

М.А. МЕЛКУМЯН, Б.Г. БАБАЯН, М.А. КИНОСЯН, Н.А. ОГАНЕСЯН
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ *BREVIBACILLUS LATEROSPORUS* НА
ФИТОПАТОГЕНЫ

Фитопатогенные микроорганизмы, фитофаги и насекомые наносят вред сельскохозяйственным культурам. Благодаря способности энтомопатогенов *Bacillus* при споруляции образовывать антибактериальные и биоцидные токсины их используют при производстве экологически безопасных биопестицидов. В данной работе изучено влияние различных штаммов *B. laterosporus* на фитопатогены.

Ключевые слова: фитопатогены, энтомопатогены, *Pseudomonas syringae*, *Brevibacillus laterosporus*, *Pectobacterium carotovorum*, *Rhodococcus fascians*, *Xanthomonas vesicatoria*, биопестициды.

Введение. Фитопатогенные микроорганизмы представляют серьезную угрозу для сельского хозяйства, растениеводства и лесных хозяйств. Известно, что энтомопатогенные микроорганизмы способны уничтожать насекомых-вредителей, также негативно влияющих на урожайность сельскохозяйственных культур [1]. Помимо того, широко известна их способность к формированию кристаллоподобных включений – токсинов с биоцидной и антибактериальной активностью. Энтомопатоген *Brevibacillus laterosporus* интересен также тем, что он не обладает токсичностью для человека и гомойотермных животных [2,3]. Ввиду возрастающей актуальности экологически безопасных методов защиты растений нами было исследовано влияние энтомопатогенных, спорообразующих бактерий *Bacillus thuringiensis* (BT), *Brevibacillus laterosporus* (BL) и *Lysinibacillus sphaericus* (LS) на штаммы различных видов фитопатогенов: *Pectobacterium carotovorum*, *Rhodococcus fascians*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae*.

Материалы и методы. Используемые в работе штаммы были предоставлены сотрудниками ЦДМ НПП «Армбиотехнология» НАН РА. Штаммы бактерий были культивированы в аэробных условиях на различных жидких и твердых средах согласно стандартным протоколам [4,5]. Были использованы следующие твердые агаризованные среды: 1,8% МПА (для поддержания и выращивания чистых культур); 0,7% и 1,8% МПА (для скрининга активности); среда Эшби: K_2HPO_4 – 0,02%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,02%, NaCl – 0,02%, сахароза – 2,0%, $CaCO_3$ – 0,3%, агар – 2,0% (для определения роста штаммов на минимальной среде). В качестве источника азота было стерильно добавлено 0,02% - $NaNO_3$. Для приготовления суспензий были использованы стерильные 0,9%

раствор NaCl и L-бульон (МПБ) [6]. Скрининг взаимодействия энтомопатогенов с фитопатогенами проводили двуслойным агаровым методом. Суспензию клеток фитопатогена готовили в стерильном 0,9% растворе NaCl с титром 10^8 клеток, внося по 0,1 мл в 2,5 мл 0,7% среду МПА, и высевали газон – вторым слоем поверх среды МПА 1,8% в чашках Петри. На застывший газон фитопатогеном через реплику наносили энтомопатоген или его супернатант в соответствующем разведении, с использованием физиологического раствора, инкубируя 18...24 ч при 30...37°C. Рост и подавление фитопатогена регистрировали по диаметру стерильных зон. Определение роста штаммов на минимальной среде Эшби проводили, капая по 3 мкл суспензии: фитопатогена, энтомопатогена, фитопатогена и энтомопатогена (в той же зоне), супернатанта энтомопатогена и фитопатоген (в той же зоне), с инкубацией 18 – 24 ч при 30°C, измеряя диаметр стерильных зон. Стерилизация проводилась методом кипячения при 100°C в течение 5 мин.

Опыты в жидких средах проводили, подращивая на качалке совместно культуру фитопатогена с энтомопатогеном, измеряя ОП (оптическую плотность) при длине волны 540 нм в процессе роста каждые 1,5...2 ч. Исследования проводили с использованием культуральной жидкости энтомопатогенов и бесклеточной культуральной жидкости (супернатанта) в различных разведениях. Подавление определялось по кривым роста графически (рис.). Определение действия изменения температуры на антибактериальную активность проводили путем нагревания до 80°C в течение 15 мин культуры и ее супернатанта. После нагрева энтомопатоген и его супернатант наносили каплями по 3 мкл на газон с фитопатогеном, инкубируя 18...24 ч при 30...37°C в зависимости от штамма, и измеряли диаметр стерильных зон.

Результаты. Согласно полученным данным, штаммы *BL 200-4*, *561-1*, *199-3*, *105-2*, *219-2* проявили самый широкий спектр подавляющего действия (таблица).

Согласно результатам экспериментов в жидкой и твердой средах, приведённых на таблице и на рисунке, *BL 200-4* подавляет рост 14 штаммов фитопатогенов из 15 проверенных. Штаммы *BL 561-1*, *219-2* подавляют 13 штаммов фитопатогенов, а штамм *BL 105* подавляет рост 11 штаммов, *BL 69-3-5* не подавляет все 15 изученных штаммов фитопатогенов различных видов, а *BL 200-4* подавляет рост *P. carotovorum 8690* примерно на $\geq 60\%$.

Таблица

Скрининг спектра подавляющей активности энтомопатогенов. *Bacillus thuringiensis* (BT), *Brevibacillus laterosporus* (BL) и *Lysinibacillus sphaericus* (LS); число выражает количество подавляемых штаммов приведенного вида активного энтомопатогена

| Фитопатогенные бактерии | Число подавляемых штаммов активных энтомопатогенов | | |
|---|--|----|----|
| | BT | BL | LS |
| <i>P. carotovorum</i> 8764 | 8 | 5 | 1 |
| <i>P. carotovorum</i> 8702 | 1 | 2 | 1 |
| <i>P. carotovorum</i> 8705 | - | 3 | 1 |
| <i>P. carotovorum</i> 8718 | - | 2 | 1 |
| <i>P. carotovorum</i> 8690 | 3 | 4 | 3 |
| <i>P. carotovorum</i> 8694 | 8 | 5 | 22 |
| <i>P. carotovorum</i> 9756 | - | 4 | 5 |
| <i>P. carotovorum</i> 8698 | 8 | 5 | 7 |
| <i>X. vesicatoria</i> 8647 | 2 | 4 | 1 |
| <i>Rh. fasciones</i> 8628 | 2 | 2 | 2 |
| <i>P. syringae</i> 8874 pv. <i>lachrymans</i> | 2 | 5 | 9 |
| <i>P. syringae</i> 8736 pv. <i>lachrymans</i> | 5 | 5 | 12 |
| <i>P. syringae</i> 8740 pv. <i>lachrymans</i> | - | 5 | - |
| <i>P. syringae</i> 8744 pv. <i>lachrymans</i> | - | 5 | 8 |
| <i>P. syringae</i> 8656 pv. <i>lachrymans</i> | 7 | 5 | 7 |

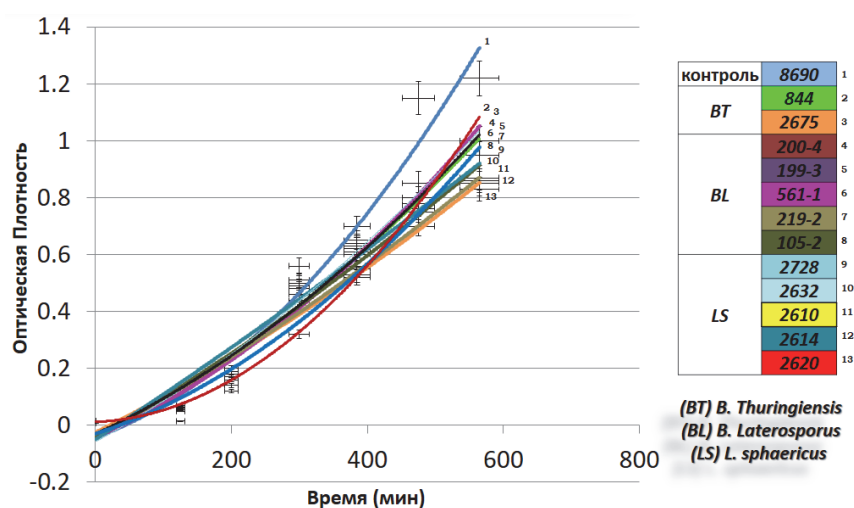


Рис. Скрининг активности *Bacillus thuringiensis* (BT), *Brevibacillus laterosporus* (BL) и *Lysinibacillus sphaericus* (LS) против фитопатогена *P. carotovorum* 8690 при культивации в жидкой среде

Как видно из графиков, подавление составляет 43...53%. В опытах с использованием полноценной твердой культивационной среды зоны лизиса газона составляли от 6...7 мм, до 15...18 мм. Дальнейшие исследования показали, что и культуральная жидкость, супернатант, и разведения супернатанта (1:1; 1:2; 1:5; 1:10) изучаемых энтомопатогенов подавляют рост газона исследуемых фитопатогенов. В случае разведения 1:50 и 1:100 подавление роста отсутствует, либо регистрируется следовое подавление в зависимости от конкретных штаммов фитопатогена и энтомопатогена. Изучение роста *P. carotovorum* 8690 под действием *BL 200-4*, обладающего наибольшим спектром подавления, на минимальной солевой среде Эшби показало способность обоих штаммов к росту в этой среде, а также интенсивное подавление роста фитопатогена энтомопатогеном как в случае культуральной жидкости, так и в случае супернатанта [7]. Зоны подавления культуральной жидкостью составляли соответственно 11 мм, 12 мм, 12 мм, а для супернатанта – 7 мм, 8 мм, 8 мм. В случае разведений супернатанта энтомопатогена, были получены зоны подавления со следующими значениями диаметров: при разведении 1:1 – 6...7 мм, 1:5 – 5...6 мм, 1:10 – 4...5 мм, при разведениях 1:50 и 1:100 – 0 мм (подавление отсутствует). После нагревания до 80°C в течение 15 мин и последующего высева на газон фитопатогена, наблюдалось подавление роста с зоной лизиса диаметрами: 11 мм и 12 мм (культура); 7 мм и 8 мм (супернатант). После 96 ч хранения подвергшихся нагреванию культуральной жидкости и супернатанта энтомопатогена при 0...4°C антибактериальный токсин подавлял рост фитопатогена, формируя зоны: 9 мм и 10 мм (в случае культуры); 5 мм и 6 мм (в случае супернатанта). Таким образом, активность антибактериального токсина энтомопатогена *BL 200-4* сохраняется при действии указанных температур как в случае культуры, так и в случае бесклеточного экстракта.

Заключение. В результате скрининга были отобраны три наиболее активных штамма *BL 200-4*, *561-1*, *199-3* с широким спектром действия. На минимальной среде Эшби способны расти как фитопатогены, так и энтомопатогены и регистрируется подавление *BL 200-4* на *P. carotovorum* 8690. При нагревании до 80°C и последующем хранении нагретой культуры и супернатанта энтомопатоген сохраняет антибактериальную активность, формируя стерильные пятна как на полноценной, так и в минимальной среде Эшби.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prospects of endophytic fungal entomopathogens as *biocontrol and plant growth promoting agents*: An insight on how artificial inoculation methods affect endophytic colonization of host plants /**B.S. Bamisile, Ch.K. Dash, K.S. Akutse, R. Keppanan, et al** // Microbiol Res. – 2018. – 217. – P. 4-50.
2. Pest control: microbiological potential of Armenia /**E.G. Afrikian, M.H. Kinosyan, A.K. Okasov, N.L. Ghazanchyan, et al** // Annals of Agrarian Science. – 2014. – Vol. 2(3). – P. 27-34.

3. **Зубашева М.В.** Характеристика штаммов *Brevibacillus laterosporus* и продуцируемых ими биоактивных соединений: Автореф. дис.... канд. наук. – 2012. – P. 2-15.
4. Microbe observation and cultivation array (MOCA) for cultivating and analyzing environmental microbiota /**W. Gao, D. Navaroli, J. Naimark, et al**// Microbiome. – 2013. – P.1-4.
5. Tartaric Acid Synthetic Derivatives for Multi-Drug Resistant Phytopathogen *Pseudomonas* and *Xanthomonas* Combating /**B.G. Babayan, A.R. Mikaelyan, M.A. Melkumyan, et al** //Sci & Tech. Publish. – 2020. – Vol. 4(5). – P. 285-290.
6. **Jiménez D.J., Montaña J.S., Martínez M.M.** Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils // Braz J Microbiol. – 2011. – Vol. 42(3). – P. 846–858.
7. **Afrikyan E.G.** Entomopathogenic properties of bacteria and their practical significance // Fed Proc Transl Suppl. – 1965. – Vol. 24. – P. 259-265.

**Մ.Ա. ՄԵԼՔՈՒՄՅԱՆ, Բ.Գ. ԲԱԲԱՅԱՆ, Մ.Ա. ԿԻՆՈՍՅԱՆ,
Ն.Ա. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ**

**ԷՆՏՈՄՈՊԱԹՈԳԵՆ ՄԱՆՐԷՆԵՐՈՎ ՖԻՏՈՊԱԹՈԳԵՆ
ՄԻԿՐՈՐԳԱՆԻԶՄՆԵՐԻ ԱՃԻ ՃՆՇՄԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆ**

Ֆիտոպաթոգեն միկրոօրգանիզմները, ֆիտոֆագերը և միջատները վնաս են հասցնում գյուղատնտեսական մշակաբույսերին: *Bacillus* էնտոմոպաթոգենների սպորագոյացման ընթացքում հակաբակտերիալ և կենսասպան տոքսիններ առաջացնելու ունակությունն օգտագործվում է էկոլոգիապես անվտանգ բիոպեստիցիդների ստացման համար: Ուսումնասիրվել է *B. laterosporus*-ի տարբեր շտամների ազդեցությունը ֆիտոպաթոգենների վրա:

Առանցքային բառեր. ֆիտոպաթոգեններ, էնտոմոպաթոգեններ, *Pseudomonas syringae*, *Brevibacillus laterosporus*, *Pectobacterium carotovorum*, *Rhodococcus fascians*, *Xanthomonas vesicatoria*, բիոպեստիցիդներ:

**M.A. MELKUMYAN, B.G. BABAYAN, M.A. KINOSYAN,
N.A. HOVHANNISYAN**

**STUDYING THE IMPACT OF BREVI-BACHILLUS LATEROSPORUS ON
PHYTOPATHOGENES**

Phytopathogenic microbes, phytophagous and insects are harmful for agricultural crops. *Bacillus* entomopathogens's ability to form during the sporulation crystal-like antibacterial and biocide toxins, is used for ecologically safe biopesticides production. [1-3]. The effect of *B. laterosporus* various strains on phytopathogens is studied.

Keywords: phytopathogens, entomopathogens, *Pseudomonas syringae*, *Brevibacillus laterosporus*, *Pectobacterium carotovorum*, *Rhodococcus fascians*, *Xanthomonas vesicatoria*, biopesticides.