

Н.В. Ліманська, А.Г. Мерліч, М.Б. Галкін, І.Д. Жунько,
Н.І. Теслюк, І. Аврамович, В.О. Іваниця
Україна, 65082, Одеса, вул. Дворянська, 2,
Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
e-mail: limanska@gmail.com

РОЗРОБКА ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ДЛЯ ЗАХИСТУ РОСЛИН ВІД ФІТОПАТОГЕНІВ

Анотація. Дослідження впливу молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* і *Enterococcus italicus* на фітопатогенні та умовно-патогенні мікроорганізми *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Miscor* sp., *Penicillium* sp. показало, що досліджені штами-антагоністи були здатними пригнічувати фітопатогени як на поживних середовищах, так і на тест-рослинах, зменшуючи рівень прояву захворювання на 24,8 – 77,0 %. Досліджені штами молочнокислих бактерій були рекомендовані для розробки біопрепаратів для захисту рослин.

Ключові слова: молочнокислі бактерії, фітопатогени, біологічний захист рослин, антагоністи

Вступ. Органічне землеробство передбачає постійний пошук засобів біологічного контролю поширення фітопатогенів. Штами мікроорганізмів з цінними біотехнологічними властивостями можуть представляти собою ефективну заміну хімічним пестицидам, пригнічуючи патогени, і не впливаючи на навколишнє середовище. Молочнокислі бактерії з рослинного матеріалу характеризуються вираженими антагоністичними властивостями [5]. Антагоністичні властивості молочнокислих бактерій широко застосовуються у ферментації харчових продуктів, пробіотиках і постають перспективними для захисту рослин [3; 4; 6].

Метою дослідження було вивчення антагоністичної дії молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* та *Enterococcus italicus* до фітопатогенних мікроорганізмів *in vivo* та *in vitro*.

Матеріали і методи. Для культивування молочнокислих бактерій використовували середовище MRS [2] і стандартні умови інкубації (37 °С, 24-48 годин). Патогенні агробактерії, псевдомонади та ервінії вирощували у бульйоні LB при 28 °С і зберігали при мінус 80 °С у 30 % гліцерині. Фітопатогенні гриби культивували на середовищі Сабуро.

Досліджували антагоністичні властивості молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* та *Enterococcus italicus*, виділених з рослинного матеріалу. Штам *Agrobacterium tumefaciens* pJZ, мічений GFP, було люб'язно надано доктором Клей Фукуа (США) і доктором Ігорем Головльовим (Швеція).

Антагоністичну активність молочнокислих бактерій вивчали методом дифузії в агар на газонах фітопатогенів. Для приготування газонів фітопатогенних бактерій 200 мкл добової культури додавали до 20 мл розплавленого поживного агару МПА (HiMedia, Індія) (1% індикатора), перемішували та вносили в чашку Петрі. В агарі вирізали лунки діаметром 8 мм та в отримані лунки вносили по 50 мкл фільтратів стерильної культуральної рідини. Для визначення природи антагоністичних речовин органічні кислоти нейтралізували за допомогою 1М NaOH та стерилізували як описано вище. На першу-третю добу інкубації при кімнатній температурі відмічали наявність зон інгібування росту та вимірювали їх діаметр.

Дослідження *in vivo* проводили на експлантах моркви (*Daucus carota* L.). Добові культури молочнокислих бактерій наносили на поверхню експлантів моркви і додавали 100 мкл добових культур *R. radiobacter* C58 або *E. carotovora* ZM1. В якості контролів використовували експланти, на які наносили окремо фітопатогени та середовище MRS. Інкубацію здійснювали при кімнатній температурі протягом 15-30 діб.

Насіння крес-салату *Lepidium sativum* L. сорту Ажур стерилізували у 25 % H₂O₂ протягом 60 сек і три рази промивали у стерильній дистильованій воді (СДВ). Після цього насіння поміщали у стерильні чашки Петрі з вологим фільтрувальним папером і залишали для проростання на три дні при 20-24 °С.

Паростки і культури *L. plantarum* поміщали у стерильні пластикові лунки та інкубували протягом доби при 37 °С для утворення бактеріями біоплівки. Конкуренцію між *L. plantarum* і фітопатогеном на стадії прикріплення та утворення біоплівки вивчали на прикладі штама *Agrobacterium tumefaciens* pJZ, який несе ген *gfp*, що кодує зелений білок, що флуоресцює. У експерименті використовували штами *L. plantarum* з визначеними найкращими здатностями до утворення біоплівки. У якості тест-моделі використовували корені паростків томатів. Проводили три варіанти експериментів: (1) одночасна інокуляція коренів лактобацилами і агробактеріями, (2) інокуляція лактобацилами з додаванням агробактерій після того, як сформувалися біоплівки, (3) інокуляція агробактерій з наступною обробкою їх біоплівки лактобацилами. У випадку експериментів з конкурентного прикріплення 1 x 10⁸ КУО/мл кожного зі штамів (добові культури) одночасно вносили до паростків томатів у стерильних 48 лункових полістирольних планшетах та залишали на 24 год інкубації при 28 °С. У другому варіанті штами *L. plantarum* додавали разом з одним мл середовища MRS (100 мікролітрів добової культури), і після 24 год інкубації середовище замінювали на 1 мл LB зі 100 мкл добової культури агробактерій, після чого інкубували зразки протягом 24 годин. У третьому варіанті до коренів додавали агробактерії у LB, а через 24 години середовище замінювали на культуру лактобацил та інкубували протягом 24 годин.

Після інкубації проростки (20-24 у кожному варіанті, три незалежних експерименти) аналізували методом флуоресцентної мікроскопії за методикою Barahona et al. (2010) з деякими модифікаціями. Корені відрізували, фарбували 0,1 % кристалічного фіолетового протягом 40 сек, переносили на скельця та аналізували за допомогою оптичного епіфлуоресцентного мікроскопу CarlZeiss з 20x планахроматним об'єктивом і камерою Olympus DCM.

Результати та їх обговорення. За дослідження методом дифузії в агар бактерії штамів *L. plantarum* та *E. italicus* ОНУ 547 проявили антагоністичну активність проти усіх тестованих фітопатогенних бактерій. Зони пригнічення росту збудника бактеріального раку *R. radiobacter* C58 становили від $6,5 \pm 0,3$ до $7,7 \pm 0,3$ мм, збудника м'якої гнилі *Erwinia carotovora* ZM1 – від $5,3 \pm 0,3$ мм до $6,2 \pm 0,6$ мм, збудника бактеріального опіку *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8511–7,8 мм. Нейтралізована культуральна рідина штамів з рН 7,0 не чинила пригнічувального впливу, що вказувало на те, що інгібувальний ефект зумовлений дією органічних кислот молочнокислих бактерій.

У дослідах на експлантах моркви *E. italicus* ОНУ 547 пригнічували збудника бактеріального раку *Agrobacterium tumefaciens* C58 на 33 %, а у суміші з *L. plantarum* ОНУ 12 + *L. plantarum* ОНУ 311 рівень інгібування сягав 77 %. *E. italicus* ОНУ 547 інгібували *E. carotovora* ZM1 на 24,8 %, а суміш з трьох вищеперелічених штамів спричинила 33,3% пригнічення.

Крім фітопатогенних бактерій, досліджені антагоністи активно пригнічували фітопатогенні плісеневі гриби. Діаметри зон затримки росту *Penicillium* sp. під впливом культуральної рідини *L. plantarum* ОНУ 12, *L. plantarum* ОНУ 311 та *E. italicus* ОНУ 547 складали $1,3 \pm 0,2$, $1,5 \pm 0,1$ та $1,4 \pm 0,2$ см, відповідно. Метаболіти бактерій *L. plantarum* ОНУ 12 та *E. italicus* ОНУ 547 утворювали зони затримки росту на газоні *Mucor* sp. діаметром $1,3 \pm 0,2$ та $1,2 \pm 0,1$ см.

Обробка біоплівки *A. tumefaciens* pJZ на коренях паростків томатів суспензіями лактобацил (*L. plantarum* ОНУ 12, ОНУ 333 і ОНУ 355) призвела до повного руйнування біоплівки патогена. На коренях не було знайдено жодної клітини *A. tumefaciens* pJZ. Якщо агробактерії додавали до вже сформованих біоплівок *L. plantarum* ОНУ 355, деякі клітини патогенів могли вбудовуватися у біоплівку у 25 % тестованих зразків. Але обробка суспензіями *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 333 повністю елімінувала патоген.

Одночасна інокуляція коренів тест рослин лактобацилами і агробактеріями також демонструвала захисний ефект *L. plantarum*. У випадку штамів *L. plantarum* ОНУ 12 і ОНУ 355 спостерігалася повна елімінація агробактерій. *A. tumefaciens* pJZ утворювали змішані біоплівки *L. plantarum* ОНУ 333 у 16,7%, а 83,3% зразків коренів, інокульовані даним штамом, залишалися вільними від патогена.

Антагоністичний вплив лактобацил проти деяких бактеріальних фітопатогенів – *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia*

carotovora, було показано методом дифузії в агар та на тест-рослинах шляхом оцінювання симптомів захворювання. Також нами виявлено антифунгальний ефект досліджених штамів молочнокислих бактерій проти умовно патогенних мікроміцетів *Mucor* sp. та *Penicillium* sp., які представляють собою небезпеку для рослин, отриманих у результаті мікроклонального розмноження.

Ми виявили, що інгібування патогена може відбуватися вже на стадії прикріплення та утворення біоплівки – найпершій стадії патогенезу захворювання. Лактобацили могли конкурувати з фітопатогеном, захищати рослинні поверхні та руйнувати зрілі біоплівки патогену.

Молочнокислі бактерії могли елімінувати біоплівки фітопатогена *A. tumefaciens* pJZ з коренів томату. Такий антагоністичний ефект проти тест-бактерій разом зі здатністю до утворення розвинутих біоплівок на рослинних поверхнях потребує наступних досліджень для можливого практичного застосування у захисті рослин та харчовій промисловості.

Штами молочнокислих бактерій та їх суміші з антагоністичною активністю проти фітопатогенних бактерій та грибів можуть бути використані для розробки біологічних препаратів для захисту рослин.

Література

1. Barahona E., Navazo A., Yousef-Coronado F., Aguirre de Cárcer D., Martínez-Granero F., Espinosa-Urgel M., Martín M., Rivilla R. Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* fl13 mutants unable to form biofilms on abiotic surface // *Environmental Microbiology*. – 2010. – 12(12). – P. 3185–3195.
2. de Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // *J Appl Bacteriol.* – 1960. – 23. – P. 130-135.
3. Hoda H.A., Yomna M.A., Shadia M.A.-A. *In vivo* efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant // *Life Science Journal*. – 2011. – Vol. 8. – P. 462-468.
4. Lutz M.P., Michel V., Martinez C., Camps C. Lactic acid bacteria as biocontrol agents of soil-born pathogens. Biological control of fungal and bacterial plant pathogens // *International Organization for Biological and Integrated Control West Palaearctic Regional Section Bulletin*. – 2012. – Vol. 78. – P. 285-288.
5. Piasecka-Jozwiak K., Rozmierska J., Chablowska B., Stecka K.M., Skapska S., Kliszcz M., Szkudzinska-Rzeszowiak E. Starter cultures for lactic acid fermentation of sweet pepper, pattypan squash and tomatoes // *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. – Vol. 63. – P. 95-102.
6. Trias R., Bañeras L., Montesinos E., Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi // *Int Microbiol.* – 2008. – Vol.11. –P. 231-236.

*N.V. Limanska, A.G. Merlich, M.B. Galkin, I.D. Zhunko,
N.I. Tesliuk, I. Avramovich, V.O. Ivanytsia
National I.I. Mechnikov University, Odessa
Ukraine, 65082, Odessa, Dvorianska str., 2, e-mail: limanska@gmail.com*

DEVELOPMENT OF PREPARATIONS BASED ON LACTIC ACID BACTERIA FOR PROTECTION OF PLANTS AGAINST PHYTOPATHOGENS

***Annotation.** Effect of lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus italicus* on phytopathogenic microorganisms *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Mucor* sp. and *Penicillium* sp. has been studied. Antagonistic microorganisms inhibited phytopathogens both on nutrient media and test-plants decreasing the level of disease manifestation in 24,8 – 77,0%. The studied strains of lactic acid bacteria were recommended as agents for biological preparations for plant protection.*

***Keywords:** lactic acid bacteria, phytopathogens, biological plant protection, antagonists*

*Н.В. Лиманская, А.Г. Мерлич, М.Б. Галкин, И.Д. Жунько,
Н.И. Теслюк, И. Аврамович, В.А. Иваньця
Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
Украина, 65082, Одесса, вул. Дворянская, 2, e-mail: limanska@gmail.com*

РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ ФИТОПАТОГЕНОВ

***Аннотация.** Изучение влияния молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* и *Enterococcus italicus* на фитопатогенные и условно-патогенные микроорганизмы *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Mucor* sp., *Penicillium* sp. показало, что исследованные штаммы-антагонисты были способными ингибировать фитопатогены как на питательных средах, так и на тест-растениях, уменьшая уровень проявления заболеваний на 24,8 – 77,0%. Исследованные штаммы молочнокислых бактерий были рекомендованы для разработки биопрепаратов для защиты растений.*

***Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, фитопатогены, биологическая защита растений, антагонисты*