

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ



На правах рукописи

ЙЫЛДЫРЫМ Елена Александровна

**ГЕТЕРОФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ И
ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ И
КОРМОПРОИЗВОДСТВЕ**

03.00.07 – микробиология

- 3 ДЕК 2009

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург - 2009

Работа выполнена в лаборатории зоологической микробиологии ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ГНУ ВНИИСХМ г. Санкт-Петербург)

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Лаптев Георгий Юрьевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Умаров Марат Мутагарович

доктор биологических наук,
Кравченко Лев Витальевич

Ведущая организация: ГНУ Всероссийский научно-исследовательский
институт защиты растений РАСХН

Защита диссертации состоится «17» декабря 2009 г.
в 16 ч 00 мин на заседании объединенного совета ДМ 212.232.07 по
защите докторских и кандидатских диссертаций при Санкт-Петербургском
государственном университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Универ-
ситетская наб. 7/9, Биолого-почвенный факультет СПбГУ, аудитория 133.

С диссертацией можно ознакомиться в центральной библиотеке Санкт-Петербургского государственного университета.

Для отзывов: факс +7-(812)-466-79-92

Автореферат разослан «13» ноября 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Е.И. Шарова

Актуальность проблемы. Молочнокислые бактерии играют большую роль в ряде отраслей промышленности и сельского хозяйства. Эти микроорганизмы поделены исследователям (Orla-Jensen, 1919; Nilsson et al., 1956; Langston et al., 1960; Whittenbury, 1965; Whittenbury, 1966; Axelsson et al., 2004) на две основные категории: гомо- и гетероферментативные. В отличие от гомоферментативных гетероферментативные молочнокислые бактерии обладают более широким набором ферментов и, как следствие, более выраженной способностью к синтезу разнообразных биологически активных веществ (летучих кислот, этилового спирта, углекислоты, диацетила, перекиси водорода, антибиотиков) (Shütz et al., 1984; Nissen-Meyer, et al., 1997; Lavermicocca et al., 2003; Strom et al., 2005). Многие виды молочнокислых бактерий распространены в почвах и, что особенно важно, в ризосфере растений (Квасников 1948, 1956, 1960; Chen et al.; 2005). К настоящему времени в литературе описано множество штаммов молочнокислых бактерий, обладающих антагонистическими свойствами в отношении различных микроорганизмов, в том числе фитопатогенных (Квасниковым, 1956; Dodd et al., 1994; Vescovo et al, 1996; Valerio et al., 2004). Более того, ряд исследователей (Квасников, 1960; Ташпулатов и др., 2005; Kuwaki et al., 2004) обнаружили положительное воздействие на рост и развитие растений со стороны молочнокислых бактерий. Отмечено также стимулирующее влияние карбоновых кислот – продуктов метаболизма молочнокислых бактерий - на всхожесть семян и развитие проростков растений (Kuwaki et al., 2004).

Все вышеперечисленное открывает возможность широкого внедрения в растениеводство микробных препаратов, основой для которых могут являться молочнокислые бактерии, особенно гетероферментативные. Их способность во многих случаях активно заселять ризосферу, а также антимикробные и фитостимулирующие свойства могут быть реализованы наиболее полно в этой отрасли сельского хозяйства. Кроме того, современное направление развития растениеводства ориентировано на сокращение объемов применения азотных и фосфорных удобрений и отказ от пестицидов, небезопасных для здоровья человека и приводящих к проблеме резистентности микроорганизмов.

Аналогичная обстановка, связанная с тенденцией уменьшения применения химических консервантов, складывается и в кормопроизводстве. Как известно, зеленые корма, предназначенные для силосования, содержат большое количество спонтанных молочнокислых бактерий, которые быстро размножаются в силосе и синтезируют молочную кислоту, поэтому процесс силосования может протекать зачастую и без внесения биологических заквасок и химических консервантов (Лаптев, 2005). Однако при хранении влажного зерна протекающие в нем микробиологические процессы отличаются от таких же процессов при силосовании зеленых кормов: анаэробные условия в первом случае создаются только через 1-2 дня (Киров, 1982), поэтому возникают благоприятные условия для роста нежелательной микрофлоры. Особенно опасно присутствие в корме плесневых грибов, которые не только существенно снижают содержание сухого вещества в зерне, но и способны продуцировать микотоксины, негативно влияющие на здоровье животных и человека. В связи с

этим актуальными представляются исследования, направленные на поиск молочнокислых бактерий с широким спектром антимикробной активности для борьбы с нежелательной микрофлорой и накоплением микотоксинов при хранении влажного зерна для получения качественного продукта.

На сегодняшний день зарубежный и отечественный опыт свидетельствует о перспективности практического использования молочнокислых бактерий в качестве основы ряда коммерческих биопрепаратов для консервирования влажного зерна («Биотроф-600», «Biocrimp», «Biograin» и др.). Однако в литературе практически отсутствуют сведения о разработке биопрепаратов антифунгального и одновременно фитостимулирующего действия для комплексного использования в растениеводстве и кормопроизводстве, что инициирует проведение исследований в этом направлении.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось получение штамма молочнокислых бактерий с высоким спектром антимикробной и фитостимулирующей активности и изучение его физиолого-биохимических свойств с целью создания основы биопрепарата для комплексного использования в растениеводстве и кормопроизводстве.

В соответствии с поставленной целью выполнялись следующие задачи:

1. Исследование фило- и ризосферы растений как природного местообитания молочнокислых бактерий;
2. Выделение из фило- и ризосферы растений и осуществление скрининга штамма молочнокислых бактерий с высоким спектром фитостимулирующей активности и антимикробных свойств в отношении патогенных микроорганизмов;
3. Выяснение возможных механизмов антимикробной и фитостимулирующей активности отобранного штамма;
4. Оценка биологической эффективности отобранного штамма в лабораторных и производственных условиях.

Научная новизна работы. Впервые установлено, что эпифитный штамм гетероферментативной молочнокислой бактерии *L. buchneri* 600 обладает выраженной антагонистической активностью, подавляя рост многих условно патогенных и патогенных бактерий, а также фитопатогенных грибов.

В условиях вегетационных, микрополевых и полевых опытов экспериментально доказано, что обработка различных сельскохозяйственных культур штаммом *L. buchneri* 600 позволяет значительно увеличить их урожайность. Этот факт дает возможность предположить, что молочнокислые бактерии, обитающие в ризо- и филосфере, находятся в мутуалистических взаимоотношениях с растениями. Кроме того, впервые в результате производственных испытаний установлено, что штамм-антагонист *L. buchneri* 600 эффективно борется с накоплением микотоксинов при хранении влажного плющеного зерна. Все это в совокупности определяет перспективность использования исследуемого штамма в качестве основы нового биопрепарата комплексного действия.

Изучено влияние интродуцированного штамма *L. buchneri* 600 на ризосферную микрофлору под посевами различных сельскохозяйственных

культур. При этом наблюдалась зависимость увеличения урожайности в вариантах с инокуляцией семян некоторых культур от снижения содержания грибов.

С использованием хроматографического метода выявлены антимикробные метаболиты, продуцируемые штаммом *L. buchneri* 600. По результатам тестирования обнаружены три фракции с антимикробной активностью, в том числе масляная и валериановая кислоты. Помимо этого, с использованием аналогичного метода показано, что *L. buchneri* 600 способен к синтезу фитогормонов - ауксинов. При этом показана зависимость биосинтеза фитогормонов от присутствия в среде L-триптофана.

Установлено, что штамм *L. buchneri* 600 обладает способностью к заселению ризосферы растений.

Практическое значение работы. В результате исследований создана коллекция молочнокислых бактерий из рода *Lactobacillus*, для формирования которой в качестве ключевого критерия была использована антагонистическая активность этих бактерий в отношении условно патогенных и патогенных микроорганизмов.

Помимо этого, результаты исследований, освещенные в диссертационной работе, нашли применение в трех хозяйствах Ленинградской и Новгородской областей, что подтверждено актами о внедрении научных исследований.

Кроме того, полученные данные позволяют рекомендовать штамм *L. buchneri* 600 в качестве основы препарата, стимулирующего рост определенного набора сельскохозяйственных культур, для комплексного использования в растениеводстве, а также в кормопроизводстве – для борьбы с нежелательной микрофлорой и накоплением микотоксинов во влажном плющеном зерне при хранении.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на Международном конгрессе "Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты", Санкт-Петербург, 15–16 мая 2007 г., на IV межрегиональной конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой», Саратов, 14-16 октября 2008 г., на научной конференции профессорско-преподавательского состава, Санкт-Петербург, Пушкин, 29, 30 января 2009 г., на Postgraduate Course «Applied and fundamental aspects of responses, signaling and developmental process in the root-microbe systems», Saint-Petersburg, June 25 – July 2, 2007 г. и на Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы заготовки, хранения и рационального использования кормов», Москва, 19, 20 августа 2009 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, 2 из них – в изданиях, входящих в рекомендованный ВАК список.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, экспериментальной части с обсуждением результатов, заключения, выводов и списка литературы (297 источников). Работа изложена на 201 странице, содержит 16 рисунков и 37 таблиц.

Объекты и методы исследования.

Объектами исследований служили штаммы молочнокислых бактерий, выделенные из ризо- и филлосферы растений, а также коммерческий штамм *Lactobacillus buchneri* 600, входящий в состав препарата «Биотроф-600», предназначенного для консервирования плющеного зерна.

В качестве тест-объектов для исследования антагонистических свойств штаммов молочнокислых бактерий были использованы мицелиальные грибы и бактерии, которые были получены из Всероссийской коллекции непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ГНУ ВНИИСХМ.

Тест-культурами для проведения опытов по ростстимулирующей активности, способности к колонизации растений у штаммов микроорганизмов и выделения ризо- и филлосферных молочнокислых бактерий были выбраны следующие растительные объекты: *Anethum graveolens* L. – сорт «Грибовский», *Barbarea vulgaris* L., *Beta vulgaris* L. – сорт «Ренова», *Dactylis glomerata* L. – сорт «ВИК 61», *Elytrigia repens* L., *Glycine max* L. – сорт «Рекорд Северный», *Lactuca sativa* L. – сорт «Гейзер», *Lepidium sativum* L. – сорт «Ажур», *Linum usitatissimum* L. – сорта «Дашковский», «Призыв 81», *Lycopersicon esculentum* Mill. – сорта «Земляк», «Мазарини», «Мечта лентяя», «Тяжеловес Сибири», «Чибис», *Medicago sativa* L. – сорт «Славянская местная», *Petroselinum crispum* L. – сорт «Бриз», *Phleum pratense* L. – сорт «ВИК 9», *Raphanus sativus* L. – сорта «Тогул», «Рудольф», *Trifolium pratense* L. – сорт «ВИК 84», *Triticum aestivum* L. – сорт «Ленинградская 97», *Vicia sativa* L. – сорт «Луговская 85».

В экспериментальном консервировании использовали зерно овса и зерновую смесь: ячмень, пшеница и тритикале.

Микроорганизмы различных физиологических групп культивировали на селективных агаризованных питательных средах (Теппер, 1975; Зенова, 2002; Практикум..., 2004; Практикум..., 2005). Молочнокислые бактерии выявляли на агаризованной среде, включающей в себя пивное сусло, 0,5% мела и 2% этилового спирта (САМ), или на селективной среде Рогозы. Сапротрофные бактерии выявляли на мясо-пептонном агаре (МПА). Актиномицеты учитывали на крахмало-аммиачном агаре (КАА). Микроскопические грибы культивировали на среде Чапека и среде СА (агаризованное пивное сусло). Дрожжи культивировали на среде Сабуро. Олигонитрофилы и азотобактер выявляли на среде Эшби.

Для анализа численности микроорганизмов и выделения изолятов молочнокислых бактерий навески проб (10 г) надземной части вегетирующих растений, ризосферы или плющеного зерна помещали в 90 мл стерильной дистиллированной воды и встряхивали на качалке при 120 об/мин в течение 30 мин. Из полученной суспензии готовили серию разведений и сеяли на твердые питательные среды (Методы микробиологических..., 1973; Методы почвенной..., 1991). Численность микроорганизмов различных физиологических групп в ризосфере, филлосфере и плющеном зерне определяли методом предельных разведений. Для выделения молочнокислых бактерий применяли метод накопительных культур (Теппер, 1975; Зенова, 2002; Практикум..., 2004; Практикум..., 2005).

Антимикробную активность молочнокислых бактерий определяли с использованием метода колодцев (Magnusson, Schnürer, 2001).

Колонизацию бактериями поверхности корня изучали в гнотобиотической системе по методике Симонса (Simons et al., 1996).

Для экстракции антифунгальных метаболитов и фитогормонов (производных ауксина) штамма *L. buchneri* 600 использовали этилацетат. Полученные антимикробные вещества анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления с использованием HPLC системы JASCO LC-900 (Jasco International CO., LTD, Japan).

Для выявления биологической активности штаммов молочнокислых бактерий и продуктов их метаболизма (органических кислот) была проведена серия вегетационных, микрополевых и полевых экспериментов (Журбицкий, 1968). Во всех случаях, когда в опытных вариантах проводилась обработка растений культуральной жидкостью штаммов молочнокислых бактерий, в контрольных вариантах проводилась аналогичная обработка растений в питательной среде эквивалентной концентрации без бактерий. В конце вегетации растений проводили учет надземной и подземной биомассы, вес и количество созревших плодов. Оценка эффективности обработки растений штаммом *L. buchneri* 600 проводили, сравнивая биометрические показатели в контрольном и опытном вариантах. Помимо этого, в конце вегетации производили отбор растений для анализа численности микроорганизмов в ризосферной зоне растений. Полевые эксперименты осуществлялись на полях ОАО Уторгошского льнозавода Шимского района Новгородской области. Опытные делянки имели площадь 1 га, повторность опыта однократная. Норма высева льна - 100 кг/га. Глубина заделки семян - 2 см (Соловьев, 1978).

Эффективность штамма *L. buchneri* 600 против возбудителя фузариоза томатов *Fusarium oxysporum* испытывали в условиях вегетационного опыта на томате сорта «Земляк». Почву дополнительно инфицировали спорами фитопатогенного гриба *F. oxysporum* (Методические указания..., 1980). Эффективность штамма *L. buchneri* 600 определяли при сопоставлении развития фузариоза томатов (Поликсенова, 1987) в опыте и контрольных группах (Методические указания..., 1980). Кроме того, проводили измерения биометрических показателей растений томатов, а также учитывали процент распространения фузариоза в стеблях томатов.

Производственные испытания по консервированию плющеного зерна: овса и зерновой смеси (ячменя, пшеницы и тритикале) – штаммом *L. buchneri* 600 были проведены в хозяйствах Ленинградской области: ЗАО «Тельмана» и ЗАО «Копорье». Образцы для анализа качества плющеного зерна, численности микроорганизмов и микотоксинов отбирали в начале эксперимента и через 105 суток. Определяли следующие показатели качества плющеного зерна: общую влажность (ГОСТ 13496.3-92), сухое вещество (ГОСТ 13496.3-80), содержание сырой клетчатки (ГОСТ 13496.2-91), общего азота (ГОСТ Р 51417-99), сырого протеина, растворимых углеводов (ГОСТ 26176-91), обменную энергию и кормовые единицы (ГОСТ Р 23638-90) (Дмитроченко, 1936). Анализ

микотоксинов в плющеном зерне проводили с использованием иммуноферментного метода (ГОСТ Р 52471-2005).

Математическая и статистическая обработки результатов проводили стандартными методами дисперсионного анализа (Фишер, 1958; Доспехов, 1985; Методические указания..., 1985; Лакин, 1990) с использованием программного обеспечения EXCEL XP/200.

Результаты и обсуждение

Выделение и изучение свойств штаммов молочнокислых бактерий в опытах *in vitro*

В рамках данных исследований было определено содержание молочнокислых бактерий в ризо- и филлосфере растений. Наибольшая численность молочнокислых бактерий была выявлена в ризосфере *Petroselinum crispum* L. ($1,2 \cdot 10^6$ КОЕ/г) (табл. 1). Высокое их содержание было обнаружено и филлосфере *Trifolium pratense* L. и *Vicia sativa* L. (10^5 КОЕ/г). Наличие молочнокислых бактерий в ризосфере *Linum usitatissimum* L., *Glycine max* L. и *Barbarea vulgaris* L. обнаружить не удалось. Численность исследуемых бактерий в ризосфере *Medicago sativa* L., *Elytrigia repens* L., *Raphanus sativus* L., *Lactuca sativa* L., *Beta vulgaris* L., *Phleum pratense* L. и *Anethum graveolens* L. варьировала от 10^2 до 10^4 КОЕ/г.

Полученные нами результаты позволяют сделать вывод о том, что молочнокислые бактерии широко распространены в ризо- и филлосфере высших растений. Факт наличия молочнокислых бактерий в ризо- и филлосфере растений был отмечен ранее рядом исследователей (Гардер и др., 1935; Макарова, 1962; Ruschmann et al., 1930; Arnaudí, 1940; Chen et al., 2005). Так, Квасников (Квасников, 1948, 1956, 1958, 1960) на основании проведенных исследований сделал вывод, что почва – это одна из основных и первичных сред обитания молочнокислых бактерий.

При этом приведенные нами данные вступают в определенное противоречие с выводами ряда ученых, считавших, что молочнокислые бактерии либо полностью отсутствуют в ризо- и филлосфере растений, либо выделяются оттуда только в редких случаях (Weigmann et al., 1922; Hüttig, 1927; Barthel, 1937). Таких взглядов, к примеру, придерживался Шлегель (Шлегель, 1987), который утверждал, что молочнокислые бактерии совершенно не встречаются в почве. Возможно, основной причиной, обуславливающей недооценку почвы как среды обитания молочнокислых бактерий, являлось то, что при выявлении данных микроорганизмов применялись методы, обычно принятые при изучении их в молочных продуктах. При этом посторонние микроорганизмы, энергично размножающиеся на используемых средах, подавляли молочнокислые бактерии и не позволяли исследователям обнаружить их.

На следующем этапе работы нами из филло- и ризосферы растений было изолировано около 200 штаммов с характерными признаками молочнокислых бактерий. По результатам первичного отбора для дальнейших исследований были взяты 36 изолятов, проявивших антагонистическую активность. По

совокупности результатов дифференциально-диагностического тестирования данные изоляты были отнесены к семейству *Lactobacillaceae*, роду *Lactobacillus*.

Таблица 1

Количество молочнокислых бактерий в ризо- и филлосфере некоторых покрытосеменных растений, 10^3 КОЕ/г * - зеленой массы, ** - почвы

Растение	Источник	Численность молочнокислых бактерий
<i>Dactylis glomerata L.</i>	филлосфера *	10,0±0,29
<i>Vicia sativa L.</i>	филлосфера	130±4,6
<i>Trifolium pratense L.</i>	филлосфера	110±3,2
<i>Linum usitatissimum L.</i>	ризосфера **	Не обнаружено
<i>Medicago sativa L.</i>	ризосфера	4±0,11
<i>Petroselinum crispum L.</i>	ризосфера	1200±40
<i>Elytrigia repens L.</i>	ризосфера	1,0±0,04
<i>Raphanus sativus L.</i>	ризосфера	0,8±0,03
<i>Lactuca sativa L.</i>	ризосфера	8,0±0,5
<i>Beta vulgaris L.</i>	ризосфера	40,0±1,9
<i>Glycine max L.</i>	ризосфера	Не обнаружено
<i>Barbarea vulgaris L.</i>	ризосфера	Не обнаружено
<i>Phleum pratense L.</i>	ризосфера	1,0±0,02
<i>Lycopersicon esculentum Mill.</i>	ризосфера	7,0±0,3
<i>Anethum graveolens L.</i>	ризосфера	0,1±0,002

Изучен спектр антимикробного влияния выделенных изолятов, а также коммерческого штамма производства ООО «Биотроф» *L. buchneri* 600, используемого в качестве основы препаратов для консервирования плющеного зерна.

Максимальная антимикробная активность в отношении патогенных бактерий, а также фитопатогенных грибов была отмечена у штамма *L. buchneri* 600 (табл. 2), который был отобран для дальнейшей работы как наиболее перспективный для таких областей производства, как защита растений и консервирование кормов, где его антагонистический потенциал может быть использован в наибольшей степени.

Таблица 2

Размеры зон ингибирования роста грибов и бактерий штаммом *L. buchneri* 600

Тест-объект	Радиус зоны подавления роста тест-культуры, мм
<i>Fusarium oxysporum</i>	16,0±0,6
<i>F. solani</i>	18,0±0,6
<i>F. graminearum</i>	14,0±0,6
<i>Bacillus subtilis</i>	15,0±0,3
<i>B. mesentericus</i>	16,0±0,5
<i>Escherichia coli</i>	4,0±0,2

Многими исследователями (Niku-Paavola et al., 1999 ; Lavennicocca et al., 2000, 2003) установлено, что антимикробная активность молочнокислых бактерий связана с продуцированием ими различных метаболитов. В связи с этим были проанализированы антимикробные метаболиты у штамма *L. buchneri* 600, проявившего высокую антагонистическую активность.

Хроматографический анализ этилацетатного экстракта культуральной жидкости штамма выявил наличие в анализируемом экстракте трех фракций с антимикробной активностью, в том числе валериановую и масляную кислоты (рис. 1). Таким образом, установлено, что основным типом взаимоотношений исследуемой культуры-антагониста с патогенами является антибиоз, обусловленный действием внеклеточных метаболитов.

Известно, что штаммы, обладающие антагонистическими свойствами, нередко являются активными стимуляторами роста растений. Поэтому очередной нашей задачей было оценить, как влияет отобранный перспективный штамм *L. buchneri* 600 в различных концентрациях на рост и развитие проростков кресс-салата.

Анализ показал, что штамм обладает фитостимулирующим действием. Самые высокие показатели роста и развития проростков кресс-салата были отмечены при концентрации 10^5 КОЕ г/семян. При этом длина стеблевой и корневой частей проростков увеличивалась на 13,3 и 36,7% соответственно по сравнению с контрольными вариантами.

Известно, что эффект стимуляции роста растений многими бактериями связан с образованием ими какого-либо вида или целого набора биологически активных веществ. В связи с этим для выяснения механизма положительного влияния штамма *L. buchneri* 600 на рост растений было изучено влияние продуктов его метаболизма: валериановой и масляной кислот - на рост и развитие кресс-салата.

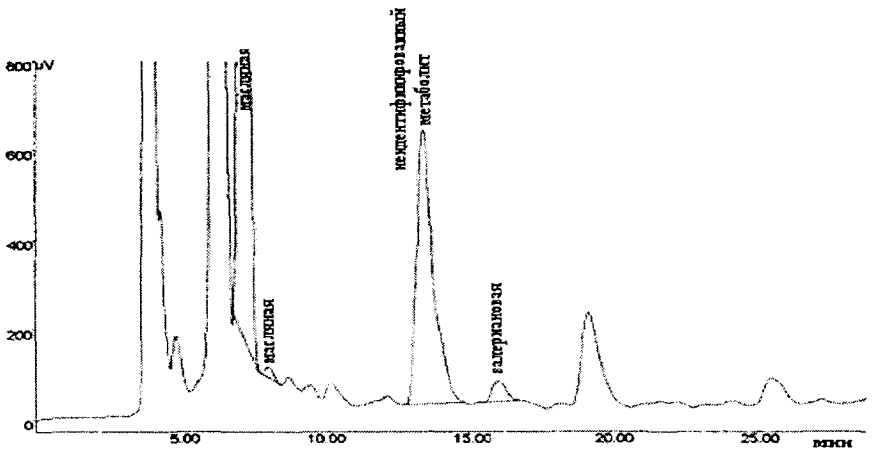


Рис. 1. Идентификация метаболитов штамма *L. buchneri* 600, обладающих антифунгальной активностью

Как показали результаты исследований, замачивание семян в масляной и валериановой кислотах оказало стимулирующее влияние на длину корней и стеблей кресс-салата. В результате воздействия валериановой кислоты длина стеблевой и корневой частей проростков увеличивалась на 12,0 и 20,1% соответственно, масляной кислоты – на 10,5 и 19,8%.

По данным литературы (Yokoyama et al., 1981; Honeyfield et al., 1990a; Honeyfield et al., 1990b; Gummala et al., 1999), помимо синтеза органических кислот, еще одним механизмом положительного влияния молочнокислых бактерий на растения является синтез фитогормонов. Однако только некоторые бактериальные культуры могут синтезировать небольшие количества индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) без добавления экзогенного L-триптофана, являющегося метаболическим предшественником ауксинов (Frankenberger et al., 1995).

Целью следующего этапа работы было проведение хроматографического анализа ауксинов в культуральной жидкости штамма *L. buchneri* 600 при росте на минеральной среде с L-триптофаном.

Анализ показал, что исследуемый штамм способен синтезировать четыре ауксина: индолил-3-уксусную кислоту, индолил-3-молочную кислоту, индолил-3-карбоновую кислоту и индолил-альдегид. При этом присутствие в питательной среде L-триптофана вызывает усиление биосинтеза в основном индолил-3-молочной кислоты и в небольшой степени индолил-3-уксусной кислоты, тогда как интенсивность продуцирования индолил-3-карбоновой кислоты снижается с повышением в среде концентрации L-триптофана, а индолил-альдегид продуцировался только в варианте с 10 мкг/мл L-триптофана (рис. 2).

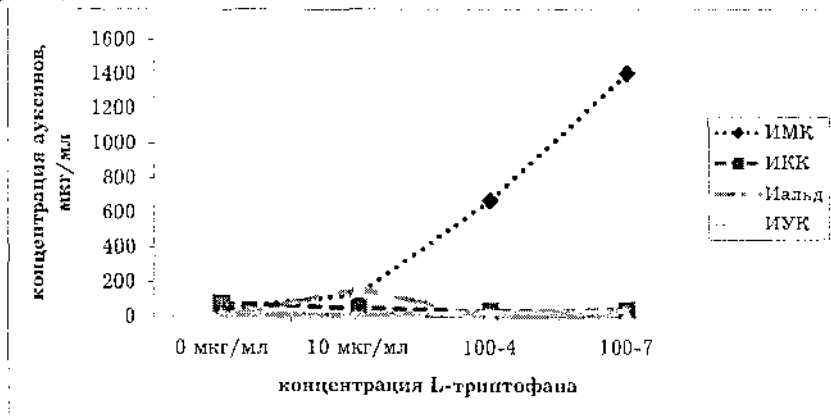


Рис. 2. Зависимость количества продуцируемых штаммом *L. buchneri* 600 ауксинов от концентрации L-триптофана. ИМК – индолил-3-молочная кислота, ИКК – индолил-3-карбоновая кислота, Иальд – индолил-альдегид, ИУК – индолил-3-уксусная кислота. 100-4 – 100 мкг/мл, четырехсуточная культура. 100-7 – 100 мкг/мл, семисуточная культура

Порог физиологического действия ауксинов, определяемый для корневой системы растений различных видов, составляет 10^{-11} - 10^{-9} М (Frankenberger et al., 1995). Уровень ауксинов, обнаруженный в культуральной жидкости штамма *L. buchneri* 600, в эти пределы попадает.

Антагонистические и фитостимулирующие свойства бактерий, интродуцированных в ризосферу растений, наиболее полно проявляются в тех случаях, когда бактерии обладают способностью к активной колонизации корней. Поэтому очередная цель работы состояла в определении колонизационного потенциала штамма *L. buchneri* 600.

Как показали проведенные исследования, штамм *L. buchneri* 600 значительно более энергично развивался в ризосфере редиса, чем в прикорневой зоне томатов. Плотность популяции данного штамма в ризосфере томатов составляла $3,8 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы, в ризосфере редиса - $3 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы (табл. 3).

Таблица 3

Численность *L. buchneri* 600 в ризосфере редиса и томатов,
 10^3 КОЕ/г почвы

Культура	Численность <i>L. buchneri</i> 600 ризосфере
Редис	298 ± 13
Томат	$3,8 \pm 0,2$

Согласно данным литературы, положительное влияние инокуляции семян или корней PGPR-штаммами на рост и развитие растений, а также биоконтрольные показатели проявляются при численности этих микроорганизмов в ризосфере от 10^3 до 10^8 КОЕ/г (Maplestone et al., 1989). Колонизирующая активность штамма *L. buchneri* 600 в эти пределы попадает.

Оценка эффективности применения штаммов молочнокислых бактерий для защиты от болезней и повышения урожайности сельскохозяйственных культур

Задачей дальнейших исследований было определить, сохраняется ли у штамма *L. buchneri* 600 фитостимулирующая и антимикробная активность в условиях *in vivo*.

Нами был проведен ряд вегетационных, микрополевых и полевой опыт по изучению эффективности использования штамма *L. buchneri* 600 для стимуляции роста и повышения урожайности различных сельскохозяйственных культур.

Результаты вегетационных и микрополевых опытов показали, что прибавка урожайности вследствие инокуляции семян различных сельскохозяйственных культур штаммом *L. buchneri* 600 варьировала от 4,5 до 67,1% (табл. 4). Однако при этом бактериализация семян снижала урожайность салата листового сорта «Гейзер» на 23,3% и пшеницы на 20,5%.

Таблица 4

Влияние применения *L. buchneri* 600 на урожайность сельскохозяйственных культур в условиях вегетационных (вег.) и микрополевых (м.п.) опытов

Культура	Опыт	<i>L. buchneri</i> 600, %*
Томаты различных сортов	вег.	108,2±4,1-115,6±1,5
Редис, сорт «Тогул»	вег.	167,1±7,2
Свекла, сорт «Ренова»	вег.	111,1±14,7**
Ежа сборная, сорт «ВИК 61»	м.п.	115,7±5,1
Тимофеевка луговая, сорт «ВИК 9»	м.п.	104,5±4,8
Лен, сорт «Призыв 81»	вег.	140,8±6,2
Соя, сорт «Рекорд Северный»	вег.	154,1±5,0
Салат, сорт «Гейзер»	вег.	76,7 ±2,8
Пшеница, сорт «Ленинградская 97»	вег.	79,5±10,6**

* - процент относительно контрольного варианта; ** - различия не достоверны.

Следует подчеркнуть, что наблюдалась зависимость увеличения урожайности томатов сорта «Тяжеловес Сибири», редиса и льна в вариантах с инокуляцией семян штаммом *L. buchneri* 600 от снижения численности грибов и возрастания содержания молочнокислых бактерий в ризосфере (табл. 5). Таким образом, увеличение урожайности этих культур происходило, вероятно, за счет прямой стимуляции роста растений с помощью продуцирования бактерией фитогормонов и органических кислот, а также косвенно – за счет вытеснения фитопатогенных грибов и бактерий из ризосферы.

Таблица 5

Влияние инокуляции семян штаммом *L. buchneri* 600 на численность микроорганизмов в ризосфере, 10³ КОЕ/г почвы

Группы микроорганизмов	Томат		Редис	
	Контроль	<i>L. buchneri</i>	Контроль	<i>L. buchneri</i>
Молочнокислые бактерии	3,0±0,12	28,5±0,2	0,8±0,11	400±56
Грибы	3,0±0,09	1,4±0,05	12,6±2,6	5,6±1,42

Таким образом, в результате инокуляции семян штаммом в вегетационных опытах установлена специфичность видовой и сортовой реакции растений на бактеризацию. По мнению Л.В. Кравченко (Кравченко, 2000), рострегулирующее влияние PGPR-штаммов на растение определяется степенью соответствия его корневых выделений пищевым потребностям штаммов-инокулятов. Возможно, в наших опытах корневые экссудаты салата и пшеницы состояли из неблагоприятного соотношения индивидуальных компонентов, что отрицательно сказалось на биосинтезе ауксинов исследуемым штаммом и не вызвало позитивного эффекта от его применения на этих культурах.

Одной из наиболее вредоносных болезней томата является фузариоз, вызываемый грибом *Fusarium oxysporum*. В лабораторных экспериментах мы показали, что штамм *L. buchneri* 600 активно подавляет его развитие. Это

обусловило дальнейшее исследование антагонистических свойств данного штамма против гриба *F. oxysporum* в условиях вегетационного опыта.

Опыт был проведен при внесении дополнительной инфекционной нагрузки в почву. В варианте с инокуляцией семян томата сорта «Земляк» штаммом *L. buchneri* 600 происходило снижение развития фузариозного увядания томатов на 10% по сравнению с контролем (рис. 3).

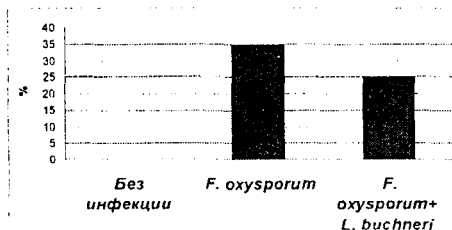


Рис. 3. Влияние применения штамма *L. buchneri* 600 на развитие фузариоза томатов

Кроме серии вегетационных опытов, нами был поставлен полевой эксперимент на полях ОАО Уторгошского льнозавода Шимского района Новгородской области по влиянию различных способов обработок штаммом *L. buchneri* 600 на урожайность льна-долгунца сорта «Дашковский». На данном поле лен бессеменно выращивался второй год.

Анализ результатов оценки биометрических показателей льна продемонстрировал, что три различных способа обработки штаммом (инокуляция семян, опрыскивание растений и бактеризация семян и опрыскивание растений совместно) в целом положительно повлияли на рост и развитие льна по сравнению с контрольным вариантом (табл. 6).

Таблица 6

Влияние применения штамма *L. buchneri* 600 на рост и развитие льна, %

Показатели	Инокуляция семян *	Опрыскивание в фазу елочки*	Инокуляция семян +опрыскивание*
Общая длина стеблей	111,0±4,0	117,0±5,4	111,0±2,1
Техническая длина стеблей	97,6±5,8	112,7±6,9	114,6±4,2
Сырой вес надземной массы	148,3±13,6**	137,5±12,4**	127,3±2,1
Количество растений	104,7±36,8**	93,4±18,4**	154,8±13,5**
Диаметр стебля	130,8±6,9	130,8±8,4**	107,7±3,8
Количество коробочек	131,3±2,5	140,6±2,2	115,5±2,8
Сырой вес коробочек	121,4±4,8	111,3±3,6	92,9±4,5
Сухой вес семян в коробочке	102,1±2,2	108,7±4,3	104,3±4,3

* - процент относительно контрольного варианта; ** - различия не достоверны.

Результаты определения влияния применения штамма *L. buchneri* 600 на урожайность и качество тресты показали, что треста во всех опытных вариантах имела более высокий показатель качества (номер). Как известно, при механической обработке тресты получается различный волокнистый материал с разной прядильной способностью: длинное волокно и менее ценное короткое волокно. В нашем эксперименте в опытных группах содержание короткого волокна было выше по сравнению с контрольной группой, а длинное волокно в тресте присутствовало только в вариантах с применением бактерии.

Результаты консервирования плющеного зерна штаммом *L. buchneri* 600 в производственных условиях

Общезвестно, что штаммы бактерии *L. buchneri* в связи с их высокой антимикробной активностью находят широкое применение при консервировании фуражного плющеного зерна (Holzer et al., 2003). Поэтому еще одной целью данной работы было изучение влияния штамма *L. buchneri* 600 на содержание микрофлоры, количество микотоксинов и качество плющеного зерна при хранении.

В двух хозяйствах Ленинградской области: ЗАО «Тельмана» и ЗАО «Копорье» - были проведены производственные испытания по консервированию плющеного зерна: овса и зерновой смеси (ячменя, пшеницы и тритикале) - убранный с полей в фазе молочно-восковой спелости при влажности 35%, штаммом *L. buchneri* 600. Анализ микрофлоры плющеного зерна через 3,5 месяцев хранения в обоих вариантах показал, что применение штамма привело к резкому снижению численности микромицетов и гнилостной микрофлоры по сравнению с исходным зерном. Показатели качества корма (содержание сухого вещества, сырой клетчатки, общего азота, сырого протеина, растворимых углеводов, обменной энергии и кормовых единиц) в консервированном зерне были практически неизменны по сравнению с исходной массой.

Анализ содержания микотоксинов в плющеном зерне показал отсутствие там таких микотоксинов, как охратоксин, Т-2токсин, зеараленон, фумонизины (табл. 7). Афлатоксин В1 присутствовал только в зерновой смеси на исходном этапе хранения, через 3,5 месяцев хранения его содержание снизилось до предела достоверного определения. Содержание ДОНа несколько возросло при хранении зерна овса и зерновой смеси, однако не превышало уровень ПДК - 1,0 мг/кг.

Принимая во внимание тот факт, что содержание микотоксинов в зерне при хранении без использования консервантов может возрастать в десятки раз, трудно переоценить значение того, что штамм *L. buchneri* 600 эффективно борется с накоплением микотоксинов во влажном зерне при хранении.

Содержание микотоксинов (мг/кг сухого вещества) в плющеном зерне, консервированном штаммом *L. buchneri* 600

Основные группы микотоксинов	Овес (ЗАО «Тельмана»)		Зерновая смесь (ЗАО «Копорье»)	
	Исходное зерно	<i>L. buchneri</i> 600	Исходное зерно	<i>L. buchneri</i> 600
Афлатоксин В1	<п.д.о. ¹	н/о ²	0,0068±0,00002	<п.д.о.
Охратоксин	н/о	н/о	н/о	н/о
Т-2токсин	<п.д.о.	<п.д.о.	н/о	н/о
ДОН	0,22±0,007	0,57±0,02	0,54±0,02	0,87±0,03
Зеараленон	<п.д.о.	н/о	<п.д.о.	н/о
Фумонизины	<п.д.о.	н/о	н/о	н/о

п.д.о.¹ - предел достоверного определения; н/о² - не обнаружен.

Заключение

Подводя итог вышесказанному, следует сказать, что на примере штамма *L. buchneri* 600 нами установлена новая важная роль ризо- и филлосферных молочнокислых бактерий в качестве фитосимбионтов. С одной стороны, обитая в прикорневой зоне и на поверхности побегов, эти микроорганизмы используют в качестве источников питательных веществ экссудаты, выделяемые тканями растений. Это позволяет молочнокислым бактериям с достаточно высокой плотностью колонизировать ризо- и филлосферу и, по-видимому, успешно конкурировать с другими микроорганизмами. В то же время ряд биоактивных соединений (фитогормоны, органические кислоты), выделяемых этими микроорганизмами, оказывает благоприятное воздействие на рост и развитие растений, а также борется с фитопатогенами, что обеспечивает молочнокислым бактериям активное участие в формировании мутуалистических взаимоотношений с растениями.

Выводы

1. Проведенные исследования показали, что молочнокислые бактерии широко распространены в ризо- и филлосфере растений. По-видимому, источником молочнокислых бактерий, обитающих на поверхности побегов, является прикорневая зона растений. Из ризо- и филлосферы растений выделены 36 изолятов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*, обладающих высокой антимикробной активностью.
2. В результате скрининга штаммов молочнокислых бактерий отобран штамм гетероферментативной молочнокислой бактерии *L. buchneri* 600, обладающий наибольшей антагонистической активностью в отношении условно патогенных и патогенных бактерий, а также фитопатогенных грибов.
3. Впервые методом хроматографического анализа выявлены антимикробные метаболиты, продуцируемые штаммом *L. buchneri* 600. По

результатам тестирования обнаружены три фракции с антимикробной активностью, в том числе масляная и валериановая кислоты. Помимо этого, с использованием аналогичного метода показано, что *L. buchneri* 600 способен к синтезу ряда фитогормонов - ауксинов. При этом присутствие в питательной среде L-триптофана оказывает существенное влияние на синтез фитогормонов.

4. Установлено, что штамм *L. buchneri* 600 обладает способностью к колонизации корней растений. При этом выявлена различная степень способности исследуемой бактерии к заселению корней растений разных видов.

5. Экспериментально доказано, что обработка различных сельскохозяйственных культур культуральной жидкостью штамма *L. buchneri* 600 позволяет значительно увеличить их урожайность. Однако при этом бактериализация некоторых видов растений исследуемым штаммом снижает их урожайность. Факт специфичности реакции разных видов растений на использование штамма *L. buchneri* 600 в наших экспериментах может быть использован в создании селективного препарата направленного физиологического действия для определенного набора растений.

6. Показано, что валериановая и масляная кислоты - продукты метаболизма штамма *L. buchneri* 600 - оказывают стимулирующее действие на некоторые виды сельскохозяйственных культур, что дает более подробное представление о механизмах ростстимулирующего действия исследуемого штамма.

7. Установлено, что штамм *L. buchneri* 600 при интродукции в ризосферу различных растений способен снижать численность грибной микрофлоры. Необходимо отметить, что наблюдается зависимость увеличения урожайности сельскохозяйственных культур в вариантах с бактериализацией семян от снижения содержания грибов. Вероятно, это происходит за счет уменьшения патогенной нагрузки в почве.

8. В вегетационных опытах показано, что интродукция штамма-антагониста *L. buchneri* 600 в ризосферу томата на фоне искусственного заражения грибом *F. oxysporum* снижает развитие фузариозного увядания томатов на 10%.

9. В результате производственных испытаний установлено, что штамм-антагонист *L. buchneri* 600 эффективно подавляет нежелательную микрофлору и борется с накоплением микотоксинов во влажном плющеном зерне при хранении.

Рекомендации по практическому использованию результатов.

Проведенные лабораторные и вегетационные опыты, а также производственные испытания позволяют рекомендовать к практическому применению штамм бактерий *L. buchneri* 600 в качестве основы биопрепарата для комплексного использования в растениеводстве для стимуляции роста растений и кормопроизводства для консервирования плющеного зерна.

Публикации по теме диссертации

1. Лапицкая Е.А. «Биотроф-600» эффективно борется с микотоксинами / Е.А. Лапицкая, И.Н. Никонов, В.В. Солдатова // Животноводство России. – М., 2008. – №5. – С. 3.
2. Лапицкая Е.А. Поиск молочнокислых бактерий в ризосфере и филлосфере покрытосеменных растений / Е.А. Лапицкая, И.Н. Никонов, Л.А. Кражевских // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: материалы IV межрегиональной конф. молодых ученых. Саратов, 14-16 октября 2008 г. – Саратов, 2008. – С. 17.
3. Лапицкая Е.А. Препарат «Биотроф-600» - стимулятор роста томатов / Е.А. Лапицкая, В.Б. Петров, И.Н. Никонов, Л.А. Кражевских, Г.Ю. Лаптев // Аграрный вестник Урала. – Екатеринбург, 2008. – №5 (47) – С. 42-43.
4. Лапицкая Е.А. «Биотроф-600» препятствует развитию микотоксинов / Е.А. Лапицкая, И.Н. Никонов, В.В. Солдатова // Сельскохозяйственные вести. – М., 2009. – №2 (77). – С. 22.
5. Лаптев Г.Ю. Результаты оценки антагонистической активности гетероферментативных молочнокислых бактерий – основы пробиотических препаратов / Г.Ю. Лаптев, Е.А. Лапицкая // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты: материалы междунар. конгресса. Санкт-Петербург, 15–16 мая 2007 г. – С-Пб, 2007. – № 1-2. – С. 46-47.
6. Лаптев Г.Ю. Эффективность препарата «Биотроф-600» для борьбы с нежелательной микрофлорой при хранении плющеного зерна / Е.А. Лапицкая, В.В. Солдатова // Актуальные проблемы заготовки, хранения и рационального использования кормов: материалы междунар. научно-практической конф. Москва, 19-20 августа 2009 г. – М., 2009. – С. 41-45.
7. Lapitskaya E.A. Antimicrobial activity of heterofermentative lactic acid bacteria / E.A. Lapitskaya // Applied and fundamental aspects of responses signaling and developmental process in the root-microbe systems: postgraduate Course Volume of Abstracts. St.-Petersburg, June 25 – July 2, 2007. - St.-Petersburg, 2007. - P. 92.