

М.Ю. Русакова, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова, А.А. Косюга

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: + 38 (0482) 63 57 61,
e-mail: rusaMariya@onu.edu.ua

АНТИФУЗАРІОЗНА АКТИВНІСТЬ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ ДЕЯКИХ ШТАМІВ РОДУ *PSEUDOMONAS*

Проведено вивчення впливу бактерій роду Pseudomonas на ріст дейтеромицетів роду Fusarium. Показано, що антифузаріозна активність залежить від виду та штаму мікроорганізму. Найвищий рівень антагоністичної активності спостерігався на четверту добу культивування бактерій та був більш вираженим для штамів P. aeruginosa. Продукти метаболізму, отримані при вирощуванні штамів P. aeruginosa ONU 302 та P. aureofaciens ONU 304, виявилися ефективними для захисту насіння огірка від ураження фітопатогенними фузаріями. Екзометаболіти P. aureofaciens ONU 304 інгібували ріст грибів роду Fusarium як навколо насіння огірка Cucumis sativus L. сорт Трой F1, так і на його поверхні.

Ключові слова: P. aureofaciens, P. fluorescens, P. aeruginosa, продукти метаболізму, антифузаріозна активність, Fusarium spp.

Серед мікроорганізмів, що найінтенсивніше використовуються для створення біопрепаратів, окреме місце займають представники роду *Pseudomonas*. Вони є продуцентами значної кількості (понад 200) сполук: регуляторів росту рослин (у тому числі індоліл-3-оцтової кислоти, що стимулює розвиток кореневої системи) [2, 7], сидерофорів, які виконують функцію захоплення і транспорту феруму [5]; антибіотиків (феназинів, флуороглюцину, піолотеорину, піролнітрину, ооміцину А та ін.) [6]; а також численних гідролітичних ферментів (фосфатаз, целюлаз, протеаз) [11], що покращують живлення рослин та впливають на ріст ґрунтових патогенів.

На основі псевдомонад сьогодні створено понад два десятки препаратів, що застосовують для підвищення врожайності сільськогосподарських культур, зменшення терміну проростання насіння та його захисту від фітопатогенів [10].

У зв'язку з цим, найактуальнішим для боротьби із фітозахворюваннями, зокрема, фузаріозами, та створення інтегрованої системи захисту рослин, стає розробка та використання альтернативних засобів, наприклад, біопрепаратів [11]. Так, обробка посівного матеріалу, а також самих

рослин, бактеріями деяких видів ґрунтових мікроорганізмів, у тому числі, непатогенними для людини штамми псевдомонад, може істотно знизити ураженість рослин фітопатогенами [9].

Метою даної роботи було вивчення антагоністичної активності бактерій роду *Pseudomonas* щодо грибів *F. oxysporum*, *F. graminearum* та *F. sporotrichiella*.

Матеріали і методи

В роботі використовувалися штами псевдомонад *P. aureofaciens* ONU 304, *P. aureofaciens* ONU 305, *P. fluorescens* ONU 303, *P. aeruginosa* ONU 300, *P. aeruginosa* ONU 301, *P. aeruginosa* ONU 302 та недосконалих грибів *F. oxysporum* BSEC 101, *F. graminearum* BSEC 102, *F. sporotrichiella* BSEC 103. Визначення антагоністичної активності *Pseudomonas spp.* щодо представників дейтероміцетів здійснювали за методом агарових блоків [1].

Бактеріальні штами *P. aureofaciens* та *P. fluorescens* попередньо вирощували на щільному середовищі Кінг А протягом 24 год при температурі 22 °С, штами *P. aeruginosa* — при 37 °С.

Для отримання робочих суспензій грибів з 5-добових культур *Fusarium spp.*, вирощених на скошеному картопляному агарі при 22 °С, робили змиви стерильним фізіологічним розчином. Оптичну щільність даних суспензій доводили до $1 \cdot 10^9$ КУО/мл за допомогою спектрофотометра "Spekol-10" (Німеччина). Підготовлену таким чином суспензію вносили по 0,5 мл у 20 мл розплавленого МПА (45 °С), після чого середовище розливали в чашки Петрі. На поверхні агару розміщували агарові блоки, що були вирізані з газону добових бактеріальних культур псевдомонад.

Величину діаметру зони відсутності росту фітопатогенів навколо бактеріальних блоків (у мм) оцінювали на 1, 2, 4, 6 та 8 добу інкубації, розраховуючи як середнє арифметичне трьох вимірів випадково обраних проєкцій [2, 3]. Для кожного варіанту кількість повторів складала 5.

Визначення протифузаріозної активності вторинних екзометаболітів *Pseudomonas spp.* проводили з використанням насіння огірка *Cucumis sativus* L. сорт Трой F1 [4]. Насіння (20–40 шт.) замочували на 24 год у культуральній рідині псевдомонад, що росли в середовищі Кінг А. Контролем слугували стерильні дистильована вода (контроль негативний, К–) та рідке поживне середовище для *Pseudomonas spp.* (контроль середовища, К_c), а також 0,5% розчин тетраметилтиурамідсульфіду (ТМТД) (контроль позитивний, К+) [5].

Перед замочуванням поверхню насіння стерилізували в 32% розчині перекису водню впродовж 30 с та промивали стерильною водою впродовж 5 хв.

На поверхні МПА, що містив *Fusarium spp.*, розміщували різні варіанти попередньо обробленого насіння та інкубували впродовж 7 діб при 22 °С.



Облік результатів відбувався на 4, 6 та 8 добу за визначенням відсутності росту дейтеромицетів навколо насіння та на його поверхні [8]. Для кожного варіанту експеримент здійснювався двічі, у кожному варіанті досліду кількість насіння була не менше 50 шт.

При порівняльному аналізі результатів досліджень використовувався t-критерій Стьюдента. Достовірною вважалася різниця при значенні показника $p \leq 0,05$. Статистичне опрацювання результатів здійснювали, застосовуючи програму Excel-2007.

Результати та їх обговорення

Порівняльний аналіз антагоністичної активності псевдомонад щодо досліджуваних грибів показав, що ступінь прояву впливу мав видо- та штамспецифічний характер (табл. 1).

Таблиця 1

Антагоністична активність бактерій роду *Pseudomonas* щодо *Fusarium spp.*

Table 1

Antagonistic activity of *Pseudomonas* strains to *Fusarium spp.*

Штам псевдомонад	Діаметр зони затримки росту*, мм		
	<i>F. oxysporum</i> BSEC 101	<i>F. graminearum</i> BSEC 102	<i>F. sporotrichiella</i> BSEC 103
<i>P. aeruginosa</i> ONU 300	62±2	54±2	84±4
<i>P. aeruginosa</i> ONU 301	28±3	44±3	34±3
<i>P. aeruginosa</i> ONU 302	48±3	60±4	75±3
<i>P. fluorescens</i> ONU 303	0	0	0
<i>P. aureofaciens</i> ONU 304	24±4	44±2	18±2
<i>P. aureofaciens</i> ONU 305	10±2	0	0

Примітка: * — діаметр зони затримки росту відповідного дейтеромицета навколо агарового блоку з бактеріальною культурою на четверту добу культивування (діаметр блоку — 4 мм).

Для більшості штамів псевдомонад антифунгальний вплив зростає впродовж перших двох діб. У ході експериментів зафіксовано, що максимального значення зона затримки росту дейтеромицетів досягала на четверту добу культивування мікроорганізмів.

Так, штам *P. aeruginosa* ONU 302 викликав майже 12-кратне збільшення зони відсутності росту *F. oxysporum* BSEC 101 у порівнянні із вихідним діаметром агарового блоку культури. На відміну від цього, штам *P. aeruginosa* ONU 300 призводив до затримки росту цього гриба



(62±2 мм). При збільшенні терміну взаємодії рівень антагоністичної активності в цілому знижувався, але у випадку штамів виду *P. aureofaciens* вплив залишався практично незмінним. Базуючись на отриманих даних, досліджувані бактеріальні штами можна розташувати в порядку зменшення антифунгальної активності таким чином: *P. aeruginosa* ONU 300 > *P. aeruginosa* ONU 302 > *P. aeruginosa* ONU 301 > *P. aureofaciens* ONU 304 > *P. aureofaciens* ONU 305. Штам *P. fluorescens* ONU 303 взагалі не виявив антагоністичної активності щодо *F. oxysporum* BSEC 101.

Рівень протифузаріозної активності штамів *P. aeruginosa* ONU 300 та ONU 302 щодо *F. graminearum* BSEC 102 був на 20–25% вищим, ніж для *P. aureofaciens* ONU 304 та *P. aeruginosa* ONU 301. Значення протифузаріозної активності для двох останніх штамів були однаковими.

Штами *P. fluorescens* ONU 303 та *P. aureofaciens* ONU 305 не виявили антагоністичних властивостей щодо *F. graminearum* BSEC 102.

На відміну від попередніх видів дейтероміцетів штам *F. sporotrichiella* BSEC 103 виявився чутливішим до дії продуктів метаболізму псевдомонад. Діаметр зони затримки росту цього фітопатогена був більше ніж 80±4 мм за дії *P. aeruginosa* ONU 300. Аналогічний рівень антифузаріозної дії був властивий для штаму *P. aeruginosa* ONU 302 (75±3 мм).

Серед інших видів псевдомонад лише *P. aureofaciens* ONU 304 виявив антифунгальну активність, яка була в 2–4 рази меншою, ніж у штамів *P. aeruginosa*.

Таким чином, в ході експерименту було встановлено, що більшість досліджуваних псевдомонад показали найвищий рівень антагонізму на четверту добу культивування, який був більш вираженим у випадку штамів *P. aeruginosa*. *P. aureofaciens* ONU 305 та *P. fluorescens* ONU 303 практично не пригнічували ріст представників дейтероміцетів.

Попередню обробку насіння огірків *Cucumis sativus* L. сорту Трой F1 культуральною рідиною псевдомонад, для захисту від ураження *Fusarium spp.* було проведено для штамів, що виявили антифунгальну активність у попередніх експериментах (табл. 2).

Екзометаболіти досліджуваних псевдомонад виявились ефективнішими у захисті посівного матеріалу від фузаріозної інфекції ніж тетраметилтиурамідсульфід (К+). Так, на 4 добу експерименту всі культури недосконалих грибів уражали насіння огірка *Cucumis sativus* L. сорт Трой F1, попередньо оброблені розчином тетраметилтиурамідсульфіда.

Найбільш виражена протифузаріозна активність культуральних фільтратів *Pseudomonas spp.* щодо дейтероміцетів була відмічена для *P. aureofaciens* ONU 304. Продукти метаболізму, що продукуються штамом цього виду псевдомонад, характеризувалися антимікробною дією щодо всіх досліджених штамів *Fusarium spp.* впродовж експерименту. У цьому випадку не було виявлено росту *F. oxysporum* BSEC 101 та *F. sporotrichiella* BSEC 103 як навколо насіння так і на його поверхні. Гриб *F. graminearum* BSEC 102 не контамінував поверхні насіння огірків.



Таблиця 2

Вплив продуктів метаболізму досліджуваних штамів псевдомонад на ураженість насіння огірків дейтеромицетами

Table 2

The influence of the studied *Pseudomonas* secondary metabolites on the cucumber seed deuteromycetes affection

Вид дейтеромицета	Час, доба	<i>P. aureofaciens</i> ONU 304	<i>P. aeruginosa</i> ONU 300	<i>P. aeruginosa</i> ONU 301	<i>P. aeruginosa</i> ONU 302	К-	К+	К _c
<i>F. oxysporum</i> BSEC 101	4	+++*	++	+++	++	-	++	-
	6	+++	++	++	++	-	+	-
	8	+++	+	++	+	-	+	-
<i>F. graminearum</i> BSEC 102	4	++	++	++	+++	-	++	-
	6	++	++	+	+++	-	+	-
	8	++	++	-	++	-	+	-
<i>F. sporotrichiella</i> BSEC 103	4	+++	++	++	++	-	+	-
	6	+++	++	+	+	-	+	-
	8	+++	+	+	+	-	-	-

Примітка: *Оцінку захисної дії продуктів метаболізму псевдомонад від ушкодження грибами здійснювали за шкалою:

- +++ – відсутність росту гриба навколо насіння та на його поверхні;
- ++ – ріст гриба навколо насіння та відсутність ознак контамінації поверхні насіння;
- +

Ефективність застосування продуктів метаболізму досліджуваних штамів *P. aeruginosa* для захисту насіння огірка була меншою. Суттєвий рівень антифузаріозної активності виявлено лише при використанні культуральної рідини *P. aeruginosa* ONU 302 щодо *F. graminearum* BSEC 102. Для інших штамів *P. aeruginosa* антимікробна дія їх метаболітів була дещо нижчою. Мінімальний інгібуючий вплив був зафіксований за дії метаболітів *P. aeruginosa* ONU 301 на *F. graminearum* BSEC 102.

Таким чином, проведені дослідження показали наявність антимікробної дії продуктів метаболізму штамів *P. aeruginosa* ONU 300, ONU 300 та ONU 302 та *P. aureofaciens* ONU 304 на ріст недосконалих грибів *F. oxysporum* BSEC 101, *F. graminearum* BSEC 102, *F. sporotrichiella* BSEC 103 та перспективність застосування їх для захисту рослин від збудників фузаріозних інфекцій.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бадалян С.М., Топчян А.В. Исследование природных противогрибковых средств растительного происхождения // Успехи медицинской микологии. — 2003. — Т. 14. — С. 88–90.
2. Акимова Е.Е., Минаева О.М., Гущина Ю.А., Евдокимов Е.В. Бактерии *Pseudomonas* sp. В-6798 как антагонисты роста фитопатогенных грибов и стимуляторы роста растений // Труды ТГУ: Серия биологическая. — 2004. — Т. 266. — С. 55–59.
3. Конурбаева М.У., Доолоткельдиева Т.Д. Антагонистические свойства бактерий рода *Pseudomonas* // Fen Bilimleri Dergisi. — 2008. — Т. 9. — С. 9–15.
4. Общая и молекулярная фитопатология / Ю.Т. Дьяков, О.Л. Озерцовская, В.Г. Джавахия, С.Ф. Багирова — М.: Изд-во Общества фитопатологов, 2001. — 302 с.
5. Сулейманова Л.Р., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Метаболиты бактерий рода *Pseudomonas*: экологичный механизм взаимодействия с растениями // Вестник Оренбургского государственного университета. — 2007. — № 75. — С. 338–340.
6. Corbell N., Loper J.E. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 // Bacteriol. — 1995. — 177. — P. 6230–6236.
7. Pessi G., Haas D. Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, CHAO // Microbiol. Lett. — 2001. — 200. — P. 73–78.
8. Sneh B., Dupler M., Elad Y., Baker R. Chlamyospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium* suppressive soils // Phytopathology. — 1994. — 74. — P. 1115–1124.
9. Tari P.H., Anderson A.J. *Fusarium* wilt suppression and agglutinability of *Pseudomonas putida* // Appl. Environ. Microbiol. — 1998. — 54. — P. 2037–2041.
10. Thomashow L. Biological control of plant root pathogens // Curr. Biol. — 1996. — 7. — P. 343–347.
11. Whipps J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // J. Exp. Bot. — 2001. — 52. — P. 487–511.

Стаття надійшла до редакції 04.06.2012 р.



М.Ю. Русакова, Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова, А.А. Косюга

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65058, Украина, тел.: + 38 (0482) 63 57 61,
e-mail: rusamariya@onu.edu.ua

АНТИФУЗАРИОЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ РОДА *PSEUDOMONAS*

Реферат

Проведено изучение влияния бактерий рода *Pseudomonas* на рост дейтеромицетов рода *Fusarium*. Показано, что антифузариозная активность зависит от вида и штамма микроорганизма. Наиболее высокий уровень антагонистической активности наблюдался на четвертые сутки культивирования и был более выраженным для штаммов *P. aeruginosa*. Продукты метаболизма, полученные при выращивании штаммов *P. aeruginosa* ONU 302 и *P. aureofaciens* ONU 304, оказались эффективными для защиты семян огурца от поражения их фитопатогенными фузариями. Экзометаболиты *P. aureofaciens* ONU 304 ингибировали рост грибов рода *Fusarium* как вокруг семян огурца *Cucumis sativus* L. сорт Трой F1, так и на их поверхности.

Ключевые слова: *P. aureofaciens*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, продукты метаболизма, антифузариозная активность, *Fusarium spp.*

М. Yu. Rusakova, B. M. Galkin, T. O. Filipova, A. A. Kosyuga

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: + 38 (0482) 63 57 61, e-mail: rusamariya@onu.edu.ua

ANTIFUSARIUM ACTIVITY OF SOME *PSEUDOMONAS* STRAIN EXOMETABOLITES

Summary

The influence of *Pseudomonas* bacteria on deuteromycetes growth has been studied. It was noted that antifusarium activity depended on the microorganism species and strain. The highest antagonistic activity value was observed on the fourth cultivation day and was more expressed for *P. aeruginosa* strains. The metabolism products obtained during the *P. aeruginosa* ONU 302 and *P. aureofaciens* ONU 304 strain growth were effective in protection cucumber seeds from being damaged by phytopathogenic fusariums. The *P. aureofaciens* ONU 304 exometabolites inhibited the growth of *Fusarium* fungi both around the seeds of *Cucumis sativus* L. variety Troy F1 and on their surface.

Key words: *P. aureofaciens*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, metabolism products, antifusarium activity, *Fusarium spp.*

