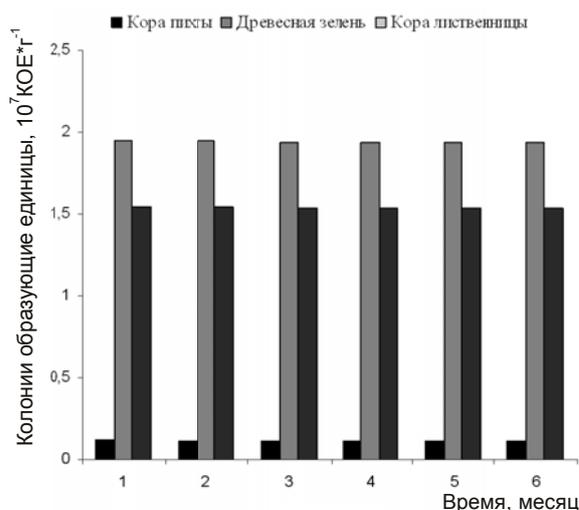
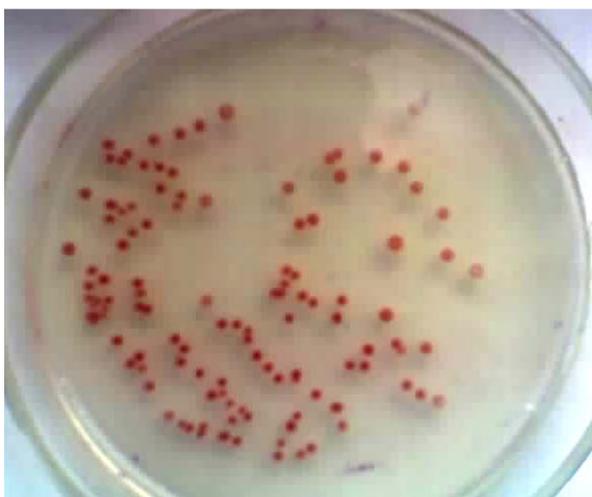
Комплекс метаболитов, выделяемый актиномицетом, содержит ряд веществ, обладающих способностью стимулировать рост и прорастание семян хвойных. Результаты исследований, проведенных на семенах лиственницы, показали, что большое количество этих веществ выделяется актиномицетом при твердофазном способе культивирования микроорганизма. Метаболиты актиномицета при культивировании на коре хвойных после СО₂-экстракции и древесной зелени пихты оказывают лучшее действие на прорастание семян лиственницы сибирской, чем метаболиты при выращивании продуцента на стандартной среде (табл. 1). Кроме того, штамм не теряет свою антибиотическую активность в отношении тест-фитопатогена *Fusarium oxysporum*, вызывающего фузариоз семян хвойных.

Штамм хорошо сохраняет свою жизнеспособность в полученном препарате в течение шести месяцев хранения при температуре 21-22 °С, с титром на древесной зелени – $2,2 \cdot 10^{11}$, на коре лиственницы – $1,6 \cdot 10^{11}$, на коре пихты – $0,1 \cdot 10^{11}$ КОЕ·г⁻¹ (рис.2). Достоверность различий численности по критерию Фишера при хранении нет, то есть биомасса может храниться длительный период времени, не теряя жизнеспособности.

Высокая антагонистическая активность штамма обуславливается большим количеством антимикробных метаболитов, которые штамм синтезирует в процессе культивирования. Это обеспечивает сохранение его стабильности и отсутствие инфицирования посторонней микрофлорой в смеси биомассы штамма с растительными остатками.

Таблица 1 – Биологическая активность водных экстрактов из биомассы штамма 19/97M *Streptomyces lateritius* после твердофазного культивирования

Водный экстракт	Зона подавления роста (мм) <i>Fusarium oxysporum</i>	Энергия прорастания семян <i>Larix sibirica</i> L.	Всхожесть семян <i>Larix sibirica</i> L.	Инфицируемость семян <i>Larix sibirica</i> L.
<i>Streptomyces lateritius</i> на коре пихты	12,7±1,4	68,7±3,4	78,7±3,4	6,0±0,7
<i>Streptomyces lateritius</i> на коре лиственницы	10,7±1,7	62,5±3,4	76,5±2,7	2,2±0,1
<i>Streptomyces lateritius</i> на древесной зелени пихты	14,7±1,2	66,7±3,4	84,2 ±3,7	1,6±0,4
Метаболиты штамма <i>Streptomyces lateritius</i> на среде Чапека	9,3±1,5	58,7±3,4	82,7±1,7	2,4±2,8
Контроль (вода)	0	46,4±2,8	66,4±2,8	7,4±0,8

**Рисунок 2 - Численность (КОЕ) штамма 19/97M *Streptomyces lateritius* на растительных субстратах при хранении****Рисунок 3 – Характер роста смыва на КАА из продукта после поверхностного твердофазного культивирования штамма 19/97 M *Streptomyces lateritius* на коре пихты**

Микробиологический контроль при посеве на питательные среды показал, что основную массу живых пропагул в продукте составляет штамм 19/97M

Streptomyces lateritius (рис. 3).

Таким образом, кора хвойных после CO₂-экстракции и древесная зелень пихты могут быть использованы в качестве субстрата для твердофазной ферментации нового антагонистически активного штамма 19/97M *Streptomyces lateritius* – продуцента биологического препарата.

Комплекс метаболитов актиномицета, выделяемый в культуральную жидкость, содержит ряд веществ, обладающих способностью стимулировать рост и прорастание семян хвойных. Результаты исследований, проведенных на семенах лиственницы, ели показали, что большое количество этих веществ выделяется актиномицетом при твердофазном способе культивирования микроорганизма. Метаболиты актиномицета, при культивировании штамма 19/97 M *Streptomyces lateritius* на коре лиственницы и коре пихты после CO₂-экстракции и древесной зелени пихты, оказывают на прорастание семян большее действие, чем метаболиты при выращивании продуцента на стандартной среде.

Полученный путем твердофазной ферментации биопрепарат проходит испытания в лесных питомниках Красноярского края и Республики Тыва при выращивании сеянцев хвойных пород.

Научные исследования выполнены при поддержке грантами РФФИ 06-04-08040-офия «Создание высокопродуктивных устойчивых к патогенам форм хвойных растений в культуре *in vitro*, на основе современных достижений в области половой репродукции голосемянных» и ФЦНП № 2466 «Развитие гербарной коллекции и музея культур грибов Средней Сибири как базы для научно-образовательного процесса».

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Громовых, Т.И. Биологический контроль болезней сеянцев хвойных в лесных питомниках Средней Сибири / Т.И. Громовых, Ю.А. Литовка, О.Н. Андреева. – Красноярск: СибГТУ, 2005. – 264 с.
2. Lewis J.A. Integrated control of Rhizoctonia fruit rot of cucumber / J.A. Lewis, C.C. Papavizas // Phytopathology. -1980. - V.70. - 85-89 p.
3. Тулемисова, К.А. Микробиологические методы защиты растений / К.А. Тулемисова // Вестник АН КазССР. – 1990. – 36 с.
4. Рекомендации по защите от заболеваний сеянцев хвойных пород лесных питомников Красноярского

- края / И.С. Коссинская. – Красноярск, 1971. – 52 с.
5. Терехова, Л.П. Поиск продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов / Л.П. Терехова. - Алма-Ата: Гылым, 1990. – 118 с.
 6. Zhilu Ai, Zhengqiang Jiang, Lite Li, Wei Deng, Isao Kusakabe, Huishang Li Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xyloligosaccharide production // *Process Biochemistry* Volume 40. - Issue 8. - 2005. - P. 2707-2714.
 7. Brinda Mahadevan and Don L. Crawford Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108 // *Enzyme and Microbial Technology* Volume 20, Issue 7, 1997, P. 489-493.
 8. Mameri, N. Batch zinc biosorption by a bacterial nonliving *Streptomyces rimosus* biomass / N. Mameri et al // *Water Research*. -1999. - Volume 33. - Issue 6. -P. 1347-1354.
 9. Samir, S. Szabó Hydrocarbon uptake by *Streptomyces* / S. Samir et al // *FEMS Microbiology Letters* - Volume 169.- Issue 1. – 1998. - P. 87-94.
 10. Dumroese, R.K. Interaction among *Streptomyces griseoviridis*, *Fusarium* root disease, and Douglas-fir seedlings / R.K. Dumroese, R.L. James, Wenny D.L // *New Forest*. - 1998. - V.15. - P. 181-191.
 11. А.с. 1042.349 СССР, МКИ7 С 12 N / Тулемисова, К.А. Штамм *Streptomyces griseoruber* 3-79 №314 продуцент антибиотика для борьбы со слизистым бактериозом капусты / К.А. Тулемисова, Е.Ф. Игина, Е.Т. Никитина (СССР). – опубл. 16.05.1983 Бюл. №. – 8 с.
 12. Бурцева, С.А. Перспективы применения метаболитов актиномицетов для предпосевной обработки семян / С.А. Бурцева, А.Ф. Тодераш, И.О. Растимешина // *Регуляторы роста и развития растений: мат-лы IV междунар. науч.-практ. конф.* - М., 1997. – 157 с.
 13. Пат. 2261902 Российская Федерация, МПК7 С 12 N 1/20, А 01 N 63/00. Штамм актиномицета *Streptomyces lateritius* 19/97M, используемый для стимулирования роста и защиты семян хвойных от возбудителей болезней, вызываемых грибами родов *Fusarium* и *Alternaria* / Громовых Т.И., Литовка Ю.А., Садыкова В.С.; заявители и патентообладатели: Сибирский гос. технологич. ун-т, Красноярский гос. ун-т. – № 2003100579/13; заявл. 08.01.2003; опубл. 10.10.2005, Бюл. № 28. - 8 с.
 14. Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров. – М.: МГУ, 2004.–512 с.
 15. Семенов, С.М. Лабораторные среды для актиномицетов / С.М. Семенов. - М., 1990. – 328 с.
 16. Твердофазная ферментация обрезков виноградной лозы базидиомицетами – источник белково-ферментных препаратов / В.И. Элисашвили [и др.] // *Превращения древесины при энзиматическом и микробиологическом воздействиях: тез. докл. 3-го научного семинара.* - Рига, 1988. – С. 183 – 190 .
 17. Головлева, Л.А. Биохимия разложения лигнина микроорганизмами / Л.А. Головлева, О.В. Мальцева // *Проблемы био онверсии растительного сырья.* – М.: Наука, 1986. – 295 с.
 18. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. – М.: Колос, 1983. – 173 с.
 19. Оболенская, А.В. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы / А.В. Оболенская, З.П. Ельницкая, А.А. Леонович. – М.: Экология, 1991. – 320 с.

Поступила в редакцию 9 июля 2007 г.
Принята к печати 26 ноября 2007 г.