

ПОИСК АНТАГОНИСТОВ МИКРОМИЦЕТА *FUSARIUM SPOROTRICHIOIDES*

И. И. ИДИЯТОВ, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
Л. Р. ВАЛИУЛЛИН, кандидат биологических наук, заведующий сектором,
С. Р. ГАЛЛЯМОВА, младший научный сотрудник,
В. В. БИРЮЛЯ, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
А. И. НИКИТИН, кандидат ветеринарных наук, директор,
Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности
(420075, г. Казань, ул. Научный городок, д. 2; e-mail: vnivi@mail.ru)

Ключевые слова: *Fusarium sporotrichioides*, природные биотопы, изоляты, антагонизм.

Растительное сырье подвергается поражению различными микромицетами, среди которых велика доля грибов рода фузариум. В борьбе с грибковыми поражениями широкое распространение получили биологические методы защиты, наиболее перспективным в этом направлении является применение природных антагонистов. В рамках данной работы осуществили выделение микромицета *Fusarium sporotrichioides* из кормового сырья и чистых культур микроорганизмов из природных биотопов, исследовали противогрибковую активность выделенных микробов методами встречных культур, агаровых блоков, модифицированного штриха и отсроченного антагонизма. Методом встречных культур установили наличие фунгистатического алиментарного антагонизма во взаимоотношениях изолятов, условно обозначенных как СБ16, СБ17, СБ20 и СБ23, с микромицетом *Fusarium sporotrichioides*. Фунгистатическим антибиотическим антагонизмом обладали изоляты СБ10 и СБ15. Метод агаровых блоков показал наибольшую активность изолятов СБ1, СБ10, СБ15, СБ16 и СБ20. Наибольшую зону задержки роста патогена при постановке опыта по методу модифицированного штриха имели изоляты СБ16 и СБ17. Наибольшую фунгистатическую активность, выявленную по методу отсроченного антагонизма, проявили изоляты СБ1, СБ10, СБ12, СБ15, СБ16 и СБ20. Таким образом отобранные изоляты в перспективе могут служить основой для получения биофунгицидов, наиболее перспективными, проявившими антагонистический эффект в отношении микромицета *Fusarium sporotrichioides*, для использования в качестве живых культур оказались условно обозначенные изоляты СБ17 и СБ23, противогрибковые вещества выделял СБ12, высокое противогрибковое действие в процессе роста и активность метаболитов показали изоляты СБ1, СБ10, СБ15, СБ16 и СБ20.

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *FUSARIUM SPOROTRICHIOIDES* ANTAGONISTS

I. I. IDIYATOV, candidate of biological sciences, senior researcher,
L. R. VALIULLIN, candidate of biological sciences, head of sector,
S. R. GALLYAMOVA, junior researcher,
V. V. BIRYULYA, candidate of biological sciences, leading researcher,
A. I. NIKITIN, candidate of veterinary sciences, director,
Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety
(2 Nauchniy Gorodok, 420075, Kazan; e-mail: vnivi@mail.ru)

Keywords: *Fusarium sporotrichioides*, natural biotopes, isolates, antagonism.

Vegetable raw material is exposed to various micromycete, among which a large proportion of *Fusarium* fungi. In the fight against fungal lesions, biological protection methods have been widely used, the most promising in this direction is the use of natural antagonists. Within the framework of this work, the micromycete *Fusarium sporotrichioides* was isolated from fodder raw materials and pure cultures of microorganisms from natural biotopes, the antifungal activity of the isolated microbes was determined by the methods of counter cultures, agar blocks, modified strokes and delayed antagonism. The presence of fungistatic alimentary antagonism in the relationships of isolates conventionally designated as SB16, SB17, SB20 and SB23 with the micromycete *Fusarium sporotrichioides* was determined by the method of counter cultures. Fungistatic antibiotic antagonism possessed isolates SB10 and SB15. The method of agar blocks showed the greatest activity of isolates SB1, SB10, SB15, SB16 and SB20. The largest zone of growth retardation of the pathogen in the formulation of the experiment using the modified stroke method was the isolates SB16 and SB17. The greatest fungistatic activity revealed by the method of delayed antagonism was shown by isolates SB1, SB10, SB12, SB15, SB16 and SB20. Thus, the selected isolates in the future can serve as a basis for obtaining bio fungicides, the most promising ones showing an antagonistic effect against micromycete *Fusarium sporotrichioides* for use as living cultures were conditionally designated isolates SB17 and SB23, antifungal substances isolated SB12, a high antifungal effect during growth and the activity of metabolites showed isolates SB1, SB10, SB15, SB16 and SB20.

Положительная рецензия представлена М. Н. Мукминовым,
доктором биологических наук Казанского (Приволжского) федерального университета.

Широкая повсеместная распространенность грибов *Fusarium sporotrichioides* и способность к продуцированию значительных количеств токсинов ставят их в ранг наиболее опасных фитопатогенов. Для этих микромицетов характерна высокая гетерогенность признаков, способность образовывать хламидоспоры, что позволяет существовать в различных условиях, на широком круге растений-хозяев. Фузариоз зерна ухудшает посевные качества семян, угнетает развитие корневой системы и стебля растений, снижает пищевые достоинства зерна и продуктов его переработки и поэтому во всем мире рассматривается как одно из наиболее вредоносных заболеваний сельскохозяйственных культур [1].

Бактерии-антагонисты в качестве агентов биологической защиты растений являются перспективной и безопасной альтернативой химическим средствам борьбы с фитопатогенными грибами, поскольку эффективно сдерживают их развитие и распространение, стимулируют рост растений, благотворно влияют на микробиологическое сообщество в почве.

Цель и методика исследований

В связи с изложенным целью работы явилось исследование антагонистической активности изолятов микроорганизмов, выделенных из природных биотопов к грибам рода *Fusarium sporotrichioides*.

Исследование проводили на полевом штамме микромицета *Fusarium sporotrichioides*, выделенном с поверхности семян зерновых культур согласно методическим указаниям и ГОСТ [2, 3, 4]. Для отбора бактериальных штаммов взвесь из проб высевали на мясопептонный агар (МПА), культивировали при 37 °С до образования колоний, затем делали с них пересевы и выделяли чистые культуры. Антагонистическую активность изолятов определяли методами встречных культур, агаровых блоков, модифицированного штриха и отсроченного антагонизма.

Метод двойных (встречных) культур [5]. Культуру гриба и антагониста выращивали отдельно на агаризованной среде, затем простерилизованным сверлом вырезали блок с мицелием гриба и помещали в чашку Петри, на расстоянии 6 см от него штрихом наносили культуру антагониста. Контролем служил посев гриба без изолята. Чашки инкубировали в термостате при 26 °С, учет проводили на 5-е, 10-е, 15-е и 30-е сутки культивирования. Отмечали рост тест-гриба и антагониста, характер их взаимодействия [6], зону ингибирования роста мицелия [7].

Метод агаровых блоков [8]. Выделенную микробную культуру засеяли на поверхность мясопептонного агара в чашке Петри и термостатировали при 37 °С до образования «сплошного газона». Затем стерильным пробочным сверлом вырезали из него блоки, которые переносили на предварительно засеянную тест-культурой гриба поверхность сусло-агара в дру-

гой чашке Петри. Тест-культуру засеяли шпателем, агаровые блоки накладывали ростом вверх на равном расстоянии один от другого и от краев чашки, плотно прижимая к поверхности среды. Контролем служило культивирование гриба без микроба. Чашки инкубировали в термостате при температуре 26 °С. Учет опыта вели на 2-е, 4-е и 7-е сутки. По прошествии 7 суток культивирования измеряли диаметр зоны подавления роста мицелия в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Активность изолятов рассчитывали по формуле:

$$A=D/d,$$

где D – диаметр зоны задержки роста мицелия гриба, мм;

d – диаметр места нанесения культуры, 13,5 мм.

Метод модифицированного штриха. Тест-культуру гриба выращивали в картофельном бульоне при 26 °С, постоянном перемешивании при 90 об./мин в течение 7 суток. В стерильные чашки Петри наливали расплавленный МПА, после его застывания стерильным скальпелем по диаметру чашки вырезали полоску шириной 1 см, в образовавшийся желобок заливали расплавленный и остуженный до 45 °С сусло-агар с фильтратом тест-гриба. После застывания среды штрихами через всю площадь чашки, пересекая в перпендикулярном направлении желобок, наносили исследуемые изоляты. Контролем служили чашки с тест-культурой без изолятов. Чашки инкубировали в термостате при 26 °С в течение 7 суток. Результат учитывали по развитию тест-гриба.

Метод отсроченного антагонизма [8]. На сусло-агар бактериологической петлей наносили суточную культуру изолята и с целью накопления в среде продуцируемых метаболитов инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 °С. Выросшие колонии стерилизовали парами хлороформа в течение 30 мин, чашки подсушивали (для удаления остатков хлороформа), на поверхность среды заливали 6 мл расплавленной и остуженной до 45 °С среды с 10 % суспензии тест-культуры гриба. Контролем служили чашки с тест-грибами без изолятов. После инкубации в термостате при температуре 26 °С в течение 7 суток оценивали антагонистическую активность по наличию или отсутствию роста тестируемых культур.

Фунгистатическую активность изолятов оценивали по степени ингибирования роста мицелия гриба и высчитывали по формуле [7, 9]:

$$I = (1 - A/B) \times 100, \%$$

где I – процент ингибирования;

A – количество колоний в опыте;

B – количество колоний в контроле.

Статистическую обработку полученного цифрового материала осуществляли методом вариационной статистики с применением программы «Microsoft Excel» и критерия достоверности Стьюдента. Разни-

ца между сравниваемыми величинами считалась достоверной при $p \leq 0,05$.

Результаты исследований

После отбора проб кормов и проведения проб подготовки образцы разложили в чашки Петри на сусло-агар и поместили в термостат при 26 °С, через 5 суток отмечали формирование колоний грибов. Интересующие колонии пересеяли в новые чашки для получения чистых культур (рис. 1).

Видовую идентификацию грибов провели по оценке совокупности культуральных и микроморфологических признаков. Строение микроструктур оценивали методом «блока» для просмотра морфологических структур в исходном, неразрушенном состоянии. Из культуры гриба стерильным скальпелем вырезали участок блока и поместили на предметное стекло, затем добавили каплю жидкости и накрыли покровным стеклом, препараты рассматривали при малом и большом увеличении светового микроскопа с целью просмотра макроконидий, установления типа конидиеносцев, способа образования конидий и хламидоспор.

Изоляты сапрофитных бактериальных штаммов выделили из проб почвы, ризосферы, вегетативных органов и семян зерновых культур (пшеницы, кукурузы), с последующей гомогенизацией проб в стерильном физиологическом растворе и культивированием при 37 °С на мясопептонном агаре (МПА). С отдельных выросших колоний провели пересев в новые чашки Петри до выделения чистой культуры. В результате выделили 25 изолятов, которые условно обозначили как СБ1–СБ25 (табл. 1).

Методом встречных культур установили, что по механизму противогрибкового действия изоляты бактерий поделились на обладающие высоким показателем подвижности и образующие стерильную зону антагонистического действия (рис. 2).

Из изолятов, обладающих подвижностью (табл. 2), высокая ингибирующая активность в отношении микромицета *Fusarium sporotrichioides* проявилась у СБ16, СБ17, СБ20 и СБ23, на 10-е сутки совмест-



Рис. 1. Культура микромицета *Fusarium sporotrichioides*
Fig. 1. Culture of micromycete *Fusarium sporotrichioides*

Таблица 1
Изоляты сапрофитных бактерий, выделенные из проб

Table 1

Isolates of saprophytic bacteria isolated from samples

Изолят <i>Isolate</i>	Источник <i>Source</i>
СБ1 <i>SB1</i>	Ризосфера кукурузы <i>Rhizosphere of corn</i>
СБ2 <i>SB2</i>	Почва <i>Soil</i>
СБ3 <i>SB3</i>	Ризосфера пшеницы <i>Rhizosphere of wheat</i>
СБ4 <i>SB4</i>	Почва <i>Soil</i>
СБ5 <i>SB5</i>	Почва <i>Soil</i>
СБ6 <i>SB6</i>	Ризосфера пшеницы <i>Rhizosphere of wheat</i>
СБ7 <i>SB7</i>	Почва <i>Soil</i>
СБ8 <i>SB8</i>	Почва <i>Soil</i>
СБ9 <i>SB9</i>	Почва <i>Soil</i>
СБ10 <i>SB10</i>	Вегетативные органы пшеницы <i>Vegetative organs of wheat</i>
СБ11 <i>SB11</i>	Почва <i>Soil</i>
СБ12 <i>SB12</i>	Почва <i>Soil</i>
СБ13 <i>SB13</i>	Ризосфера кукурузы <i>Rhizosphere of corn</i>
СБ14 <i>SB14</i>	Ризосфера кукурузы <i>Rhizosphere of corn</i>
СБ15 <i>SB15</i>	Ризосфера кукурузы <i>Rhizosphere of corn</i>
СБ16 <i>SB16</i>	Ризосфера кукурузы <i>Rhizosphere of corn</i>
СБ17 <i>SB17</i>	Ризосфера кукурузы <i>Rhizosphere of corn</i>
СБ18 <i>SB18</i>	Ризосфера кукурузы <i>Rhizosphere of corn</i>
СБ19 <i>SB19</i>	Ризосфера кукурузы <i>Rhizosphere of corn</i>
СБ20 <i>SB20</i>	Вегетативные органы кукурузы <i>Vegetative organs of corn</i>
СБ21 <i>SB21</i>	Вегетативные органы кукурузы <i>Vegetative organs of corn</i>
СБ22 <i>SB22</i>	Вегетативные органы кукурузы <i>Vegetative organs of corn</i>
СБ23 <i>SB23</i>	Вегетативные органы кукурузы <i>Vegetative organs of corn</i>
СБ24 <i>SB24</i>	Почва <i>Soil</i>
СБ25 <i>SB25</i>	Почва <i>Soil</i>

ного культивирования они занимали наибольшую площадь питательного субстрата чашки Петри, блокируя дальнейшее разрастание тест-культуры гриба, вблизи зоны нарастания мицелий патогена частично лизировался. Изоляты СБ1, СБ3, СБ11, СБ13 и СБ22 к 30-м суткам инкубации занимали половину площади чашки. Развитие изолятов СБ2, СБ6, СБ12, СБ24

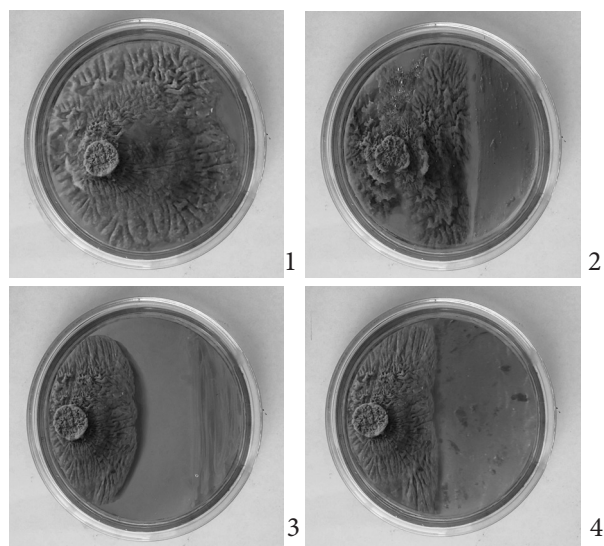


Рис. 2. Антагонистическая активность изолятов в отношении микромицета *Fusarium sporotrichioides*, установленная методом встречных культур (1 – контроль, 2 – СБ2, 3 – СБ15, 4 – СБ17)

Fig. 2. Antagonistic activity of isolates against micromycete *Fusarium sporotrichioides*, established by the method of counter cultures (1 – control, 2 – SB2, 3 – SB15, 4 – SB17)

и СБ25 тестовый микромицет ингибировал, разрастаясь на занимаемой ими площади.

На 10-е сутки совместного культивирования изоляты образовывали стерильную зону шириной от 18,7 до 26,2 мм, однако на 15-е сутки стерильной зоны между патогеном и изолятами СБ4, СБ9, СБ14, СБ18, СБ19 и СБ21 отмечено не было, зона ингибирования мицелия оставшихся изолятов составила 7,5–24 мм. К 30-м суткам стерильную зону удержали лишь изоляты СБ10 и СБ15 (табл. 3).

Методом агаровых блоков установили зону задержки роста микромицета и определили активность изолятов (рис. 3).

Зона задержки роста микромицета *Fusarium sporotrichioides* отмечалась при совместном культивировании с 19 изолятами из 25 отобранных (табл. 4). При этом наибольшую зону образовывала культура СБ15 – $29,83 \pm 0,78$ мм, антагонистическая активность изолята была наибольшей в сравнении с остальными – 2,21. При инкубировании патогена с СБ1 зона задержки мицелия гриба составила

Таблица 2

Антагонистическая активность изолятов, обладающих высоким показателем подвижности, в отношении микромицета *Fusarium sporotrichioides*

Table 2

The antagonistic activity of isolates having a high mobility index against the micromycete *Fusarium sporotrichioides*

Изолят Isolate	Рост мицелия патогена от посевного блока, мм Growth of mycelium of pathogen from seeding block, mm			
	Срок культивирования, сутки Term of cultivation, days			
	5	10	15	30
Контроль Control	$32,41 \pm 0,59$	$40,17 \pm 0,63$	$48,81 \pm 0,62$	$70,00 \pm 0,00$
СБ1 SB1	$28,17 \pm 0,43$	$29,33 \pm 0,67$	$30,35 \pm 0,65$	$31,00 \pm 0,35$
СБ2 SB2	$30,88 \pm 0,51$	$32,21 \pm 0,49$	$35,33 \pm 0,47$	$40,50 \pm 0,65$
СБ3 SB3	$29,00 \pm 0,35$	$32,33 \pm 0,67$	$34,17 \pm 0,63$	$36,20 \pm 0,45$
СБ6 SB6	$27,50 \pm 0,50$	$33,47 \pm 0,53$	$41,90 \pm 0,45$	$51,33 \pm 0,67$
СБ11 SB11	$26,17 \pm 0,43$	$28,33 \pm 0,47$	$27,87 \pm 0,43$	$35,43 \pm 0,37$
СБ12 SB12	$29,67 \pm 0,53$	$35,71 \pm 0,49$	$38,17 \pm 0,43$	$39,33 \pm 0,47$
СБ13 SB13	$25,33 \pm 0,47$	$27,17 \pm 0,43$	$29,00 \pm 0,50$	$30,41 \pm 0,49$
СБ16 SB16	$22,90 \pm 0,65$	$25,61 \pm 0,59$	$25,33 \pm 0,47$	$25,67 \pm 0,43$
СБ17 SB17	$21,00 \pm 0,50$	$22,60 \pm 0,35$	$23,17 \pm 0,43$	$24,00 \pm 0,65$
СБ20 SB20	$19,17 \pm 0,50$	$21,43 \pm 0,47$	$22,67 \pm 0,43$	$25,89 \pm 0,51$
СБ22 SB22	$23,41 \pm 0,49$	$26,90 \pm 0,65$	$29,17 \pm 0,43$	$30,00 \pm 0,35$
СБ23 SB23	$16,71 \pm 0,49$	$19,00 \pm 0,50$	$20,97 \pm 0,63$	$21,81 \pm 0,54$
СБ24 SB24	$30,67 \pm 0,43$	$35,33 \pm 0,67$	$39,00 \pm 0,35$	$44,93 \pm 0,57$
СБ25 SB25	$31,17 \pm 0,43$	$35,87 \pm 0,51$	$37,17 \pm 0,43$	$40,61 \pm 0,49$

Таблица 3
Антагонистическая активность бактериальных изолятов, образующих стерильную зону в отношении микромицета *Fusarium sporotrichioides*

Table 3

Antagonistic activity of bacterial isolates forming a sterile zone against micromycete *Fusarium sporotrichioides*

Изолят <i>Isolate</i>	Ширина зоны ингибирования, мм <i>Width of inhibition zone, mm</i>		
	Срок культивирования, сутки <i>Term of cultivation, days</i>		
	10	15	30
СБ4 <i>SB4</i>	24,00 ± 0,65	–	–
СБ5 <i>SB5</i>	25,17 ± 0,63	7,98 ± 0,22	–
СБ7 <i>SB7</i>	24,83 ± 0,57	8,33 ± 0,47	–
СБ8 <i>SB8</i>	23,17 ± 0,43	9,60 ± 0,50	–
СБ9 <i>SB9</i>	24,00 ± 0,35	–	–
СБ10 <i>SB10</i>	20,61 ± 0,49	23,37 ± 0,43	24,75 ± 0,45
СБ14 <i>SB14</i>	25,71 ± 0,49	–	–
СБ15 <i>SB15</i>	23,33 ± 0,47	23,67 ± 0,23	25,00 ± 0,35
СБ18 <i>SB18</i>	19,00 ± 0,35	–	–
СБ19 <i>SB19</i>	21,37 ± 0,43	–	–
СБ21 <i>SB21</i>	22,50 ± 0,35	–	–

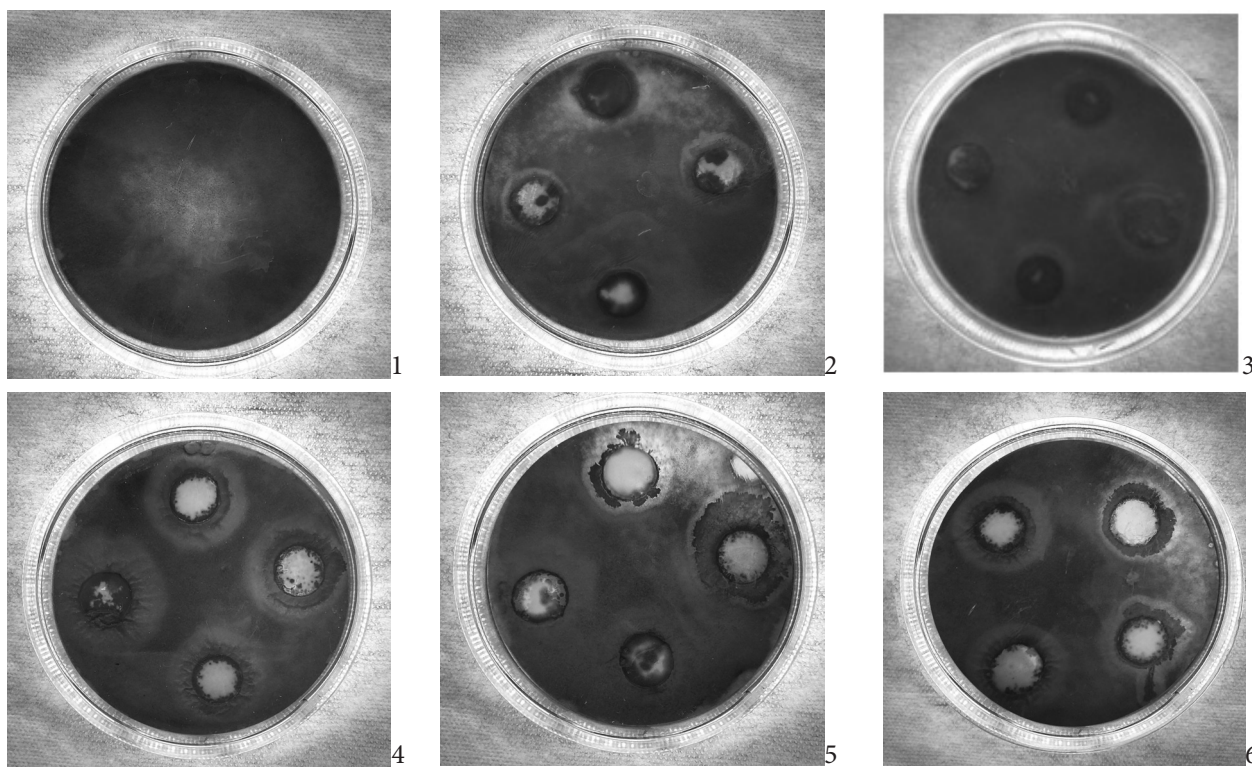


Рис. 3. Результаты исследования антагонистической активности изолятов к микромицету *Fusarium sporotrichioides* методом агаровых блоков:

1 – контроль, 2 – СБ1, 3 – СБ10, 4 – СБ15, 5 – СБ16, 6 – СБ20
Fig. 3. Results of the study of the antagonistic activity of isolates against the micromycete *Fusarium sporotrichioides* by the agar block method:
1 – control, 2 – SB1, 3 – SB10, 4 – SB15, 5 – SB16, 6 – SB20

Таблица 4
Противогрибковое действие изолятов в отношении микромицета *Fusarium sporotrichioides*,
выявленное методом агаровых блоков

Table 4
Antifungal action of isolates against micromycete *Fusarium sporotrichioides*,
revealed by the method of agar blocks

Изолят <i>Isolate</i>	Зона задержки роста патогена, мм <i>The pathogen growth retardation zone, mm</i>	Активность изолята <i>Isolate activity</i>
СБ1 <i>SB1</i>	18,83 ± 0,52	1,39 ± 0,04
СБ2 <i>SB2</i>	3,25 ± 0,19	0,24 ± 0,02
СБ3 <i>SB3</i>	4,00 ± 0,32	0,30 ± 0,02
СБ4 <i>SB4</i>	–	0
СБ5 <i>SB5</i>	3,42 ± 0,17	0,25 ± 0,01
СБ6 <i>SB6</i>	3,83 ± 0,12	0,28 ± 0,01
СБ7 <i>SB7</i>	–	0
СБ8 <i>SB8</i>	–	0
СБ9 <i>SB9</i>	3,08 ± 0,17	0,23 ± 0,02
СБ10 <i>SB10</i>	18,00 ± 0,55	1,33 ± 0,17
СБ11 <i>SB11</i>	3,58 ± 0,17	0,27 ± 0,02
СБ12 <i>SB12</i>	13,75 ± 0,44	1,02 ± 0,03
СБ13 <i>SB13</i>	12,00 ± 0,32	0,89 ± 0,11
СБ14 <i>SB14</i>	13,08 ± 0,30	0,97 ± 0,08
СБ15 <i>SB15</i>	29,83 ± 0,78	2,21 ± 0,19
СБ16 <i>SB16</i>	26,08 ± 0,36	1,93 ± 0,17
СБ17 <i>SB17</i>	12,17 ± 0,64	0,90 ± 0,11
СБ18 <i>SB18</i>	–	0
СБ19 <i>SB19</i>	–	0
СБ20 <i>SB20</i>	26,92 ± 0,43	2,00 ± 0,11
СБ21 <i>SB21</i>	11,08 ± 0,26	0,82 ± 0,08
СБ22 <i>SB22</i>	12,92 ± 0,48	0,96 ± 0,10
СБ23 <i>SB23</i>	5,58 ± 0,33	0,41 ± 0,03
СБ24 <i>SB24</i>	4,92 ± 0,26	0,36 ± 0,04
СБ25 <i>SB25</i>	–	0

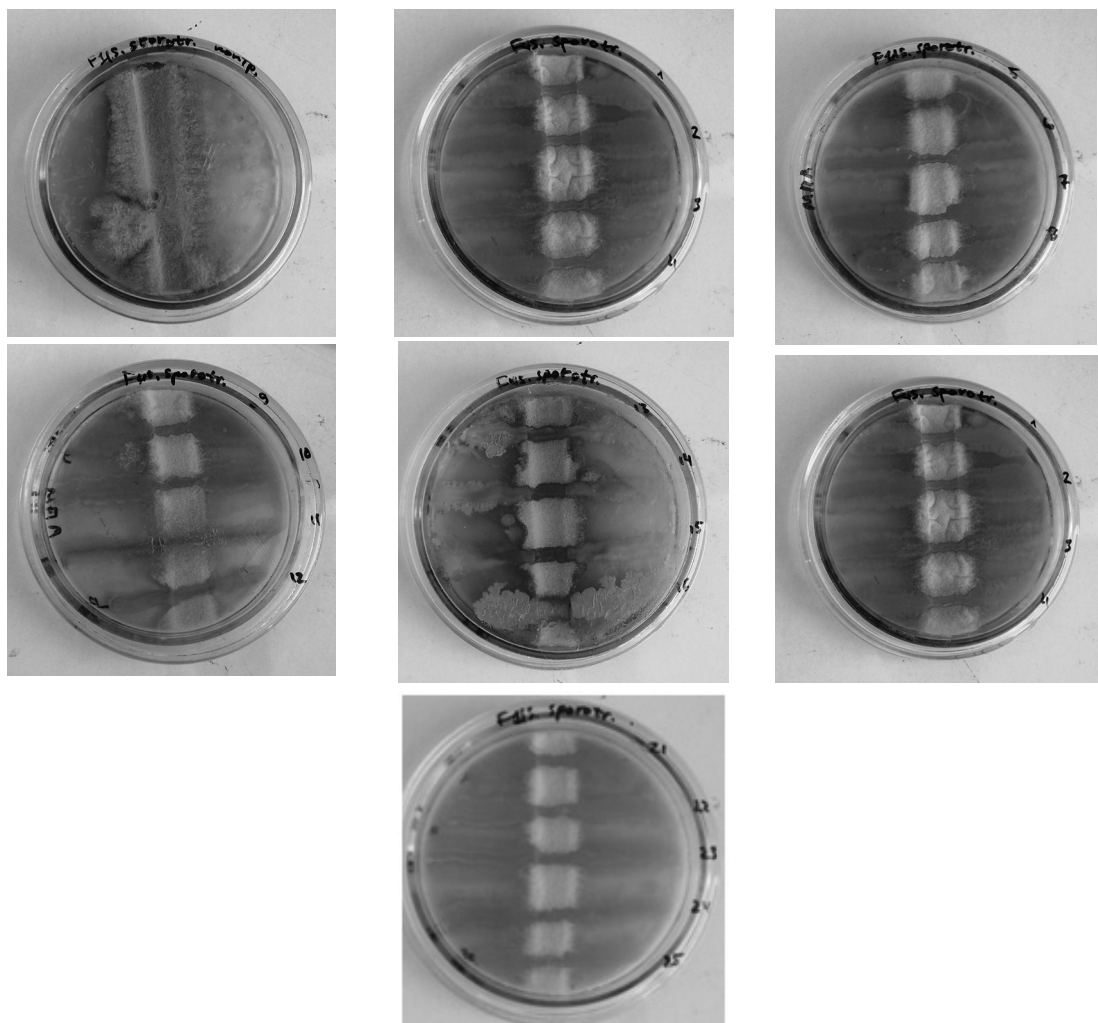


Рис. 4. Подавление развития микромицета *Fusarium sporotrichioides* бактериальными изолятами (метод штриха, 7-е сутки культивирования)
 Fig. 4. Suppression of the development of micromycete *Fusarium sporotrichioides* with bacterial isolates (stroke method, 7 days of cultivation)

18,83 ± 0,52 мм, активность – 1,39, СБ10 – 18,00 ± 0,55 мм и 1,33, СБ16 – 26,08 ± 0,36 мм и 1,93, СБ20 – 26,92 ± 0,43 мм и 2,00 соответственно.

Методом модифицированного штриха установили, что выделенные изоляты в той или иной степени обладали антагонистической активностью в отношении тест-культуры гриба (рис. 4).

Зона задержки роста патогена к 7-м суткам совместного культивирования варьировала от 2,0 до 13,5 мм (табл. 5). Наибольшую активность показали изоляты СБ16 и СБ17, зона задержки ими роста тестового штамма гриба составила соответственно 9,00 ± 0,35 мм и 13,00 ± 0,35 мм.

Оценку фунгистатического действия выделенных изолятов провели методом отсроченного антагонизма (рис. 5). При культивировании патогена на среде с инактивированными культурами бактерий шесть изолятов полностью задерживали рост гриба: СБ1, СБ10, СБ12, СБ15, СБ16 и СБ20.

Активность оставшихся изолятов оценивали подсчетом количества выросших колоний микромицета и выражали степень ингибирования роста патогена (рис. 6).

Наибольшую фунгистатическую активность в отношении микромицета *Fusarium sporotrichioides* показали изоляты СБ1, СБ10, СБ12, СБ15, СБ16 и СБ20. Степень ингибирования развития гриба изолятом СБ14 была ниже на 11,9 %, СБ22 – на 15,5 %, СБ18 – 21,4 % СБ13 и СБ21 – 22,6 %. Минимальной фунгистатической активностью обладали изоляты СБ25, СБ4, СБ8, СБ18, СБ7 и СБ19, степень ингибирования патогена составляла 4,8–17,9 %. Активность изолятов СБ2, СБ3, СБ5, СБ6, СБ9, СБ11 и СБ24 была от 25 до 40 %, СБ23 – не превышала 50 %.

В результате проведенных исследований из 25 бактериальных изолятов, выделенных из природных биотопов, наиболее эффективными антагонистами микроскопических патогенных грибов *Fusarium sporotrichioides* являются восемь штаммов (табл. 6).

Анализируя данные по скринингу изолятов, обладающих антагонистической активностью в отношении микромицета *Fusarium sporotrichioides*, полученные различными методами, можно сделать вывод о том, что активные штаммы обнаруживаются при использовании любого из них, однако полнота

Таблица 5

Антагонизм изолятов к микромицету *Fusarium sporotrichioides*, установленный методом штриха

Table 5

Antagonism of isolates to the micromycete *Fusarium sporotrichioides*, established by the stroke method

Изолят Isolate	Зона задержки роста, мм Area of growth retardation, mm		
	Срок культивирования, сутки Term of cultivation, days		
	2	4	7
СБ1 SB1	5,00 ± 0,35	3,83 ± 0,20	4,17 ± 0,20
СБ2 SB2	3,50 ± 0,00	3,33 ± 0,20	3,67 ± 0,20
СБ3 SB3	4,17 ± 0,20	2,67 ± 0,41	4,00 ± 0,00
СБ4 SB4	4,33 ± 0,20	3,50 ± 0,20	4,00 ± 0,35
СБ5 SB5	4,00 ± 0,35	3,67 ± 0,20	4,17 ± 0,20
СБ6 SB6	3,50 ± 0,35	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,35
СБ7 SB7	2,67 ± 0,20	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
СБ8 SB8	2,50 ± 0,00	1,67 ± 0,20	2,00 ± 0,00
СБ9 SB9	3,17 ± 0,20	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
СБ10 SB10	3,67 ± 0,41	3,17 ± 0,20	3,00 ± 0,35
СБ11 SB11	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	4,33 ± 0,20
СБ12 SB12	4,67 ± 0,20	4,50 ± 0,35	4,50 ± 0,00
СБ13 SB13	4,17 ± 0,20	4,17 ± 0,00	4,50 ± 0,35
СБ14 SB14	5,50 ± 0,00	5,00 ± 0,35	5,00 ± 0,00
СБ15 SB15	5,67 ± 0,20	5,17 ± 0,20	5,50 ± 0,00
СБ16 SB16	11,17 ± 0,20	9,17 ± 0,20	9,00 ± 0,35
СБ17 SB17	9,33 ± 0,20	11,83 ± 0,20	13,00 ± 0,35
СБ18 SB18	3,50 ± 0,00	3,17 ± 0,20	3,00 ± 0,00
СБ19 SB19	4,00 ± 0,35	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00
СБ20 SB20	4,00 ± 0,00	3,67 ± 0,41	3,83 ± 0,20
СБ21 SB21	3,17 ± 0,20	4,00 ± 0,00	3,50 ± 0,35
СБ22 SB22	2,50 ± 0,00	3,67 ± 0,20	4,00 ± 0,00
СБ23 SB23	4,00 ± 0,00	3,50 ± 0,35	4,00 ± 0,00
СБ24 SB24	4,33 ± 0,20	3,50 ± 0,35	3,50 ± 0,00
СБ25 SB25	4,00 ± 0,00	3,50 ± 0,35	3,50 ± 0,35

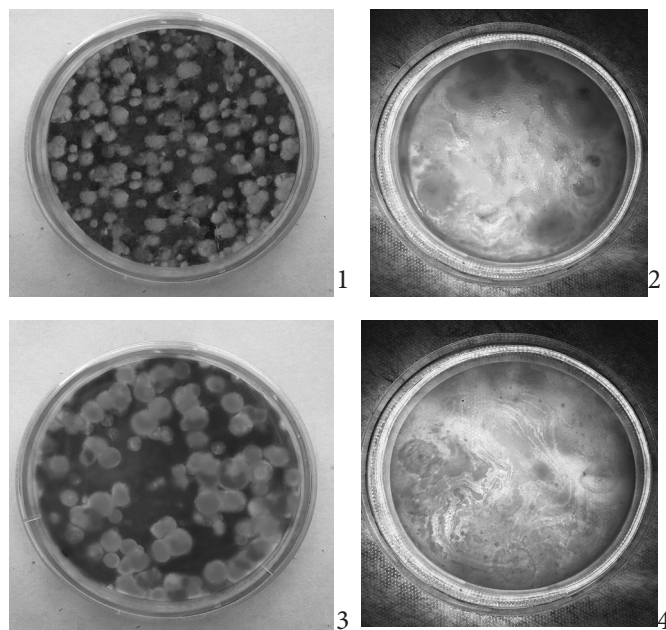


Рис. 5. Результаты оценки фунгистатического действия изолятов в отношении микромицета *Fusarium sporotrichioides* (1 – контроль, 2 – СБ1, 3 – СБ2, 4 – СБ10)

Fig. 5. Results of the evaluation of fungistatic action of isolates against micromycete *Fusarium sporotrichioides* (1 – control, 2 – SB1, 3 – SB2, 4 – SB10)

картины взаимодействия антагониста и патогена достигается постановкой нескольких взаимодополняющих опытов. Методом встречных культур установили характер взаимоотношений изолятов и патогена, степень ингибирования роста мицелия, ширину зоны роста гриба в присутствии антагониста, размер области диффузии веществ от блока изолята до мицелия гриба с образованием стерильной зоны. Так, наличие фунгистатического алиментарного антагонизма отмечали во взаимоотношениях изолятов СБ16, СБ17, СБ20 и СБ23. Фунгистатическим антибиотическим антагонизмом обладали изоляты СБ10 и СБ15, следовательно, для них был характерен синтез веществ, обладающих ингибирующим мицелий гриба действием. Метод агаровых блоков позволил оценить зону подавления роста гриба, морфологические изменения культур при культивировании антагониста непосредственно на среде с патогеном. Противогрибковый эффект изолятов в данном случае отражал способность последних сохранить зону нанесения, наибольшей активностью отличились изоляты СБ1, СБ10, СБ15, СБ16 и СБ20. Метод модифицированного штриха, также как и метод встречных культур, показал способность изолятов к росту и выделению противогрибковых веществ на среде с патогеном, результат сокультивирования культур выражался в зоне задержки роста патогена, наибольшую зону задержки роста имели изоляты СБ16 и СБ17. Метод отсроченного антагонизма характеризовал фунгистатическую активность веществ, выделяемых изолятами, результат действия которых выражался в количестве

Таблица 6
Скрининг изолятов, обладающих антагонистической активностью в отношении микромицета *Fusarium sporotrichioides*

Table 6

Screening of isolates having antagonistic activity against micromycete *Fusarium sporotrichioides*

Изолят <i>Isolate</i>	Метод оценки антагонистической активности <i>Method for assessing antagonistic activity</i>			
	Метод встречных культур <i>Method of counter cultures</i>	Метод агаровых блоков <i>Method of agar blocks</i>	Метод модифицированного штриха <i>Method of modified stripe</i>	Метод отсроченного антагонизма <i>Method of delayed antagonism</i>
СБ1 <i>SB1</i>		+		+
СБ2 <i>SB2</i>				
СБ3 <i>SB3</i>				
СБ4 <i>SB4</i>				
СБ5 <i>SB5</i>				
СБ6 <i>SB6</i>				
СБ7 <i>SB7</i>				
СБ8 <i>SB8</i>				
СБ9 <i>SB9</i>				
СБ10 <i>SB10</i>	+	+		+
СБ11 <i>SB11</i>				
СБ12 <i>SB12</i>				+
СБ13 <i>SB13</i>				
СБ14 <i>SB14</i>				
СБ15 <i>SB15</i>	+	+		+
СБ16 <i>SB16</i>	+	+	+	+
СБ17 <i>SB17</i>	+		+	
СБ18 <i>SB18</i>				
СБ19 <i>SB19</i>				
СБ20 <i>SB20</i>	+	+		+
СБ21 <i>SB21</i>				
СБ22 <i>SB22</i>				
СБ23 <i>SB23</i>	+			
СБ24 <i>SB24</i>				
СБ25 <i>SB25</i>				

Примечание: «+» – наиболее выраженное действие

Note: «+» is the most pronounced action

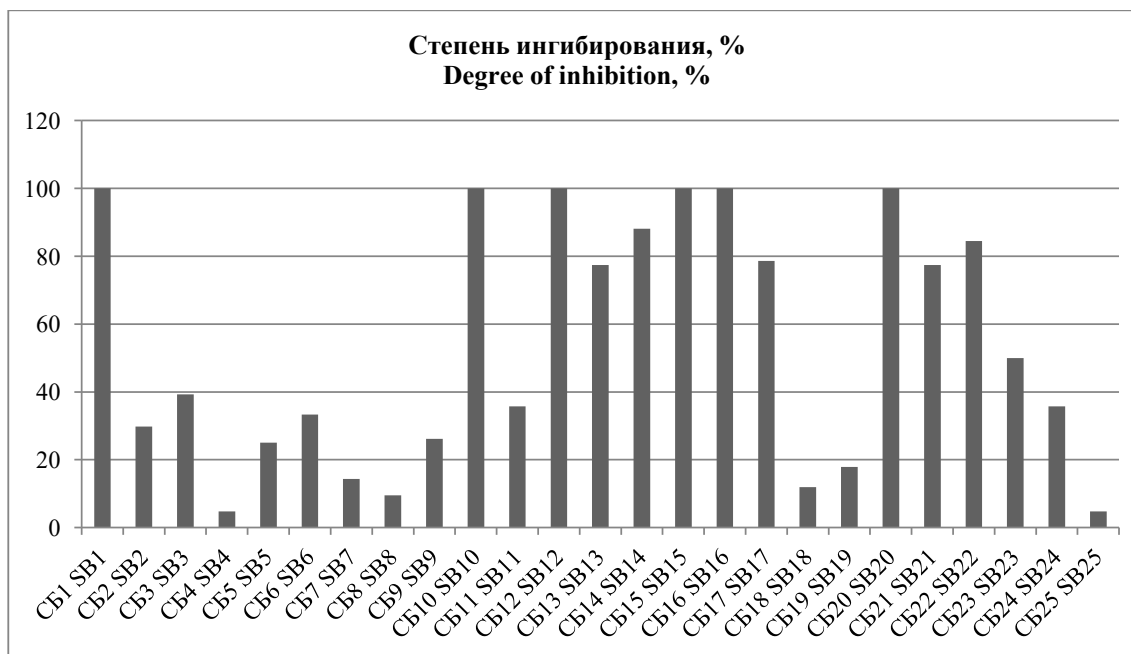


Рис. 6. Фунгистатическая активность изолятов в отношении микромицета *Fusarium sporotrichioides*
Fig. 6. Fungistatic activity of isolates against micromycete *Fusarium sporotrichioides*

колоний микромицета, выросших на среде, содержащей инактивированные микроорганизмы, и индексом ингибирования его роста. Наибольшую фунгистатическую активность проявили изоляты СБ1, СБ10, СБ12, СБ15, СБ16 и СБ20.

Выводы

В результате исследования у выделенных из природных биотопов изолятов выявлено противогрибковое действие в отношении микромицета *Fusarium sporotrichioides*. Методом встречных культур антагонистический потенциал установили у СБ10, СБ15, СБ16, СБ17, СБ20 и СБ23, ширина зоны роста мицелия гриба была ниже контроля на 64,6; 64,3; 65,7; 63,0 и 68,8 % соответственно. Методом агаровых блоков эффективность показали изоляты СБ1, СБ10, СБ15, СБ16 и СБ20, индекс их активности составлял 1,39 ±

0,04, 1,33 ± 0,17, 2,21 ± 0,19, 1,93 ± 0,17 и 2,00 ± 0,11. Изоляты СБ16 и СБ17 показали эффективность при постановке опыта по методу модифицированного штриха, зона задержки ими роста тестового штамма гриба составила соответственно 9,00 ± 0,35 мм и 13,00 ± 0,35 мм. Степень ингибирования роста микромицета изолятами СБ1, СБ10, СБ12, СБ15, СБ16 и СБ20, выявленная по методу отсроченного антагонизма, составляла 100 %. Скрининг противогрибковой эффективности показал, что из 25 изолятов наиболее эффективными оказались восемь, из них два показали фунгистатическую алиментарную активность, один – антибиотическую, пять изолятов обладали высоким противогрибковым действием в процессе роста и активностью метаболитов. Отобранные изоляты в перспективе могут служить основой для получения биофунгицидов.

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (Фонд содействия инновациям) в рамках выполнения Соглашения о предоставлении гранта на выполнение научно-исследовательских работ за № 10244ГУ/2015.

Литература

1. Гагкаева Т. Ю., Гаврилова О. П., Левитин М. М., Новожилов К. В. Фузариоз зерновых культур // Приложение к журналу «Защита и карантин растений». 2011. № 5. 52 с.
2. Соколова Л. М., Егорова А. А., Терешонкова Т. А., Алексеева К. Л. Ускоренный метод выделения в чистую культуру и характеристика грибов *Fusarium*, поражающих морковь столовую // Селекция и семеноводство овощных культур. 2014. № 45. С. 496–501.
3. Методические указания по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов от 25 февраля 1985 г.
4. ГОСТ 13496.6-71 «Комбикорм. Метод выделения микроскопических грибов».
5. Лабораторный практикум по микробиологии : учеб.-метод. комплекс. Минск : УО «Белорусский государственный педагогический университет имени Максима Танка», 2012. 129 с.
6. Храмцов А. К., Стефанович А. И. Микология: методические указания к спецкурсу по разделу «Экология грибов и грибоподобных организмов». Минск : БГУ, 2011. 45 с.

7. Асатурова А. М., Дубяга В. М., Томашевич Н. С., Жарникова М. Д. Отбор перспективных агентов биологического контроля для защиты озимой пшеницы от возбудителей фузариоза // Науч. журнал КубГАУ. 2012. № 75 (01). URL : <http://ei.kubagro.ru/2012/01/pdf/55.pdf>.
8. Леонтьевская Е. А. Структура эпифитно-сапротрофных бактериальных комплексов зерновых и овощных культур : дис. ... канд. биол. наук. М., 2014. 89 с.
9. Карамова Н. С., Надеева Г. В., Багаева Т. В. Методы исследования и оценки биоповреждений, вызываемых микроорганизмами : учеб.-метод. пособие. Казань : Казанский университет, 2014. 36 с.
10. Идиятов И. И., Валиуллина Д. А., Галлямова С. Р. Первичный скрининг микроорганизмов-антагонистов к микроскопическим грибам *Aspergillus flavus* и *Fusarium sporotrichioides* // Ученые записки КГАВМ. 2017. № 231 (III). С. 90–93.

References

1. Gagkayeva T. Yu., Gavrilova O. P., Levitin M. M., Novozhilov K. V. Fusarium of grain crops // Supplement to the journal «Plant Protection and Quarantine». 2011. No. 5. 52 p.
2. Sokolova L. M., Egorova A. A., Tereshonkova T. A., Alekseeva K. L. Accelerated method of isolation into pure culture and characteristics of fungi Fusarium, carrots affecting the dining room // Selection and seed-growing of vegetable crops. 2014. No. 45. P. 496–501.
3. Methodological instructions for sanitary and mycological evaluation and improvement of feed quality of February 25, 1985.
4. GOST 13496.6-71 «Mixed fodder: method for the isolation of microscopic fungi».
5. Laboratory workshop on microbiology : training and methodology complex. Minsk : Belarusian State Pedagogical University named after Maxim Tank, 2012. 129 p.
6. Khrantsov A. K., Stefanovich A. I. Mycology: methodical instructions to the special course on the section «Ecology of fungi and mushroom-like organisms». Minsk : BSU, 2011. 45 p.
7. Asaturova A. M., Dubyaga V. M., Tomashevich N. S., Zharnikova M. D. Selection of promising biological control agents for protection of winter wheat from fusarium pathogens // Scientific journal of KubSAU. 2012. No. 75 (01). URL : <http://ei.kubagro.ru/2012/01/pdf/55.pdf>.
8. Leontievskaya E. A. Structure of epiphytic-saprotrophic bacterial complexes of cereals and vegetable crops : dis. ... cand. biol. sciences. M., 2014. 89 p.
9. Karamova N. S., Nadeeva G. V., Bagaeva T. V. Methods of research and evaluation of biological damage caused by microorganisms : teaching-methodical manual. Kazan : Kazan University, 2014. 36 p.
10. Idiyatov I. I., Valiullina D. A., Gallyamova S. R. Primary screening of microbial antagonism to microscopic fungi of the genus *Aspergillus flavus* and *Fusarium sporotrichioides* // Scientific notes Kazan Bauman State Academy of Veterinary Medicine. 2017. No. 231 (III). P. 90–93.