

ИЗОЛИРАНЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И СКРИНИНГ НА АКТИНОМИЦЕТИ ЗА АНТИГЪБНИ СВОЙСТВА СРЕЩУ ФИТОПАТОГЕНИ

Севдалина Тодорова

Русенски университет „Ангел Кънчев“, Филиал – Разград, 7200 Разград, България,
e-mail: stodorova@uni-rise.bg

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND SCREENING ANTIFUNGAL PROPERTIES OF ACTINOMYCETES AGAINST PHYTOPATHOGENS

Sevdalina Todorova

Department of Biotechnologies and Food technologies, Ruse Angel Kanchev University – Razgrad Branch, 7200 Razgrad, Bulgaria, e-mail: stodorova@uni-rise.bg

ABSTRACT

Actinomyces strains, isolated from soils were evaluated for their antagonistic activity against 12 phytopathogenic fungi by dual culture method. All the isolates showed inhibition potential against test-microorganisms. Among the active strains, three isolates (3Gi, Ц 21, and ИСТ/1В) have showed strong antifungal activity which may provide a potent source for antifungal metabolites.

Key words: *Actinomycetes, phytopathogenic fungi, antifungal activity, biological control*

Фитопатогенните гъби създават сериозни проблеми по света, предизвиквайки заболявания по растенията и животните и развала на готовата продукция при съхранение (Boussaber et al., 2014). За биоконтрол на гъбните заболявания широко се използват микробни антагонисти. Актиномицетите имат способността да синтезират много различни биологично активни метаболити, като антибиотици, биопестициди, ензими и др. (Bull and Stach, 2007; Singh et al., 2012). Те са основен източник на вещества с противогъбно действие. Всеки актиномицетен щам вероятно има генетичен потенциал за производство на 10-20 вторични метаболити (Elamvazhuthi and Subramanian, 2013). Сред мнозината видове актиномицети, особено сред принадлежащите към род *Streptomyces*, има продуценти на широк спектър биологично активни съединения, притежаващи антагонистична активност срещу редица гъбни фитопатогени, като *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium udum*, *Alternaria alternata* и др. (Harikrishnan and Shanmugaiyah, 2013; Singh et al., 2012).

Целта на настоящата работа е изолиране от почва на антагонистични актиномицетни щамове и изследване на морфологичните им, културални и биохимични свойства, както и проучване на антимикробната им активност срещу важни в икономическо отношение фитопатогенни гъби.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. *Изолиране на актиномицети - антагонисти от почва.* За изолиране на чисти актиномицетни култури са използвани почвени проби от района на гр. Разград и е приложен рутинен метод на разреждане на почвата. Почвените проби са посяти върху подходящи твърди хранителни среди (Бешков и др., 1986). Първичен скрининг на актиномицети-антагонисти се извършва спрямо съпътстващата ги гъбна микрофлора в петриевите блюда. Колониите на антагонистите се откриват по наличието на стерилни зони около тях и се изолират като чисти култури на твърда среда Гаузе 1 (Гаузе и др., 1983).

2. *Тест-микроорганизми.* Подбрани са следните плесенни гъби: *Alternaria sp.*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme*, *Monilinia cydoniae*,

Monilinia fructigena, *Monilinia laxa*, *Penicillium chrysogenum*, *P. scopulariopsis*, *Rhizopus nigricans*, *Sclerotinia sclerotiorum* от колекцията на катедра “Биотехнологии и хранителни технологии” на РУ „Ангел Кънчев” – Филиал Разград. Поддържането и съхранението им е по методика на Todorova and Kozhuharova (2010).

3. *Вторичен скрининг за антигъбна активност срещу фитопатогени.* Антимикробната активност на изолираните щамове е определена *in vitro* по метода на дифузия в агар в два етапа и се измерва с големината на получените стерилни зони в mm. Използван е модифициран метод на Suwan et al. (2012). Актиномицетните щамове са посяти в плътна щриха по диаметъра на петриевото блюдо върху твърда среда Гаузе 1 и КДА (HiMedia) в съотношение 1:1. След прорастване на актиномицетите, на разстояние 25 mm от щрихата, са посяти две плесенни гъби. Резултатите се отчитат, когато мицелът на гъбата достигне ръба на петриевото блюдо. Опитите са проведени двукратно.

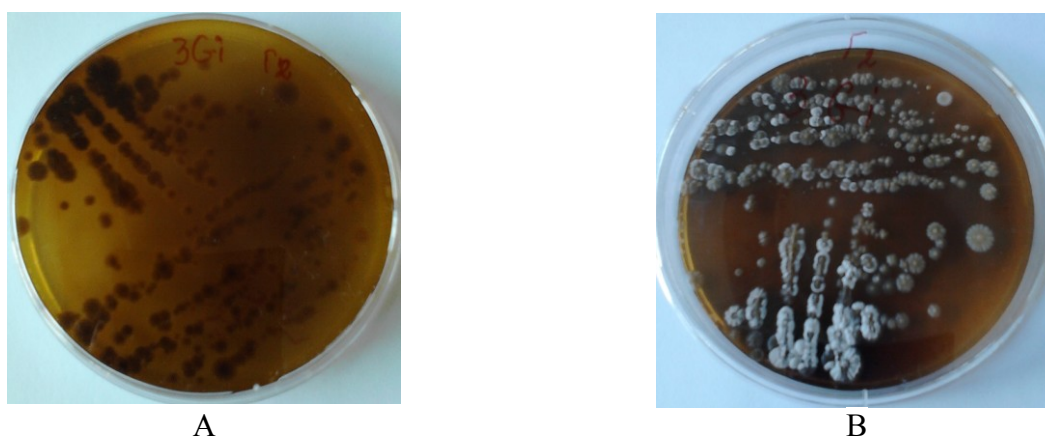
4. *Характеристика на актиномицетните изолати.*

4.1. *Морфологична и културална характеристика.* Морфологичните и културални свойства са проучени по метода на разсев на културата върху твърди хранителни среди Гаузе I и Гаузе II (Бешков и др., 1986; Гаузе и др., 1983). Култивирането е проведено при 28°C в продължение на 21 дни. Изследвани са растежа и пигментацията на въздушния и субстратния мицел, разтворим пигмент в хранителната среда, културалните свойства на изолатите (Singh, et al., 2012). Формата на спороносците и спорите са проучени с помощта на обикновен светлинен микроскоп Olympus CH2.

4.2. *Биохимични свойства.* Изолираните щамове са изследвани по отношение на протеолитична, амилалитична, целулазна, инвертазна, редуцираща ензимна активност (Buchanan and Gibbons, 1974; Гаузе и др., 1983).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

От българска почва в района на гр. Разград са изолирани седем антагонистични актиномицетни щамове спрямо съпътстващата ги в петриевите блюда гъбна микрофлора. Поддържат се на хранителна среда Гаузе I. Съхраняват се в хладилник при 4 °C. Морфологичните и културални свойства на изолатите са изследвани на среди Гаузе 1 и Гаузе 2.



Фиг. 1: Щам *Streptomyces sp.* 3G1 на среда Гаузе 2 – въздушен мицел (А) и субстратен мицел (В)

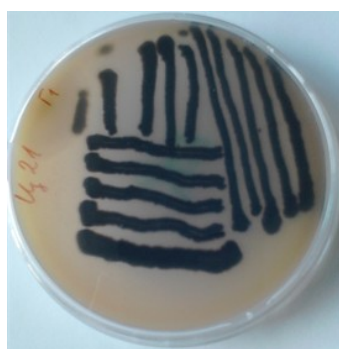
Данните от получените резултати са представени в таблица 1. В резултат на направените изследвания актиномицетните изолати са отнесени към род *Streptomyces* (Гаузе и др., 1983; Buchanan and Gibbons, 1974). Щамовете се различават силно помежду си по цвета на въздушния и субстратен мицел и отделяния пигмент в хранителните среди. Културалните им особености са различни и в зависимост от състава на хранителната среда (фигури 1 и 2).

Културално - морфологични признаци на актиномицетните изолати

Актино-мицетни щамове	Храни-телна среда	Цвят на:			Спороносци	Спори
		Въздушен мицел	Субстратен мицел	Пигмент в хранителна среда		
СРх	Гаузе 1	Бял	Виолетово-син	Светло виолетов	Дълги, разклонени, извити	Цилиндрични
	Гаузе 2	Бял	Бledoкафяв, до виолетов	Няма		
3Gi	Гаузе 1	Бял, до светлосив	Синьо-червен	Кафяв	Къси, разклонени, извити	Кълбовидни и пръчковидни
	Гаузе 2	Светлосив	Светлокафяв	Тъмнокафяв		
Ц 21	Гаузе 1	Бял, до светлосив	Тъмно сивокафяв до черен	Няма	Неразклонени, спирални	Овални
	Гаузе 2	Сивкав	Тъмнокафяв	Тъмнокафяв		
Ю-23	Гаузе 1	Бежов, със зеленикав оттенък	Зеленокафяв до тъмномаслинен	Червенокафяв	Спирални	Овални
	Гаузе 2	Светло-бежов	Тъмнокафяв, маслинен	Тъмнокафяв		
Д/С III	Гаузе 1	Бял до мръснобял	Жълт до тъмнокафяв	Няма	Слабо извити	Кълбовидни, овални
	Гаузе 2	Светлокафяв	Кафяв	Кафяв		
ИСТ/1В	Гаузе 1	Бял до сив	Тъмнокафяв	Тъмнокафяв	Къси, прави, разклонени	Кръгли
	Гаузе 2	Бежовосив	Зеленикавокафяв	Сивокафяв		
П 8/2	Гаузе 1	Бял	Оранжевочервен	Бledoоранжев	Разклонени, къси, извити	Пръчковидни
	Гаузе 2	Липсва	Червенокафяв	Няма		



А



В



С

Фиг. 2 Щам *Streptomyces sp.* Ц 21 на среда Гаузе 1 – въздушен (А) и субстратен (В) мицел съответно, и на среда Гаузе 2 – въздушен мицел (С)

Данните за биохимичните свойства на актиномицетните изолати са представени в таблица 2. Повечето от щамовете имат амилолитични свойства, редуцират нитрати, инвертират захароза, не растат на целулоза и всички проявяват протеолитична активност.

Таблица 2

Биохимични свойства на актиномицетните изолати

Актиномицетни шамве Биохимични свойства	Хидролиза на нишесте	Пептонизация на млякото	Редукция на нитрати	Инвертиране на захароза	Усвояване на целулоза
CPx	Да	Да, с коагулация	Да	Да	Не
3Gi	Да	Да	Слабо	Да	Слабо
Ц 21	Не	Да	Да	Да	Не/слабо
Ю-23	Да	Да, с коагулация	Не	Не	Не/слабо
ИСТ/1В	Да, силно	Да	Слабо	Да	Не
Д/С III	Да, силно	Да	Да	Не	Не
П 8/2		Да	Да	Не	

Резултатите от изследване на антигъбната активност на всички изолати са представени в таблица 3.

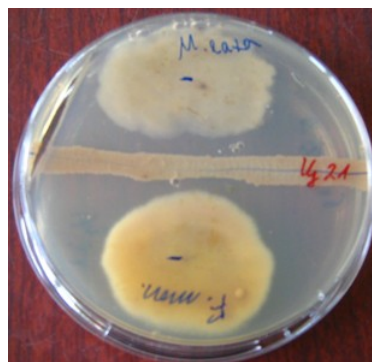
Таблица 3

Антигъбна активност на актиномицетните изолати срещу гъбни фитопатогени

Тест-микро-организми Изолати	Стерилни зони, mm						
	CPx	3Gi	Ц 21	Ю-23	Д/С III	ИСТ/1В	П 8/2
<i>Alternaria sp.</i>	0	10	11	7	7	3	3
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	4	5	0	0	2	0
<i>Botrytis cinerea</i>	0	2	1	0	0	9	1
<i>Fusarium moniliforme</i>	0	6	4	1	1	5	3
<i>Monilinia cydoniae</i>	0	15	0	0	0	8	0
<i>Monilinia fructigena</i>	0	4	1	0	4	10	0
<i>Monilinia laxa</i>	1	6	5	3	3	5	3
<i>Penicillium chrysogenum</i>	8	9	8	8	8	7	7
<i>Penicillium scopulariopsis</i>	2	0	1	0	1	5	0
<i>Rhizopus nigricans</i>	0	13	1	0	0	5	0
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0	2	5	0	0	0	0



(A)



(B)



(C)

Фиг. 3 Антигъбно действие на шамове *Streptomyces sp.* 3Gi (A), Ц 21 (B) и ИСТ/1В (C) срещу *Fusarium moniliforme* и *Monilinia laxa*

Данните в таблица 3 показват, че антигъбна активност проявяват всички изолирани актиномицети, но в различна степен. Диаметрите на стерилните зони варират от 0 до 15 mm.

Всеки щам подтиска развитието най-малко на 4 плесенни гъби, а всеки тест-микроорганизъм се инхибира поне от два изолата. Срещу *P. chrysogenum* и *M. laxa* антигъбна активност проявяват всички актиномицетни щамове. Три от седемте изолирани актиномицета – 3Gi, Ц 21 и ИСТ/1В, показаха най-силно изразени антигъбни свойства срещу най-голям брой плесенни гъби. Изолатите 3Gi и Ц 21 имат антигъбна активност срещу 11 от 12-те тествани фитопатогена, а щам ИСТ/1В – срещу 10 (фигура 3). Подобни резултати, получени с други актиномицетни изолати, съобщават редица автори (Boussaber et al., 2014; Sadeghy and Hatami, 2014), но те са използвали различни тест-микроорганизми. Някои от плесенните гъби в настоящото изследване, като *M. cydoniae*, *M. fructigena*, *M. laxa*, *B. cinerea*, *P. scopulariopsis* са тествани за първи път на антигъбно действие от страна на актиномицети.

ИЗВОДИ

Изолираните актиномицетни щамове от род *Streptomyces* показаха антигъбна активност срещу всички тествани, някои от които за първи път, фитопатогенни гъби. Най-висока биоконтролираща активност и срещу най-голям брой плесенни гъби, проявяват щамове *Streptomyces sp.* 3Gi, Ц 21 и ИСТ/1В. Тези изолати са продуценти на мощни противогъбни метаболити, поради което успешно могат да се използват в биологичния контрол на някои гъбни заболявания по растенията.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бешков, М. Н., Е. А. Карова, И. Мургов, 1986. Ръководство за упражнения по микробиология, Земиздат, София
2. Гаузе, Г. Ф., Т. П. Преображенская, М. А. Свешникова, А. П. Терехова, Т. С. Максимова, 1983. Определитель актиномицетов, Наука, Москва
3. Boussaber, El A., S. B. S. EL Idrissi., K. I. Meftah., L. Hilali., A. Hilali, 2014. Screening of Actinomycete Bacteria Producing Antifungal Metabolites Which Could Be Used in Biological Control against a Phytopathogenic Fungus (*Rhizopus stolonifer*). American Journal of Biology and Life Sciences, 2, 4, 84-89
4. Buchanan, R. E., N. E. Gibbons, 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition, The Williams and Wilkins Company, Baltimore
5. Bull, A. T., J. E. Stach, 2007. Marine Actinobacteria: New Opportunities for Natural Product Search and Discovery, Trends in Microbiology, 15, 491-499
6. Elamvazhuthi, P., M. Subramanian, 2013. Antagonistic Activity of Actinomycetes from Jeypore Paddy Soils against Selective Phytopathogenic Fungi. Journal of Modern Biotechnology, 2, 3, 66-72
7. Harikrishnan, H., V. Shanmugaiah, 2013. *Streptomyces sp.* VSMGT1014-Mediated Antifungal Activity against Fungal Plant Pathogens. Prospects in Bioscience: Addressing the Issues, 39, 335-341
8. Sadeghy, B., N. Hatami, 2014. Screening Biological Activities of Soil-borne *Streptomyces sp.* against Several Phytopathogenic fungi. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47, 8, 954-958
9. Singh, S., P. Kumar, N. Gopalan, B. Shrivastava, R.C. Kuhad, H. S. Chaudhary, 2012. Isolation and Partial Characterization of Actinomycetes with Antimicrobial Activity against Multidrug Resistant Bacteria. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 1147-1150. doi:10.1016/S2221-1691(12)60375-X
10. Suwan, N., W. Boonying, S. Nalumpang, 2012. Antifungal Activity of Soil Actinomycetes to Control Chilli Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Journal of Agricultural Technology, 8, 2, 725-737
11. Todorova, S., L. Kozhuharova, 2010. Characteristics and Antimicrobial Activity of *Bacillus subtilis* Strains Isolated from Soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26, 7, 1207 – 1216