

УДК 635 656.632

БИОФУНГИЦИДЫ И БИОИНОКУЛЯНТЫ ДЛЯ УСТОЙЧИВОГО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА: РИЗОСФЕРНЫЕ БАКТЕРИИ STREPTOMYCES ДЛЯ ЗАЩИТЫ СЕМЯН И РАСТЕНИЙ ОТ ФИТОПАТОГЕНОВ, И СТИМУЛЯЦИИ ИХ РОСТА

Доолоткелдиева Тинатин Доолоткелдиевна (0000-0002-1633-6217)¹
Бобушева Сайкал Токтосуновна (0000- 0002- 5823-0541)²

¹Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина.
г.Бишкек, Кыргызстан

²Кыргызско - Турецкий Университет Манас, г.Бишкек, Кыргызстан

Аннотация: в статье приведены данные *in vitro* и *in vivo* исследований по выявлению биофунгицидной, антибактериальной, ростстимулирующей и фосфат растворяющей активности биопродуктов на основе ризосферных бактерии *Streptomyces*. Из всех испытанных, биопродукты на основе штаммов *Streptomyces diastatochromogenes sk-6*, *Streptomyces alfalfa CI-4*, *Streptomyces lividans TR-59* и *Streptomyces avidini*, Tal-44.18 продемонстрировали способность колонизировать поверхность семян овощных культур, повысить их всхожесть и усилить рост всходов, одновременно подавлять рост бактериальных и грибных болезней, а также вступать в ассоциации эпифитной микрофлоры и подавлять симптомы заболеваний на листьях плодовых деревьев. Тем самым эти биопродукты могут служить основой создания перспективных биоформул, вносящих вклад в обеспечении населения здоровым и органически качественным продовольствием.

Ключевые слова: естественные изоляты *Streptomyces*, биопродукт, болезни семян и растений, антимикробная активность, ростстимулирующая активность, сохранность растений.

ТУРУКТУУ АЙЫЛ ЧАРБАСЫ ҮЧҮН БИОФУНГИЦИДДЕР ЖАНА БИОИНОКУЛЯНТТАР: РИЗОСФЕРАЛЫК STREPTOMYCES БАКТЕРИЯЛАРЫ УРУКТАРДЫ ЖАНА ӨСҮМДҮКТӨРДҮ ФИТОПАТОГЕНДЕРДЕН КОРГОО ЖАНА АЛАРДЫН ӨСҮШҮН СТИМУЛДАШТЫРУУ ҮЧҮН

Доолоткелдиева Тинатин Доолоткелдиевна (0000-0002-1633-6217)¹
Бобушева Сайкал Токтосуновна (0000- 0002- 5823-0541)²

¹К.И. Скрябин атындагы Кыргыз улуттук агрардык университети
Бишкек шаары, Кыргызстан

²Кыргыз- Турк Манас Университети, Бишкек шаары, Кыргызстан

Аннотация: макалада ризосфералык *Streptomyces* бактерияларынын негизинде биофунгициддик, антибактериалдык, өсүүнү стимулдаштыруучу жана фосфаттарды эритүү активдүүлүгүн аныктоо боюнча *in vitro* жана *in vivo* изилдөөлөрдүн жыйынтыктары берилген. Бардык изилденгендердин арасынан,

Streptomyces disatochromogenes sk-6, Streptomyces alfalfa CI-4, Streptomyces lividans TR-59 жана Streptomyces avidini, Tal-44.18 штамдарынан турган биопродуктулар жашылча өсүмдүктөрүнүн уруктарын колониялаштыруу жөндөмдүүлүгүнө ээ экендигин, алардын өнүп чыгуусун жогорулатып, өнүмдөрдүн өсүүсүн тездетип тургандыгы далилденди. Бир эле учурда алар бактериялык жана козу карындар менен чакырылган илдеттердин өсүшүн басаңдатуу менен, ошондой эле эпифиттик микрофлоранын курамына кирип, мөмө-жемиш өсүмдүктөрүнүн жалбырактарындагы илдеттерди басандата тургандыгы көрсөтүлдү. Бул биопродуктулар ден-соолукка коопсуз жана жогорку органикалык сапаттагы тамак-ашка салым кошкон келечектүү биоформуларды түзүүгө кызмат кыла алат деген ишенимди берет.

Өзөктүү сөздөр: *Streptomyces* табигый изоляттары, биопродукт, уруктардын жана өсүмдүктөрдүн илдеттери, микробго каршы активдүүлүк, өсүүнү стимулдаштыруучу активдүүлүк, өсүмдүктөрдүн коопсуздугу.

BIOFUNGICIDES AND BIOINOCULANTS FOR SUSTAINABLE AGRICULTURE: RHIZOSPHERE STREPTOMYCES BACTERIA FOR PROTECTING SEEDS AND PLANTS FROM PHYTOPATHOGENS AND STIMULATING THEIR GROWTH

Doolotkeldieva Tinatin (0000-0002-1633-6217)¹

Bobusheva Saykal Toktosunovna (0000- 0002- 5823-0541)²

¹*Kyrgyz National Agrarian University named K.I. Skryabin.
Bishkek, Kyrgyzstan*

²*Kyrgyz-Turkish Manas University, Bishkek, Kyrgyzstan*

Abstract: *this paper presents in vitro and in vivo studies on the identification of biofungicidal, antibacterial, growth-stimulating and phosphate-dissolving activity of bioproducts based on Streptomyces rhizosphere bacteria. Bioproducts based on the Streptomyces distatochromogenes sk-6, Streptomyces alfalfa CI-4, Streptomyces lividans TR-59 and Streptomyces avidini, Tal-44.18 demonstrated the ability to colonize the surface of vegetable seeds, increase their germination and enhance the growth of seedlings. More importantly, these bioproducts have shown a remarkable ability to suppress the growth of bacterial and fungal diseases, as well as enter into associations with epiphytic microflora and suppress disease symptoms on the leaves of fruit plants. This unique feature of the bioproducts provides a strong foundation for their potential application in agriculture and food production.*

Key words: *natural isolates of Streptomyces, bioproduct, seed and plant diseases, antimicrobial activity, growth-stimulating activity, plant health.*

1. Введение

В ризосфере растений происходят сложные биологические и экологические процессы. Легкодоступные источники углерода, выделяемые корнями растений, включающие простые полисахариды, аминокислоты и фенольные соединения привлекают многочисленных микроорганизмов, обитающих в почве вокруг корневой системы растений. При этом, эти органические компоненты корневых выделений могут подавлять рост определенных микроорганизмов, одновременно стимулируя пролиферацию других, таким образом делая ризосферу селективной средой обитания микробов (Doolotkeldieva T 2022) (Doolotkeldieva T, 2015).

Баланс между микрофлорой ризосферы и патогенами растений, а также микрофлорой почвы и патогенами растений важен в отношениях хозяин-патоген системы фитобиомов.

В настоящее время инновационный взгляд на сельскохозяйственное производство привлекает растущий спрос на биологические удобрения, основанные на полезных ризосферных бактериях, как альтернативу агрохимикатам (Raja N: 2013)-(Araujo ASF, 2008).

Использование биоудобрений, биофунгицидов и активных биопродуктов является одной из стратегий органического земледелия, которая не только обеспечивает безопасность пищевых продуктов, но и увеличивает биоразнообразие почвы, не оказывает неблагоприятного воздействия на экосистему (Megali L, 2013)(Sahoo RK, 2014).

Почвенные бактерии, обитающие в ризосфере растений, относящиеся к *Streptomyces*, считаются перспективными биоконтролирующими организмами из-за их потенциала производить широкий спектр вторичных метаболитов (витамины, алкалоиды, факторы роста растений, ферменты и ингибиторы ферментов, органические кислоты), используемых в сельском хозяйстве.

Род *Streptomyces* включает аэробные или анаэробные грамположительные, нитчатые, спорообразующие бактерии, встречающиеся как в водных, так и в наземных средах обитания, хорошо известны тем, что придают почве характерный землистый запах вследствие производства органических продуктов, известных как геосмин (Bhatti, A.A., 2017) (Barka, E.A., 2016). Эти бактерии могут участвовать в переработке полезных ископаемых в экосистемах путем разложения растительной биомассы и хелатирования минералов в почве. Они колонизируют корни растений и смягчают повреждения, вызванные болезнями, засухой, низкими температурами и другими факторами, производя различные противомикробные соединения и гидролитические ферменты, деградация органических веществ и солюбилизация фосфатов (Bouizgarne, V., 2014)-(Y. Gong 2020).

Однако, в Кыргызстане, одна из причин торможения развития биотехнологического направления — отсутствие зарегистрированных биофунгицидов и биоудобрений в стране, несмотря на большое количество научных данных о перспективных полезных микроорганизмах-продуцентах.

В настоящем исследовании была проведена оценка потенциала лабораторных образцов биоудобрений на основе штаммов *Streptomyces* в *in vitro* и *in vivo* тестах в отношении различных бактериальных и грибковых фитопатогенов овощных, технических и плодовых культур, для улучшения плодородия почвы и роста растений во время вегетации, для борьбы с проблемами, связанными с загрязнением окружающей среды и глобального потепления.

2. Материалы и методы исследования

Штаммы *Streptomyces* использованные для создания биоудобрений и биоинокулянтов

Из ризосферной почвы растений

разных биотопов было выделено множество штаммов, принадлежащих к роду *Streptomyces*, и путем изучения их гена 16S рРНК установлено их видовое богатство, а также проведен филогенетический анализ (Рис.1). В результате создана ценная

коллекция штаммов этого рода и проверена их способность секретировать биологически активные метаболиты в лабораторных и полупромышленных условиях.

Для исследования были выбраны штаммы из лабораторной коллекции,

Таблица 1. Происхождение и характеристики штаммов *Streptomyces*, использованных в создании биоудобрений и биоинокулянтов

Название штамма	Место выделения	Культуральные характеристики на крахмально-аммиачной среде (КАА)
<i>Streptomyces diastatochromogenes sk-6</i>	Из ризосферы дикорастущего растения в долине Сон-Куль, на высоте 3200 м над уровнем моря	Образует воздушный мицелий с бело-желтоватым цветом; со специфическим запахом
<i>Streptomyces alfalfae, CI-4</i>	Из ризосферы дикорастущего растения в долине Сон-Куль, на высоте 3200 м над уровнем моря	Образует воздушный мицелий светло-зеленого цвета; со специфическим запахом
<i>Streptomyces sp. Pch-3</i>	Из почвы опытного поля сельскохозяйственного факультета КТУ «Манас»	Образует воздушный мицелий темно-серого цвета, субстратный мицелий темно-красного цвета
<i>Streptomyces mediolani Pat -3</i>	Из ризосферы дикорастущего растения в долине Сон-Куль, на высоте 3200 м над уровнем моря	Образует воздушный мицелий белого цвета, субстратный мицелий розового цвета
<i>Streptomyces lividans TR-59</i>	Из почвы опытного поля сельскохозяйственного факультета КТУ «Манас»	Образует воздушный мицелий сине-фиолетового цвета и темно-синего цвета субстратный мицелий.
<i>Streptomyces avidini, Tal-44.18</i>	Из каштановых почв Таласской области.	Образует серо-дымчатый воздушный мицелий и темно-дымчатый субстратный мицелий.

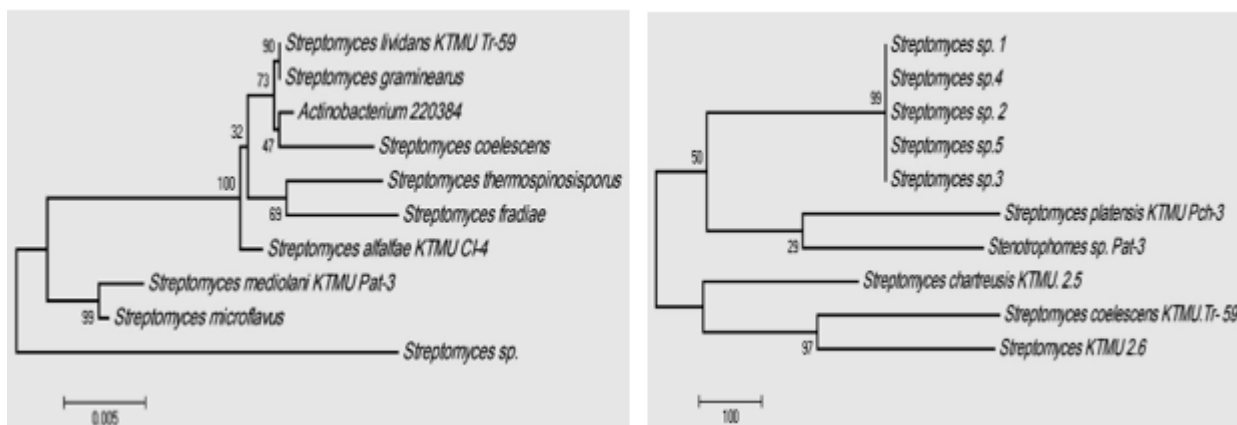


Рис.1. Филогенетическое древо бактерий *Streptomyces*, обнаруженных в ризосферных почвах разных биотопов, на основе анализа последовательности 16SpPHK. Каждая группа содержит по меньшей мере > 97% сходства последовательностей в Genbank.

обладающие широким спектром антимикробной активности против грибковых и бактериальных фитопатогенов и рост стимулирующей активностью (Табл.1).

Получение жидких образцов биопрепарата на основе *Streptomyces* штаммов. Для получения биоактивных метаболитов штаммы *Streptomyces* культивировали на крахмал-аммиачном агаре (КАА) при температуре 28°C. После семи дней тщательно контролируемой инкубации, выросший мицелий переносили в заранее подобранный оптимальный состав питательной среды, обеспечивающий максимальный выход биопродукта. Производственный процесс включал глубинное культивирование инокулята в биореакторе (LAMBDA Laboratory Instruments, CZ, 7л), содержащий жидкую среду (Овсянка - 20 г; Солевой раствор - 1,0 мл; Дистиллированная вода - 1 л), при pH-7,2, при постоянном встряхивании (220 об/мин) и температуре 28°C. Через 72 ч. инкубации, фильтрованный стерильный бесклеточный супернатант или клетки использовали для дальнейших экспериментов.

Патогены – тест культуры. Патогенные бактерии (*Erwinia carotovora*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*), выделенные из

пораженных органов растений, хранились в стерилизованном питательном бульоне при - 200 С. Патогенные грибы (*Alternaria tenuissima*, *Fusarium graminearum*, *Venturia inaequalis* и *Monilia fructicola*, *Aspergillus* sp.), выделенные из пораженных органов растений, хранились на картофельно-декстрозном агаре (PDA) при 4 ° С.

Определение фосфат растворимой активности биопродуктов *Streptomyces*. Определяли в питательной среде, содержащей в своем составе Ca₃(PO₄)₂ (NBRIP) в качестве единственного источника фосфора. В эту среду проделали лунки размером 1 см² и в каждую лунку выливали 1 мл супернатанта штаммов *Streptomyces* и инкубировали при 30 ° С в течение 2 недель.

Биотесты по определению антагонистической активности *Streptomyces* биопродуктов. Антагонистическую активность *Streptomyces* против бактериальных патогенов изучали путем совместного культивирования антагониста и тест-культуры в жидкой среде. Культуры *Erwinia amylovora*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* и *Ralstonia solanacearum* инкубировали в пробирках объемом 5 мл в мясопептонном бульоне в течение 48 часов. Затем в каждую пробирку добавляли 1 мл культуры-антагониста:

после инкубации при 28 ° C в течение 24 часов содержимое пробирки анализировали и активность биоконтролирующих агентов оценивали с помощью микроскопии, а титр клеток определяли с использованием спектрофотометра UV / VIS (Jenway, Stone, UK) при 550 нм.

In vitro агар метод для тестирования биологической активности *Streptomyces* биопродуктов против грибных патогенов, выделенных из семян и больных растений. Испытания in vitro по определению биофунгицидной активности штаммов проводили в чашках Петри (диаметром 90 мм) со средой Potato Dextrose Agar по модифицированной методике [12]. Мицелий патогенных грибов инокулировали в центр чашки Петри и на расстоянии 20 мм от них равномерно распределяли по линии 40 мм 10 мкл агаровой суспензии *Streptomyces* (10 мкл 10⁷ КОЕ/мл в 90 мкл 0,01% агара). Каждый тестовый штамм проверяли на активность в трехкратной повторности. Контрольный вариант содержал только чашки с патогеном. Инокулированные чашки инкубировали в темноте при 24 °C. Антагонистическую активность выражали путем измерения зон ингибирования мицелия патогена биоконтрольным агентом, в мм.

Виды семян овощных и технических культур, использованных для определения роста стимулирующей активности *Streptomyces* биопродуктов.

Для фитопатологического анализа и для тестирования на рост стимулирующей активности *Streptomyces* биопродуктов были отобраны семена 31 вида, относящихся к 10 семействам растений из числа интродуцированных и местных сортов овощных и технических культур, зарегистрированных в Государственном реестре Кыргызстана.

Покрывание или обработка семян суспензией *Streptomyces* sp. методом рулона. Визуально были отобраны больные семена овощных и технических культур для оценки антимикробной активности *Streptomyces* sp. в отношении патогенов.

1 мл концентрированных (1x10⁷ клеток) культур *Streptomyces* sp. разводили в 100 мл стерилизованной воды для получения 1,0% суспензии. Для сравнения была использована суспензия *Bacillus subtilis*, являющейся основой биопрепарата Фитоспорин. Контрольным вариантом была стерильная вода. Семена замачивали в этих суспензиях в течение 2 часов. Фильтровальную бумагу предварительно стерилизовали перед использованием. Обработанные бактериальной суспензией семена высаживали на стерилизованную фильтровальную бумагу и инкубировали в термостатах при температуре 25-27 0 C. Для оценки скорости прорастания и появления всходов растений мы рассчитали среднее время прорастания/появления всходов (MGT/MET) по формуле, предоставленной [13]: $MGT/MET = (\sum_{i=1}^n (dn_i \times an_i)) / (\sum_{i=1}^n an_i)$, где dn — текущий день появления всходов, an — количество появившихся растений в текущий день.

Метод статистического анализа. Для сравнения средних значений были проведен однофакторный дисперсионный анализ и множественные сравнения на уровне вероятности 0.05. Статистический анализ был выполнен с использованием Statistica 10 (StatSoft). Изменчивость характеристик определялась путем расчета стандартного отклонения выборки и коэффициента вариации V .

3. Результаты исследования

Фосфат растворимая активность биопродуктов Streptomyces

Среди всех протестированных штаммов два - *Streptomyces alfalfae* C1-4 и *Strep. lividans* TR-59 продемонстрировали наивысшую активность солибилизации фосфатов, образуя прозрачный ореол вокруг лунок со суспензией, у других испытанных штаммов, прозрачного ореола не наблюдалось (рис. 2). Эти результаты показывают, что штаммы *Streptomyces* способны продуцировать органическую глюконовую кислоту в окружающую среду, которая отрицательно

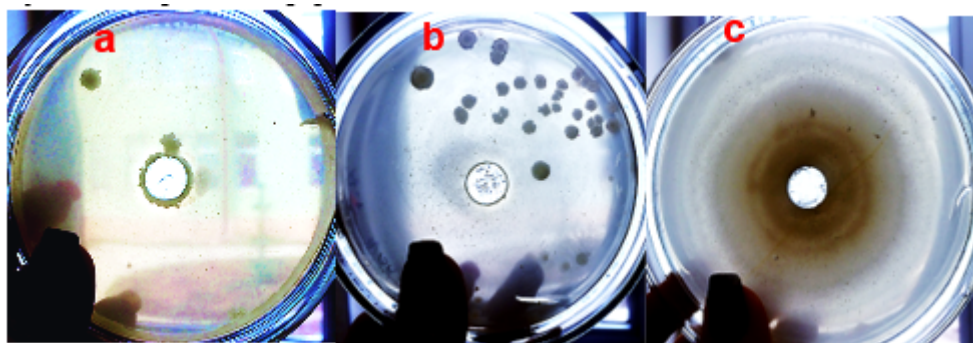


Рис. 2. Прозрачный ореол вокруг лунок штамма *Strep.alfalfae* CI-4 (a); прозрачный ореол вокруг лунок штамма *Strep.lividans* TR-59 (b) и штамм *Streptomyces wedmorensis* KK-4 не показал ореола (c).

заряженный нерастворимый фосфат через его карбоксильную группу превращает в растворимые и доступные для растения формы.

Антагонистическая активность Streptomyces биопродуктов в отношении бактериальных патогенов.

В жидкой среде *Streptomyces alfalfae* штамм CI-4 проявлял высокую активность в отношении возбудителя бактериального ожога *Erwinia amylovora*.

Клетки фитопатогена были полностью лизированы ферментами антагониста; на микрокартинах были видны только мицелий и гифы *Streptomyces* (фиолетовые стрелки), и не было клеток фитопатогенов (рис. 3а). Штамм *Streptomyces diastochromogenes* SK-6, также показал активное влияние на клетки фитопатогена при совместном культивировании. Наблюдался полный лизис клеток *Erwinia amylovora* с антагонистическим эффектом *Streptomyces lividans* TR-59. *Streptomyces*

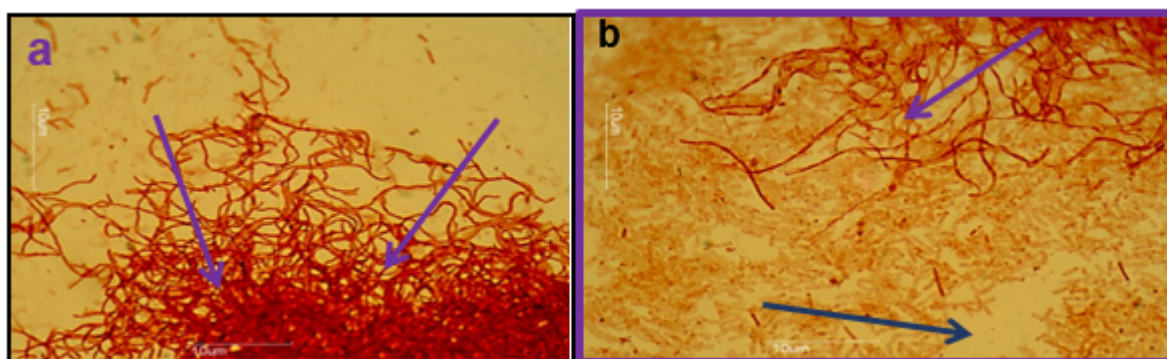


Рис.3. (a): где в жидкой среде *Streptomyces alfalfae* CI-4 (1 мл) + *Erwinia amylovora* (5 мл) совместно культивировали, фиолетовые стрелки показывают мицелий и гифы *Streptomyces alfalfae*, CI-4;(б) где в жидкой среде совместно культивировали штамм *Streptomyces wedmorensis* KK-4 (1 мл) + *Erwinia amylovora* (5 мл).

wedmorensis КК-4 не продемонстрировал антагонистическое действие на возбудителя; и клетки *Erwinia amylovora* быстро размножились при совместном культивировании (рис. 3 в).

При проверке активности штаммов *Streptomyces* в отношении возбудителя бактериального рака косточковых плодов было обнаружено, что те же самые штаммы *Streptomyces* были активными, проявляя либо антагонизм, либо гиперпаразитизм в течение 72 часов, на *Pseudomonas syringae*. Так, штаммы *Streptomyces diastatochromogenes* Sk-6, *Streptomyces mediolani* Pat -3 и *Streptomyces lividans* TR-59 показали значительный антагонистический эффект по отношению к возбудителю бактериального рака, обеспечивая подавление роста и развития колоний этой бактерии, зоны лизиса которой составляют $5.77-6.1 \pm 1.31$ мм, $5.25-5.70 \pm 1.27$ мм и $4.52-5.1 \pm 1.31$ (P<0,05) соответственно. Другие агенты биоконтроля, такие как *Streptomyces alfalfae*, CI-4 и *Streptomyces lactitubi*, Pch-3, продемонстрировали гиперпаразитарный эффект, используя колонии *Pseudomonas syringae* в качестве источника питательных веществ, растущих на клетках патогенных микроорганизмов.

Почву и рассады картофеля обрабатывали антагонистами, и их

действие изучали в условиях *in vivo*. Микробные суспензии антагонистов и возбудителя бурой гнили -*R. solanacearum* довели до концентрации 10⁸ КОЕ / мл путем измерения на длине волны 585 нм (UV / VIS Spectrophotometer, JENWAY, UK, 2011). Внесение в почву, в корневую зону картофеля *Streptomyces diastatochromogenes* Sk-6 и *Streptomyces alfalfae* C1-4 в дозе 10⁸ кл / мл значительно снизили заболеваемость бурой гнилью и увеличили рост картофеля. Прогрессирование заболевания было снижено на 60% и 56% (P<0,05) у растений, инокулированных штаммом *Streptomyces diastatochromogenes* Sk-6 и *Streptomyces alfalfae* C1-4, соответственно.

Streptomyces diastatochromogenes Sk-6 был выбран для биоконтроля мягкой бактериальной гнили, вызываемой *Erwinia carotovora* в условиях хранения картофеля. На четвертой неделе после инокуляции бактерией мягкой гнили *Erwinia carotovora* в дозе 10⁶кл/мл и обработки антагонистической бактерией *Streptomyces diastatochromogenes* Sk-6 в дозе 10⁸ спор / мл у сорта Санти инфекции не наблюдалось. У сорта Пикассо признаки инфекции начали проявляться через четыре недели даже при дозе 10⁸ спор / мл антагониста, а симптомы инфекции были более выраженными и наблюдались у 4,5–4,7% клубней этого

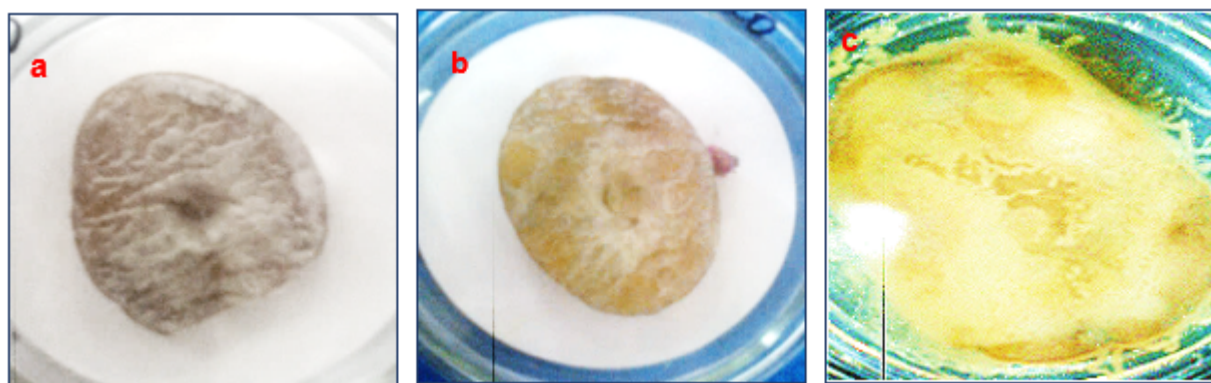


Рис.4. а): клубень, инфицированный *E. carotovora* (10⁸ спор/мл) + *Streptomyces distatochromogenes* sk-6 (10⁴ клеток/мл); (б): клубень, инфицированный *E. carotovora* (10⁸ спор/мл) + *Streptomyces distatochromogenes* Sk-6 (10⁶ клеток/мл) через 5 недель; (с): Клубеньки, зараженные *E. carotovora* (10⁸ спор/мл), без применения биоинокулянта (контроль).

Табл.1. Активность тестируемых штаммов биоконтроля *Streptomyces* в отношении грибных возбудителей овощных и плодовых культур

Биоконтрольные штаммы	Зоны ингибирования роста колоний грибных возбудителей, мм, через 72 часа			
	<i>Venturia inaequalis</i> .	<i>Alternaria tenuissima</i> ,	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Monilia fructicola</i>
<i>Streptomyces diastochromogenes</i> SK-6,	0.8 ± 0.02	10,8 ± 0.02	Гипер паразитизм	12,1± 0.02
<i>Streptomyces alfalfae</i> , CI-4	10.0 ± 0.02	10,2± 0.02	13.4 ± 0.02	Гипер паразитизм
<i>Streptomyces lividans</i> TR-59	Гипер паразитизм	10,3± 0.02	13.7 ± 0.02	10.2 ± 0.02

сорта в дозе антагониста 104 спор / мл. Контрольная группа или необработанный картофель всех сортов получил 100% повреждение в течение четырех недель после начала эксперимента (Рис.4).

Антибиотическая активность штаммов *Streptomyces* в отношении грибковых возбудителей.

Результаты показали, что биопродукты на основе штаммов *Streptomyces* обладают разной антагонистической активностью в отношении *Venturia inaequalis* – возбудителя парши яблони (табл. 1). *Streptomyces alfalfae*, штамм CI-4, оказал сильное влияние на этот фитопатогенный грибок, зона лизиса

достигала 10.0 ± 0.02 мм (P<0.05) мм за 72 часа, *Streptomyces diastochromogenes* SK-6 - показала ингибирование роста культуры возбудителя: 0.8 ± 0.02 мм (P<0.05). Тогда как *Streptomyces lividans* TR-59 продемонстрировал гиперпаразитарный эффект при использовании колоний грибов в качестве источника пищи. С другой стороны, через 48 часов при сокультивировании жидкой культуры антагонистов с *Venturia inaequalis*, при микроскопическом исследовании было выявлено, что мицелий антагонистов *Streptomyces* прикреплялся к конидийным ветвям и гифам патогенных грибов, а также

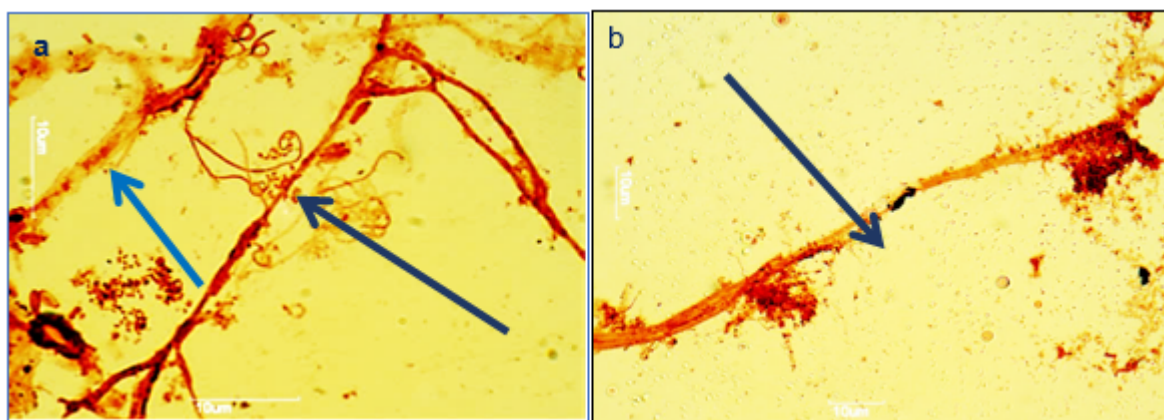


Рис.5. Повреждение гифальных тел и клеточной мембраны мицелия фитопатогенных гриба *Venturia inaequalis* при совместном культивировании с культурой *Streptomyces alfalfae*, CI-4 (а) и *Streptomyces lividans* TR-59 (б) (отмечено синими стрелками).

под влиянием ферментов, высвобождаемые этими активными антагонистами, и через гиперпаразитический эффект, клеточные структуры гриба были разрушены и истончены (рис. 5).

Как показано в таблице, тестируемые штаммы *Streptomyces* также были способны ингибировать рост мицелия грибов *Alternaria tenuissima*. Зона лизиса, вызванная *Streptomyces diastochromogenes* SK-6 мицелия грибов *A. tenuissima*, вызывающая черные пятна на листьях яблони, стеблевые и сердцевинные гнили, составляет 10.8 ± 0.02 мм, а *Streptomyces alfalfae*, CI-4 – 10.2 ± 0.02 мм ($P < 0.05$). *Streptomyces lividans* TR-59 вызывал зону лизиса 10.3 ± 0.02 мм ($P < 0.05$) против этого

грибкового патогена. Все протестированные штаммы *Streptomyces* проявили активность против *Fusarium graminearum*. Этот возбудитель вызывает гниль семяна злаков, особенно пшеницы, и наносит большой вред. В нашем исследовании штаммы актиномицетов, включая *Streptomyces alfalfae*, CI-4 и *Streptomyces lividans* TR-59, показали лучшие результаты против фузариозного увядания, зоны лизиса достигали 13.4 ± 0.02 и 13.7 ± 0.02 ($P < 0.05$) соответственно (табл. 3). Штамм *Streptomyces diastochromogenes* SK-6 на 8-е сутки начал проявлять гиперпаразитарное действие на колонии *Fusarium*, что указывает на селективное действие по химической природе антибиотиков, продуцируемых

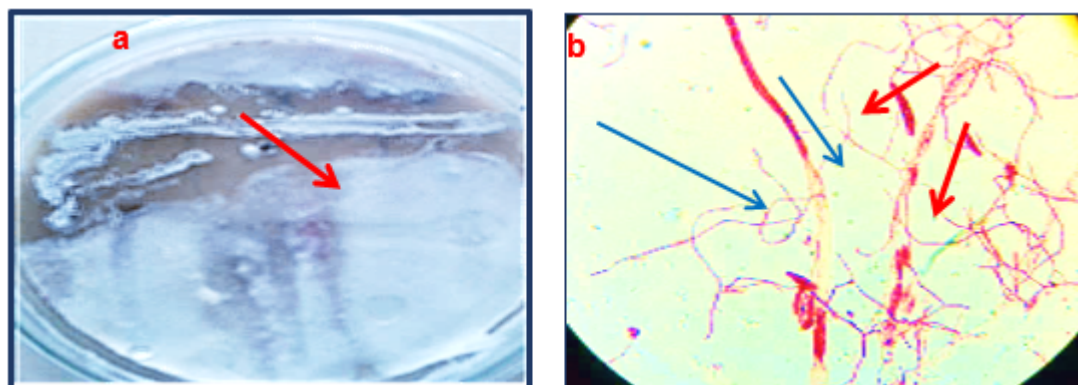


Рис.6. Ингибирующая активность штаммов *Streptomyces* в отношении колоний *Fusarium graminearum* и мицелия. (а): ингибирование роста мицелия *F. graminearum* под антагонистическим действием *Streptomyces alfalfae* CI-4; (б): нарушение структуры клеточной стенки гифальных тел *F. graminearum* (синие стрелки) под антагонистическим действием *Streptomyces alfalfae*, CI-4 (красные стрелки);

этим видом. Под микроскопом было замечено, что мицелий гриба распадался на мелкие кусочки, а гифальные волокна актиномицета опутывали и ослабляли макроконидии *Fusarium* (Рис.6).

Влияние биопрепаратов *Streptomyces* на прорастание семян овощных и технических культур.

Для оценки влияния биопрепаратов *Streptomyces* на прорастание семян семяна замачивали в бактериальной суспензии в течение 2 часов. При обработке суспензией *S. alfalfae* CI-4 в дозе $1 \times$

10^3 спор/мл, семяна показали высокую прорастающую активность по сравнению с обработкой *S. lividans* TR-59. Всхожесть всех испытанных семяна находилась в пределах 99.2–99.5 %, за исключением для свеклы (82.0%) ($P < 0.05$). Биопроduct на основе *Streptomyces lividans* TR-59 показал отличающиеся от *Streptomyces alfalfae* CI-4 результаты. Единственными семянами свободными от инфекции были свекла и огурцы, которые дали всхожесть 100 %, семяна сорта Дыня суперранний слегка поражены грибковым мицелием *Aspergillus*

(12.0%). Остальные семена были поражены грибковой инфекцией в разной степени: морковь – 40.0%, пекинская капуста – 80.0%, лук репчатый – 80.0%, кориандр импортный – 99.0%, кориандр местного сорта – 62.5%, шпинат – 50.0%. Для сравнения был использован промышленный биопрепарат на основе *Vac. Subtilis*. Обработка семян со суспензией этого биоагента привела к высокой всхожести столовой свеклы (99.8%) и моркови (80.0%). Всхожесть томатов составила 75.5%, всех остальных семян - ниже 60.0%. В качестве контроля семена замачивали в стерильной воде.

Самая высокая всхожесть в контроле была отмечена для семян дыни (79.8%), томата (77.7%), шпината (77.6%) и столовой свеклы (75.5%). Всхожесть всех остальных семян была ниже <60.0% ($P \leq 0.05$).

А также, в наших экспериментах *in vitro*, штамм *Streptomyces avidini* TAL-44.18 проявил мощную противогрибковую активность против патогенных грибов, обнаруженных в семенах кормовой свеклы — *Pythium* sp. и *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* и *Curvularia* spp. В совокупности эти результаты доказывают, что физиологически активные метаболиты,

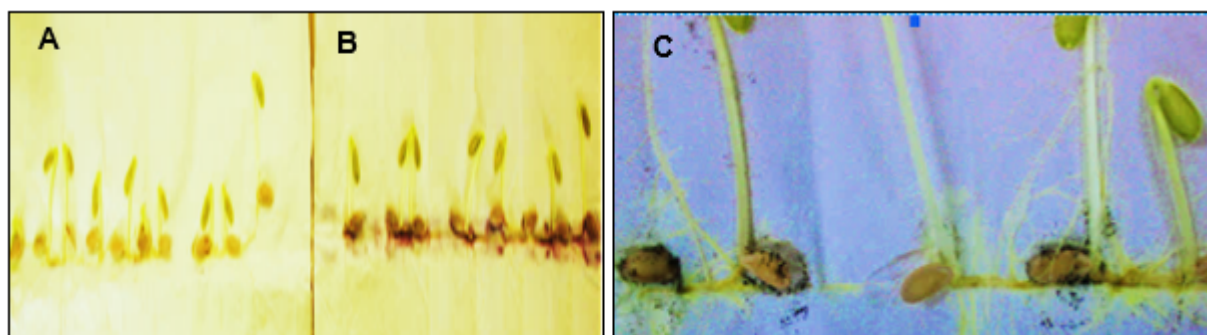


Рис.7. А- Обработанные семена дыни 1.0% суспензией биопродукта *Streptomyces alfalfae*; В- 1.0% суспензией биопродукта *Vacillus subtilis*; С- контроль, обработанные семена в стерильной воде.

в том числе антибиотические вещества в продуктах *Streptomyces*, могут подавлять рост и развитие грибов, населяющих семена, и защищать семена от грибковых инфекций (Рис. 7 и 8).

Биотесты в полевых условиях.

Скрининг антибиотической активности биопродукта *Streptomyces* в отношении возбудителя бактериального рака на саженцах абрикоса.

Streptomyces alfalfae С1-4 в качестве биоинокулянта применяли против бактериального рака косточковых деревьев, опрыскивая поверхности листьев и кроны пораженных растений, то есть

биоконтрольный агент вводили в эпифитные ассоциации растений. Когда на листьях появляются признаки заболевания, двойное обильное опрыскивание пораженных растений суспензией штамма *Streptomyces* С1-4 (106 спор / мл) с интервалом в 7 дней предотвратило развитие заболевания. Через пятнадцать дней после того, как биологическое средство было применено дважды, растения полностью восстановились, появились новые листья и новые веточки. Через 15 дней после двукратного применения биоинокулянта-антагониста (*Streptomyces avidini*) в дозе 106 спор/мл количество выздоровевших

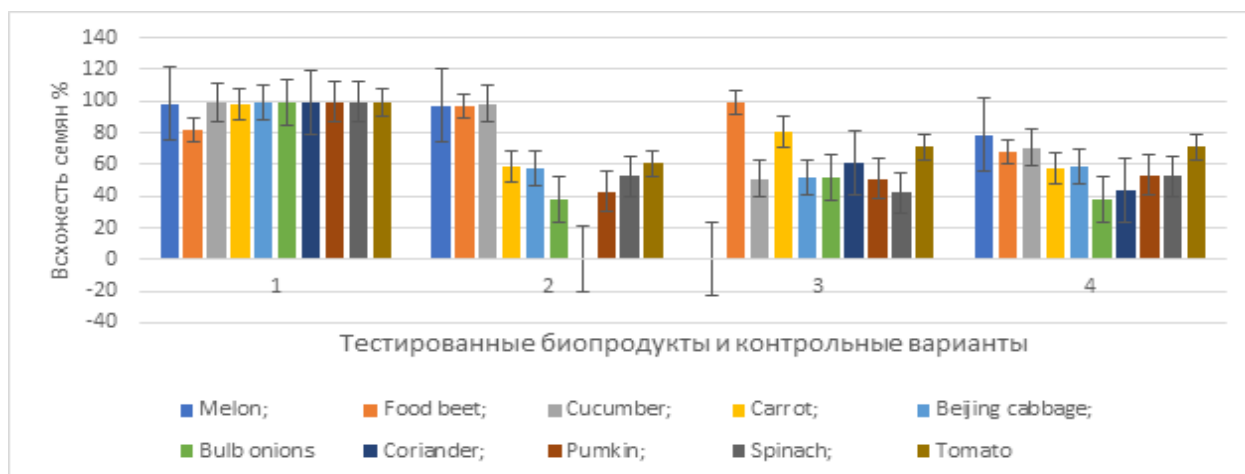


Рис.8. Проращивание семян овощных культур, обработанных биопрепаратами: 1- *Streptomyces alfalfae* CI-4; 2- *Streptomyces lividans* TR-59; 3- *Bacillus subtilis*; 4- контроль.

листьев увеличилось; количество здоровых листьев абрикоса достигло $43.0 \pm 0.03\%$; Прогрессирование заболевания, вызванного *Pseudomonas syringae*, было остановлено.

Антимикробный эффект *Streptomyces diastatochromogenes* sk-6 на клубни картофеля для защиты от инфекции при хранении

Streptomyces diastatochromogenes sk-6 был выбран для подавления наиболее распространенной болезни картофеля в Кыргызстане мягкой гнили (возбудитель бактерия *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*) при хранении клубней. Полученные результаты подтверждают, что доза 10^6 клеток/мл *Streptomyces diastatochromogenes* sk-6 эффективна для использования в виде порошка, посыпать инфицированных или неинфицированных клубней картофеля и может подавить развитие мягкой гнили во время хранения.

Антибактериальный эффект антагонистов *Streptomyces alfalfae* CI-4 и *Streptomyces avidini* на возбудителя

бактериального ожога (*Erwinia amylovora*) на яблони и груши.

Опрыскивание препаратом *Streptomyces* следует повторить три раза с интервалом в 10 дней, чтобы полностью подавить инфекцию. При использовании биологического препарата на основе *Streptomyces* больные части засыхали, а незараженные части сохранялись в естественном состоянии; ткань листа не становилась жесткой, как при использовании химического препарата. Таким образом, биологический антагонист воздействует только на патоген и не оказывает отрицательного воздействия на ткань листа. Это означает, что, остановив развитие болезни, ткань больного растения может начать восстанавливаться и нормально функционировать. Количество пораженных ветвей в контрольной группе составило от 15.0 до $22.0 \pm 0.91\%$, в группе деревьев, обработанных химическим препаратом, – от 8.0 до $25.0 \pm 0.91\%$, в группе деревьев, обработанных биологическим препаратом, пораженность составила от 5.0 до $12.0 \pm 0.91\%$

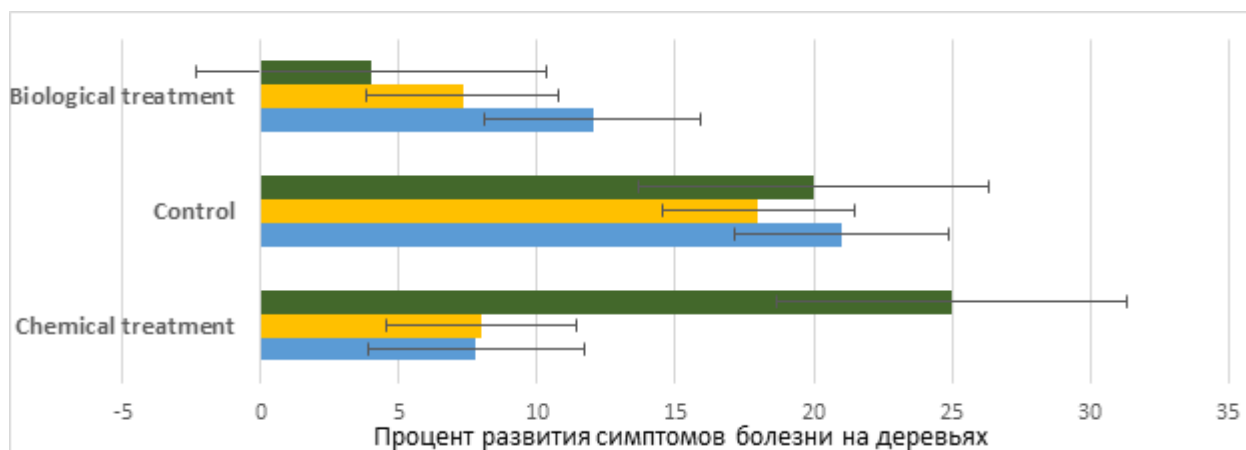


Рис.9. Процент развития симптомов бактериального ожога на опытных и контрольных участках

% (рис.9).

4. Дискуссия

Стрептомицеты способны колонизировать ризосферы растений и жить как эндофиты в корнях многочисленных культур. Их способность производить спящие споры позволяет им адаптироваться к стрессам окружающей среды. Они могут вступать в агрессивную конкуренцию со многими типами патогенов, которые колонизируют семена овощей, как доказано в этом исследовании. Покрытие семян биопродуктами стрептомицетов способствовало сокращению популяции спектра корневых патогенов. Было показано, что биопродукты подавляют патогены, выделенные из больных семян и растений. Другие исследования также показали, что стрептомицеты могут контролировать и подавлять патогены, вызывающие корневую гниль и увядание, такие как *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* и другие виды [14-15].

Для эффективной защиты от патогенов антагонист должен обладать способностью успешно колонизировать ризосферу растения и конкурировать с другими микроорганизмами в корневой системе, чтобы подавлять патогенные атаки [16-17]. Существенным моментом, который следует отметить при использовании биологических агентов, является то, что они не должны приводить к каким-либо изменениям

в экофизиологической структуре микробного сообщества ризосферы; химические фунгициды оказывают такой нежелательный эффект. Биоагенты — микроорганизмы — также должны выживать, когда семена высаживаются в почву, и оказывать постоянную помощь росту растений и борьбе с болезнями [18]. Механизмы действия стрептомицетов включают выработку антибиотиков, лизис клеточной стенки гриба, конкуренцию и гиперпаразитизм. При замачивании семян в суспензии биопродукта споры проникают в клеточную мембрану клеток оболочки семян. Кроме того, по мере появления ростков и роста сеянцев они начинают колонизировать внутренние ткани растущих сеянцев. Они начинают вырабатывать свои метаболиты, что позволяет им конкурировать и проявлять агрессию против патогенов, живущих в семенах. Штаммы *Streptomyces* имеют потенциал для использования в подавлении патогенов семян посредством фумигантного действия.

В данном исследовании были изучены изоляты *Streptomyces*, полученные из ризосферы растений, на предмет их биоконтрольной активности по отношению к бактериальным патогенам: *Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia amylovora*, а также грибным патогенам: *Venturia inaequalis*, *Fusarium graminearum*, *Alternaria tenuissima*, *Monilia fructicola*

Pythium sp. и *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* и *Curvularia* spp. Эти ризосферные изоляты показали высокую активность не только в условиях *in vitro*, но и *in vivo* при нанесении на поверхность листьев путем распыления, они были способны колонизировать среди эпифитных микроорганизмов. В зависимости от кратности распыления и от вносимой дозы они были способны колонизировать поверхность листьев плодовых деревьев до 25-30 дней. В отличие от химических препаратов, эти биоконтрольные продукты были способны способствовать быстрому восстановлению листьев от повреждений и появлению новых листьев. По-видимому, как и другие биологические агенты, эти бактерии также могут оказывать стимулирующее рост действие на клетки и ткани через сигнальные системы иммунной защиты растений.

S. alfalae, CI-4 показал высокую биофунгицидную активность против патогенов семян по сравнению с другими протестированными биоагентами. Применение *S. alfalae*, CI-4 привело к высокой всхожести большинства семян овощей. Поэтому этот штамм был выбран для покрытия семян овощей. Этот штамм оказал двойное полезное воздействие на все семена овощей при концентрации 1×10^3 спор/мл. *Streptomyces alfalae* CI-4 и *Streptomyces avidini* могут быть рекомендованы для создания биоформулы в целях борьбы с бактериальным ожогом плодовых культур путем опрыскивания надземных органов деревьев. Основанная на *Streptomyces diastatochromogenes* sk-6 биоформула может быть надежным защитником клубни картофеля от патогенов, вызывающих разные гнили в условиях хранения.

5. Выводы:

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что штаммы *Streptomyces*, выделенные из ризосферы, могут быть использованы в качестве эффективного биологического агента для

создания формулы покрытия семян овощных и технических культур перед посадкой, а также для опрыскивания плодовых культур против грибных и бактериальных болезней. Биопродукты *Streptomyces*, способствующие росту растений, улучшающие доступность питательных веществ, контролирующие фитопатогены и снижающие абиотический стресс у растений, необходимы для устойчивого сельского хозяйства, являются прекрасной альтернативой экологически опасным химическим удобрениям и пестицидам. Летучие соединения, продуцируемые этой группой бактерий, пока не являются используемыми метаболитами; их полезность для сельского хозяйства все еще изучается. Штаммы с такими соединениями, несомненно, могли бы широко использоваться в качестве фумигантов семян, плодов во время хранения вместо химикатов. В будущих исследованиях, с использованием передовых технологий и методов, необходимо изучить химический состав всех метаболитов, продуцируемых этими местными штаммами *Streptomyces*, чтобы проверить уровень экспрессии генов, отвечающих за свойства биоконтроля в этих штаммах. Также разработать молекулярные маркеры для идентификации кластеров, присутствующих в этих штаммах. Необходимо проведение дальнейших исследований и разработка технологии биоформулирования на основе активных штаммов *Streptomyces* в ближайшем будущем.

6. Благодарности

Данное исследование было поддержано проектом «Разработка новой промышленной формулы биологического удобрения для органического производства» (Государственный инновационный фонд Кыргызпатента Кыргызской Республики).

7. Использованная литература

Doolotkeldieva T and Bobusheva S. Microbial communities of vegetable seeds and biocontrol microbes for seed treatment. Seed

Science and Technology, 50, 1, 77-102. <https://doi.org/10.15258/sst.2022.50.1.08>.

Doolotkeldieva T, Bobusheva S, Konurbaeva M. Effects of *Streptomyces* Biofertilizer to Soil Fertility and Rhizosphere's Functional Biodiversity of Agricultural Plants. *Advances in Microbiology*. Vol.5 No.7(2015), Paper ID 58385, 17pages DOI:10.4236/aim.2015.57058.

Raja N: Biopesticides and biofertilizers: ecofriendly sources for sustainable agriculture. *J Biofertil Biopestici* 2013, 1000e112:1000e112.

Araujo ASF, Santos VB, Monteiro RTR: Responses of soil microbial biomass and activity for practices of organic and conventional farming systems in Piauí state, Brazil. *Eur J Soil Biol* 2008, 44:225-230. Publisher Full Text

Megali L, Glauser G, Rasmann S: Fertilization with beneficial microorganisms decreases tomato defenses against insect pests. *Agron Sustain Dev* 2013. doi:10.1007/s13593-013-0187-0

Sahoo RK, Ansari MW, Pradhan M, Dangar TK, Mohanty S, Tuteja N: Phenotypic and molecular characterization of efficient native *Azospirillum* strains from rice fields for crop improvement. *Protoplasma* 2014. doi:10.1007/s00709-013-0607-7.

.Bhatti, A.A., Haq, S., Bhat, R.A., 2017. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microb Pathogenesis*. 111, 458–467.

Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.P., Clement, C.Y., Ouhdouch, G.P., van Wezel, 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 1–43.

Bouizgarne, B., Ben Aouamar, A.A., 2014. In: Maheswari, D.K. (Ed.), *Diversity of Plant Associated Actinobacteria in Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture*. Springer, Cham, pp. 41–99.

Bérdy, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot* 65, 385–395 (2012). <https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>

Y. Gong Antifungal potential evaluation

and alleviation of salt stress in tomato seedlings by a halotolerant plant growth-promoting actinomycete *Streptomyces* sp KLBMP5084, *Rhizosphere* (2020).

Kunova, A., Bonaldi, M., Saracchi, M. et al. (2016). Selection of *Streptomyces* against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth. *BMC Microbiology*, 16, 272, <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0886-1>

Pieper G, Eggebrecht H (1952) *Das Saatgut*. Wydanie II, Berlin.

Tahvonen, R. (1982). Preliminary experiments in to the use of *Streptomyces* spp. isolated from peat in the biological control of soil and seedborne diseases in peat culture. *Journal of Scientific Agricultural Society of Finland*, 54,357–369.

Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. and Gullino, M.L. (2006). Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Protection*, 25, 468–475

Yang, J., Kloepper, J.W. and Ryu, C.M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14, 1-4.

Begum, M.M., Sariah, M., Puteh, A.B., Zainal Abidin, M.A., Rahman, M.A. and Siddiqui Y. (2010). Field performance of bioprimered seeds to suppress *Colletotrichum truncatum* causing damping-off and seedling stand of soybean. *Biological Control*, 53, 18-23.

Correa, O.S., Montecchia, M.S., Berti, M.F., Ferrari, M.C.F., Pucheu, N.L., Kerber, N.L. and Garcí, A.F. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 41, 185-194