

ИЗУЧЕНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАЦИЛЛ ПО ОТНОШЕНИЮ К ПЛЕСЕНЯМ, ПОРАЖАЮЩИМ СЕМЕНА ПРИ ХРАНЕНИИ

Малкова Ангелина Владимировна, м.н.с., аспирант, ИЦ «Промбиотех», ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», E-mail: gelishka96@mail.ru

Дудник Дина Евгеньевна, лаборант-исследователь, ИЦ «Промбиотех», ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», E-mail: dudnik-dina@mail.ru

Каргашилова Екатерина Николаевна, лаборант-исследователь, магистрант, ИЦ «Промбиотех», ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», E-mail: katty22brn@gmail.com

Ирkitова Алена Николаевна, к.б.н., доцент кафедры экологии, биохимии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», E-mail: elen171987@mail.ru

Аннотация: В статье представлены результаты лабораторных исследований по изучению антагонистической активности природных штаммов бактерий рода *Bacillus* по отношению к плесеням хранения родов *Penicillium* и *Aspergillus*.

Ключевые слова: антагонистическая активность, *Bacillus*, плесени хранения, *Penicillium*, *Aspergillus*, семена.

Введение. Поверхность зерен сельскохозяйственных культур обсеменена различными микроорганизмами, в том числе плесневыми грибами. Среди микроскопических грибов выделяют полевые плесени (роды *Alternaria*, *Fusarium* и др.) и плесени хранения (роды *Penicillium*, *Aspergillus* и др.). После сбора урожая естественная микрофлора семян постепенно замещается грибами хранения – особенно, в условиях повышенной влажности. Это приводит не только к появлению затхлого запаха, но и к снижению всхожести зерна, а также накоплению токсинов, опасных для человека и животных [1, с. 38–43].

Отечественные исследователи помимо вышеперечисленного установили, что усвояемость аминокислот из пораженной микроскопическими грибами пшеницы снижается. Ухудшается состояние слизистой оболочки кишечника, образуются узелки на легких, изменяется состав крови и наблюдается дефицит Т- и В-лимфоцитов у свиней [2, 109–114]. Поэтому поиск средств для борьбы с распространением грибной микрофлоры хранения является актуальным. Ученые из Узбекистана доказали фунгицидную активность пропионовой кислоты по

отношению к плесеням хранения при обработке семян пшеницы [3, с. 21–22]. Но это лишь одно из соединений, которые обладают антигрибковой активностью. Использование полезных микроорганизмов, синтезирующих широкий пул антифунгальных метаболитов, может оказаться еще более эффективным. К микроорганизмам – антагонистам плесеней относятся бактерии рода *Bacillus*, которые безопасны для людей и животных [4, с. 52–53].

Цель. Изучить антагонистическую активность природных штаммов бацилл по отношению к плесеням хранения семян.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования выступали природные штаммы бацилл из коллекции микроорганизмов ИЦ «Промбиотех». Всего было изучено 9 штаммов: *B. pumilus* 4, *B. pumilus* 5, *B. pumilus* 6, *B. pumilus* 7, *B. licheniformis* 8, *B. licheniformis* 9, *B. licheniformis* 10, *B. toyonensis* 15 и *B. pumilus* 16. Тест-культурами выступали штаммы плесневых грибов р. *Penicillium* и р. *Aspergillus*, выделенные из семян рапса.

Антагонизм микроорганизмов проверяли методом агаровых блоков в 3-х кратной повторности [5, с. 42]. Блоки, диаметр которых составлял 7 мм, были вырезаны стерильным сверлом с культуры плесеней, а бациллы были засеяны в опытные чашки поверхностным газоном. Посев микроорганизмов–антагонистов осуществляли в один день. Для культивирования использовали питательную среду УЕР (г/л): пептон – 10, дрожжевой экстракт – 10, NaCl – 5, глюкоза – 20, агар – 15. Эксперимент проводили в течение 2-х недель, температура инкубирования – 25 °С.

Результаты и их обсуждение. Согласно полученным результатам, все исследуемые штаммы бацилл подавляют рост плесеней хранения, не позволяя их мицелию распространиться по всему диаметра чашки. Культуры пенициллиума и аспергилла в контрольных образцах в течение 2-х недель достигают диаметра 77,50±1,38 см и 76,60±2,70 см соответственно. В опытных пробах грибы не занимают и половины от этого объема. А бациллы образуют газон на почти всю чашку за 24 ч культивирования даже не при оптимальной для них температуре.

Таблица 1. Результаты изучения антагонистической активности бацилл по отношению к штамму р. *Penicillium*

Штаммы	Диаметр зоны, занимаемой пенициллиумом (M±m, мм), по суткам эксперимента				
	1	3	7	10	14
<i>B. pumilus</i> 4	14,83±1,33	14,67±1,37	12,33±1,21	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. pumilus</i> 7	12,83±1,17	8,87±1,86	8,83±2,23	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. pumilus</i> 16	12,33±1,03	10,50±0,55	10,00±2,28	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. toyonensis</i> 15	9,50±1,52	7,00±0,00	9,33±0,52	9,33±0,52	9,33±0,52
<i>B. licheniformis</i> 8	12,50±1,22	10,83±0,75	11,33±0,52	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. licheniformis</i> 9	8,33±2,07	7,00±0,00	11,17±1,94	11,67±1,75	11,67±1,75
<i>B. licheniformis</i> 10	23,00±1,79	14,83±3,19	18,67±1,97	21,33±1,75	23,83±1,94

Как видно из таблицы 1, через 24 часа культивирования штамм р. *Penicillium* выделил в среду антибиотические соединения, о чем свидетельствует диаметр зоны отсутствия роста штаммов *Bacillus spp.* более 7 мм (диаметр первоначального блока с плесенью). Однако уже на 3 день эксперимента бациллы начинают распространяться в направлении блоков с плесенью. Возможно, это связано с синтезом ферментов, инактивирующих антибиотики пенициллинового ряда.

Штаммы *B. pumilus* 5 и *B. pumilus* 6 сразу проявили устойчивость к антибактериальным метаболитам *Penicillium sp.*, о чем свидетельствовало отсутствие зоны угнетения роста с первых суток эксперимента. К 10-му дню опыта штаммы *B. pumilus* 4, 7 и 16, а также *B. licheniformis* 8 распространились на всю чашку. Несмотря на то, что к 3-м суткам эксперимента штаммы *B. toyonensis* 15, *B. licheniformis* 9 и 10 смогли прорасти в зонах с диффундированными антибиотиками пенициллиума, на 7 день опыта было зафиксировано, что он начал распространяться поверх газонов этих бацилл. Также цвет мицелия *Penicillium sp.* в присутствии бактерий р. *Bacillus* изменяется с зеленовато-желто-белого на серо-черный. Кроме того, плесневый грибок перестает выделять в среду пигмент, окрашивающий агар в желтый цвет (рисунок 1). Это может быть обусловлено антагонистическим действием бацилл.

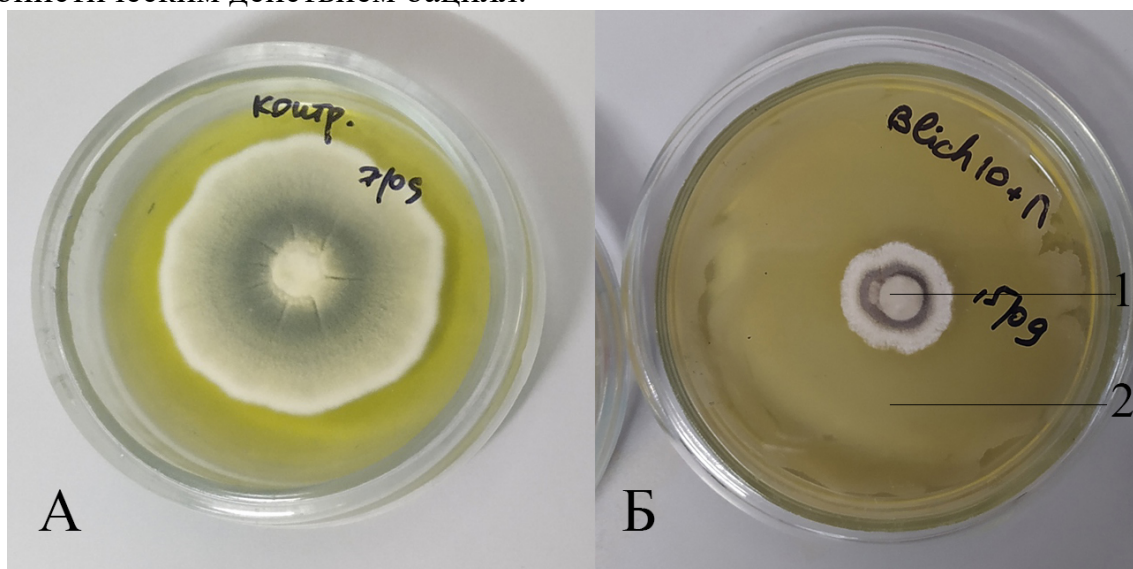


Рисунок 1. Сравнение роста *Penicillium sp.* в опыте и контроле на 10 суток эксперимента. А – контрольная чашка, Б – опытная чашка:

1 – блок пенициллиума, 2 – газон бацилл

При изучении антагонизма бацилл к аспергиллу результаты получились несколько другими. В таблице 2 представлены сведения об антифунгальной активности природных штаммов р. *Bacillus* против штамма *Aspergillus sp.*

На 1-е сутки эксперимента небольшие зоны угнетения роста бацилл отмечались даже в чашках со штаммами *B. pumilus* 5 и 6, которые были устойчивы к антибиотикам пенициллиума. Это свидетельствует о том, что аспергилл

синтезирует антибактериальные соединения, которые быстрее диффундируют в агар или просто более эффективны по отношению к данным бациллам. Однако через неделю опыта 7 из 9 штаммов р. *Bacillus* полностью распространились в областях отсутствия газона вокруг блока плесени. Поэтому в целом бациллы сильнее и быстрее подавляют *Aspergillus sp.*

Таблица 2. Результаты изучения антагонистической активности бацилл по отношению к штамму р. *Aspergillus*

Штаммы	Диаметр зоны, занимаемой аспергиллом (M±m, мм), по суткам эксперимента				
	1	3	7	10	14
<i>B. pumilus</i> 4	8,83±2,64	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. pumilus</i> 5	8,17±1,33	7,67±0,82	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. pumilus</i> 6	7,50±1,22	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. pumilus</i> 7	9,17±1,47	7,83±0,75	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. pumilus</i> 16	8,67±1,97	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. toyonensis</i> 15	8,33±1,51	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. licheniformis</i> 8	8,83±1,17	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. licheniformis</i> 9	9,17±1,94	8,33±1,21	16,83±1,47	18,00±0,82	18,25±1,71
<i>B. licheniformis</i> 10	29,33±1,03	28,67±1,21	34,67±1,21	35,00±0,89	35,17±1,47

Как и в случае со штаммом *Penicillium sp.*, присутствие бацилл сказывается на интенсивности окраски мицелия аспергилла. В контроле грибница насыщенного красно-коричневого цвета, а в опыте – бледно-розовая.

Наиболее слабым антагонизмом к *Aspergillus sp.*, также как и к пенициллиуму, обладают штаммы *B. licheniformis* 9 и 10 (рисунок 2).

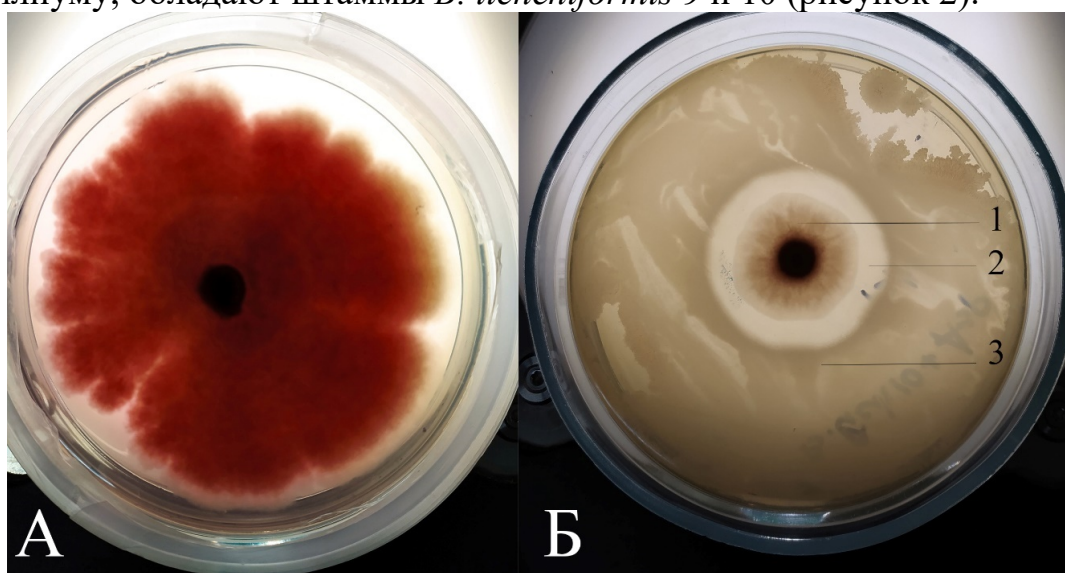


Рисунок 2. Сравнение роста *Aspergillus sp.* в опыте и контроле на 14 сутки эксперимента. А – контрольная чашка, Б – опытная чашка: 1 – аспергилл, 2 – зона подавления роста, 3 – газон бацилл

Но даже они угнетают рост плесневого гриба, не позволяя ему распространяться по периметру чашки Петри со скоростью, как в контроле.

Заключение. Шесть из девяти изученных штаммов бактерий р. *Bacillus* проявили сильный антагонизм к *Penicillium sp.*, и 7 – к *Aspergillus sp.* С пенициллиумом максимальный эффект достигается на 10 сутки эксперимента, а с аспергиллом – через неделю. Слабым антифунгальным действием по отношению к изученным микроскопическим грибам обладают штаммы *B. licheniformis* 9 и 10. Однако их присутствие в среде вызывает изменение интенсивности окраски мицелия штаммов р. *Penicillium* и р. *Aspergillus* по сравнению с контролем. Самым сильным антагонистом по отношению к плесеням хранения является штамм *B. pumilus* 6. Поэтому он рекомендован для включения в состав биопрепарата, предотвращающего плесневение семян.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках реализации Программы поддержки научно-педагогических работников ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», проект «Оценка эффективности микробного биопрепарата в борьбе с фитопатогенами сельскохозяйственных культур».

Библиографический список

1. Дроздова, Е.А., Алешина, Е.С., Романенко, Н.А. Микрофлора продовольственного сырья и продуктов его переработки. – Оренбург: Оренбургский гос. ун-т., 2017. – 338 с.
2. Забашта, Н.Н., Полежаева, О.А., Головкин, Е.Н. Влияние плесеней хранения пшеницы на переваримость белка и здоровье свиней // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2012. – N 1. – С. 109-114.
3. Раджабова, В.Э., Бозорова, Ф.А. Обработка зерна пропионовой кислотой // Наука и образование сегодня. – 2019. – N 5(40). – С. 21-22.
4. Manna, M., Kim, K.D. Biocontrol Activity of VolatileProducing *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas protegens* Against *Aspergillus* and *Penicillium spp.* Predominant in Stored Rice Grains: Study II // Mycobiology. – 2018. – N 46. – P. 52-63.
5. Иркитова, А.Н., Каган, Я.Р. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий // Известия Алтайского государственного университета. – 2012. – N 3. – С. 41-44.

Study of the bacilli antagonistic activity against storage molds of seed

Malkova A. V., junior researcher, graduate student

Engineering Center "Prombiotech", Altai State University

Dudnik D. E., laboratory assistant researcher

Engineering Center "Prombiotech", Altai State University

Kargashilova E. N., laboratory assistant researcher, undergraduate

Engineering Center "Prombiotech", Altai State University
Irkitova A. N., Ph.D. in Biology
Altai State University

Abstract: *The article presents the results of laboratory research on study the antagonistic activity of genus Bacillus bacteria natural strains in relation to storage molds of the genera Penicillium and Aspergillus.*

Key words: *antagonistic activity, Bacillus, storage molds, Penicillium, Aspergillus.*