

10-21-2017

Preservation of antagonistic capability of micromycetes at storage by different methods

M. S. BAKHTIYOROVA

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

N. K. BEKMUKHAMEDOVA

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

J. J. TASHPULATOV

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

M. S. MAMIEV

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

Follow this and additional works at: <https://uzjournals.edu.uz/agrарxabarnomasi>

Recommended Citation

BAKHTIYOROVA, M. S.; BEKMUKHAMEDOVA, N. K.; TASHPULATOV, J. J.; and MAMIEV, M. S. (2017) "Preservation of antagonistic capability of micromycetes at storage by different methods," *Bulletin of the Agrarian Science of Uzbekistan*: Vol. 2018 : Iss. 1 , Article 13.

Available at: <https://uzjournals.edu.uz/agrарxabarnomasi/vol2018/iss1/13>

This Article is brought to you for free and open access by 2030 Uzbekistan Research Online. It has been accepted for inclusion in Bulletin of the Agrarian Science of Uzbekistan by an authorized editor of 2030 Uzbekistan Research Online. For more information, please contact sh.erkinov@edu.uz.

УДК: 582.28.632.4

М.С.БАХТИЁРОВА, Н.К.БЕКМУХАМЕДОВА, Ж.Ж.ТАШПУЛАТОВ, М.С.МАМИЕВ

СОХРАННОСТЬ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ СПОСОБНОСТИ МИКРОМИЦЕТОВ ПРИ ХРАНЕНИИ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ

В научно-практической литературе имеется значительное количество публикаций, посвященных изучению сохранности свойств микроорганизмов при хранении различными методами. В коллекции промышленно-важных культур микроорганизмов Института микробиологии АН РУз хранятся более 100 штаммов микроскопических грибов, обладающих антагонистическими свойствами к различным фитопатогенам. В наших исследованиях была изучена антагонистическая активность промышленно-важных штаммов микромицетов *Aspergillus terreus* 455 и 482, *Aspergillus niger* 606 и 607 и *Trichoderma harzianum* 445 при хранении различными методами в течение 4 лет. В качестве тест-культур фитопатогенов использовали микроскопические грибы-возбудители вертициллёзного (*Verticillium dahliae*) и фузариозного (*Fusarium oxysporum*) вилта хлопчатника. Результаты исследований показали, что все изученные штаммы микромицетов-антагонистов во всех методах хранения культур сохраняли антагонистическую активность по отношению к фитопатогенам.

Ключевые слова: микроорганизмы, мицелиальные грибы, свойства, жизнеспособность, хранение, лиофилизация, вазелиновое масло, стерильный песок, стерильная почва, антагонисты, фитопатогены.

ВВЕДЕНИЕ

Выбор эффективного способа хранения конкретного микроорганизма должен основываться, прежде всего, на сохранности морфо-культуральных и физиолого-биохимических признаков и сохранения максимального числа жизнеспособных клеток. Обеспечение оптимальной сохранности культур, включая проведение периодического и системного анализа влияния условий хранения на сохранность исходных свойств штаммов, является ключевым аспектом коллекционной работы.

В научно-практической литературе имеется значительное количество публикаций, посвященных изучению сохранности свойств микроорганизмов при хранении различными методами. Традиционные методы хранения, такие как периодические пересевы, хранение под минеральным маслом, под водой, в почве являются доступными по цене и не очень затруднительны по исполнению в лабораторных условиях. Современные методы, такие как лиофилизация и криоконсервация, обеспечивают длительное сохранение не только жизнеспособности, но и генетической стабильности образцов. Они активно используются практически во всех крупных национальных коллекциях культур, а также во многих промышленных коллекциях предприятий и научных учреждений [1].

По литературным данным известно, что микроорганизмы-антагонисты фитопатогенов способны оказывать положительное влияние на целый комплекс физиолого-биохимических процессов, протекающих в растительном организме и определяющих формирование урожая, а также уменьшают стрессовое воздействие неблагоприятных условий среды на растение [2, 3].

Растения взаимодействуют с широким спектром микроорганизмов, в том числе с полезными видами, особое внимание среди которых уделяется микроорганизмам-антагонистам фитопатогенов. Многие виды микроорганизмов являются продуцентами комплекса физиологически активных соединений (антибиотических веществ, стимуляторов роста, т.п.). Активные культуры-антагонисты способны подавлять рост и развитие целого ряда фитопатогенных грибов и бактерий, что позволяет антагонистам достаточно быстро вытеснять из почвы или субстрата патогенную микрофлору [4-6]. Их антагонистические свойства используются в сельскохозяйственной биотехнологии для разработки и производства биологических средств защиты растений против ряда заболеваний [7].

В связи, с этим грибы-антагонисты фитопатогенов, выделенные из различных субстратов Узбекистана и сохраняемые в коллекции в течение длительного времени были исследованы с целью изучения влияния различных методов хранения на сохранность антагонистических способностей микроскопических грибов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом исследования служили микроскопические грибы коллекционного фонда, выделенные из различных экологических ниш Узбекистана, включая экстремофильные культуры, выделенные из техногенных зон, и сохраняемые в коллекции в течение длительного времени [8]. Были использованы следующие методы хранения.

Метод хранения под вазелиновым маслом. Предварительно стерилизовали медицинское вазелиновое масло в автоклаве 2 раза при 1 атм 1 ч. Затем его прогревали при 150°C в сушильном шкафу для удаления воды. Выросшие до стадии спороношения (7-10 суток) на агаровых косячках (среда Чапека) культуры микроскопических грибов заливали вазелиновым маслом слоем 1,5-2 см и хранили при комнатной температуре. Перед следующим закладыванием на хранение под маслом культуры проводили через два-три пассажа на свежей питательной среде.

Метод хранения микроскопических грибов в стерильной почве и песке. Садовую почву и песок тщательно просеивали через мелкое сито, 3 раза стерилизовали в конических колбах, затем засыпали в пробирки Эппендорфа почву по 1 г и песок по 1,5 г и снова трижды стерилизовали по 30 мин под давлением 1,5 атм. На среде Чапека в течение 7-10 дней культивировали микроскопические грибы, затем добавляли стерильную воду по 5 мл, делали суспензию, стерильной пипеткой брали суспензию со спорами по 0,25-0,3 мл и переносили в стерильную почву/песок. Затем крышку пробирки Эппендорфа заливали парафином.

Для лиофильного высушивания использовали 7-суточные культуры грибов выращенные на агаризованных селективных средах. Микромицеты смывали защитной средой состоящей из обезжиренного молока, 5% сахарозы и крахмала, и тщательно встряхивали. Полученную суспензию каждой культуры разливали стерильно в пенициллиновые флаконы по 5 мл. Лиофилизацию культур осуществляли на установке «Alpha 1-2 LD plus» (Германия) с предварительным пристеночным замораживанием. После высушивания бутылочки герметически закупоривали крышками.

Количество жизнеспособных клеток определяли методом предельных разведений с высевом на питательные среды. Посевы инкубировали 5-7 суток, подсчитывали количество выросших колоний. Выживаемость культур изучали до лиофильного высушивания, сразу после него и в процессе хранения. Антагонистическую активность микроскопических грибов изучали методом агаровых блоков [9,10].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

При хранении микроорганизмов различными методами в их клетках происходят определенные изменения, последствия которых выявляются во время культивирования культур в первом пассаже. После хранения отмечается изменение количества жизнеспособных единиц, ингибирование или стимуляция процессов продукции антибиотиков, ферментов и т.п.

Нами была изучена антагонистическая активность промышленно-важных штаммов микромицетов *Aspergillus terreus* 455 и 482, *Aspergillus niger* 606 и 607 и *Trichoderma harzianum* 445 при хранении различными методами в течение 4 лет (табл. 1, 2). В качестве тест-культур фитопатогенов использовали микроскопические грибы-возбудители вертициллиозного (*Verticillium dahliae*) и фузариозного (*Fusarium oxysporum*) вилта хлопчатника.

Таблица 1

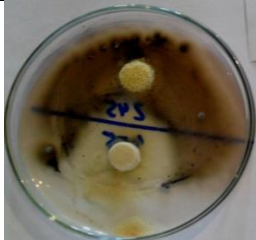
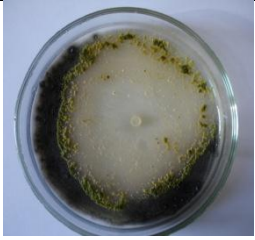
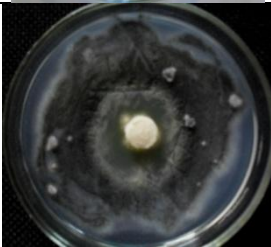
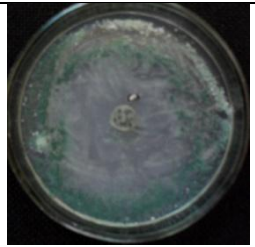
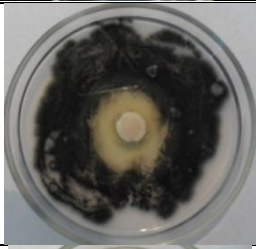



Сохранность антагонистической активности промышленно-важных штаммов микромицетов при хранении различными методами

Микромицеты	Метод хранения	Зона угнетения фитопатогена, D=мм	
		<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Aspergillus terreus</i> 455	Периодический пересев	40	-
	Вазелиновое масло	35	-
	Стерильный песок	36	-
	Стерильная почва	35	-
	Лиофильная сушка	35	-
<i>Aspergillus terreus</i> 482	Периодический пересев	30	-
	Вазелиновое масло	29	-
	Стерильный песок	30	-
	Стерильная почва	30	-
	Лиофильная сушка	25	-

<i>Aspergillus niger</i> 606	Периодический пересев	35	24
	Вазелиновое масло	32	22
	Стерильный песок	34	24
	Стерильная почва	34	24
	Лиофильная сушка	34	22
<i>Aspergillus niger</i> 607	Периодический пересев	32	22
	Вазелиновое масло	30	20
	Стерильный песок	32	22
	Стерильная почва	32	22
	Лиофильная сушка	32	22
<i>Trichoderma harzianum</i> 445	Периодический пересев	65	70
	Вазелиновое масло	55	68
	Стерильный песок	60	70
	Стерильная почва	55	70
	Лиофильная сушка	60	70

Таблица 2

Сохранность антагонистической активности микроскопических грибов после хранения различными методами

Методы хранения	Антагонистическая активность к <i>Verticillium dahliae</i>	
	<i>Aspergillus terreus</i> 455	<i>Trichoderma harzianum</i> 445
Периодический пересев		
Вазелиновое масло		
Стерильная почва		
Стерильный песок		

Результаты исследований показали, что все изученные штаммы микромицетов-антагонистов фитопатогенов во всех методах хранения культур сохраняли антагонистическую активность по отношению к фитопатогенам. Штаммы микроскопического гриба *Aspergillus terreus* 455 и 482 обладали антагонистической активностью только к *Verticillium dahliae*. При этом отмечено, что по сравнению с периодическими пересевами в результате хранения различными методами антагонистическая активность снизилась.

Установлено, что штаммы *Aspergillus niger* 606 и 607 и *Trichoderma harzianum* 445 при хранении в стерильной почве и песке сохраняют антагонистическую активность по отношению к изученным фитопатогенам на хорошем уровне. Однако, при хранении под слоем минерального масла активность культур снижалась на 2-5 мм. При хранении в лиофильно высушенном состоянии все исследованные культуры сохраняли достаточно высокую антагонистическую активность, тем не менее, по сравнению с периодическими пересевами активность была меньше на 1-5 мм.

Изучение влияния условий хранения грибов-антагонистов фитопатогенов показало пригодность различных методов хранения для обеспечения сохранности жизнеспособности культур. При этом отмечено, что хранение методом регулярных пересевов позволяет сохранить их антагонистическую активность на высоком уровне. Однако, данный метод является достаточно затратным с точки зрения финансовых затрат. Достойной альтернативой ему можно рассматривать все изученные методы хранения, но оптимальный метод следует выбрать исходя из индивидуальных особенностей той или иной культуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение влияния различных факторов на сохранение жизнеспособности и активностей микроорганизмов-продуцентов физиологически активных соединений при длительном хранении представляет значительный интерес с точки зрения их практического использования в качестве продуцентов и основы биотехнологий для применения в различных отраслях народного хозяйства.

Институт микробиологии АН РУз

Поступила
21 октября 2017 года

Л и т е р а т у р а

1. Erko Stackebrandt, Milena Wozniczka, Vera Weihs, Johannes Sikorski. *Connections between Collections //DSMZ*. 7B, 38124 Braunschweig, ISBN 978-3-00-022417-1 Germany 2007.

2. Голованова Т.И., Литовка Ю.А., Долинская Е.В., Сичкарук Е.А., Валиулина А.Ф., Схладзе О.Л. *Взаимоотношения пшеницы с микроорганизмами прикорневой зоны растений // Вестник КрасГАУ, Красноярск, 2010, т. 9, с. 90-97.*

3. Н.К.Бекмухамедова, М.С.Бахтиерова. *Антагонистическая и ростстимулирующая способность микроорганизмов, выделенных из ризосферы сельскохозяйственных растений //Труды Института микробиологии Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку 2013, Том 11, № 1, С408-412*

4. Голованова Т.И., Долинская Е.В., Сичкарук Е.А. *Взаимоотношения почвенного гриба Trichoderma и яровой пшеницы // Вестник КрасГАУ, Красноярск, 2009, т. 7. с. 102-107.*

5. Кацы Е.И. *Молекулярная генетика ассоциативного взаимодействия бактерий и растений: состояние и перспективы исследований // М.: Изд. Наука, 2007, 127 с.*

6. Berg G. *Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture // Appl. Microbiol. Biotechnol., 2009, v. 84, p. 11-18.*

7. Воронин А.М. *Ризосферные бактерии рода Pseudomonas, способствующие росту и развитию растений // Соросовский образ. журн., 1998, т. 35, № 10, с. 25-32.*

8. Бахтиерова М.С., Бекмухамедова Н.К. *Подбор условий хранения коллекционных культур микроскопических грибов. // ДАН РУз, № 5. 2014. С. 58-61.*

9. Егоров Н.С. *Руководство к практическим занятиям по микробиологии // М.: Изд. МГУ, 1995, 205 с.*

10. Егоров Н.С. *Основы учения об антибиотиках // М.: Изд. МГУ, 2003, 104 с.*

М.С.БАХТИЁРОВА, Н.К.БЕКМУХАМЕДОВА, Ж.Ж.ТАШПУЛАТОВ, М.С.МАМИЕВ

Турли усулларда сақланган микромицетларнинг антагонистик хусусиятлари турғунлиги

Илмий-амалий адабиётларда турли усулларда кўп йиллар мобайнида сақланган микроорганизмлар хусусиятларининг сақланиб қолиши ҳақида жуда кўп нашрлар мавжуд. ЎЗР ФА Микробиология институтининг саноат учун муҳим микроорганизмлар тўпламида 100 дан ортиқ турли фитопатогенларга қарши, антагонистик хусусиятга эга бўлган микроскопик замбуруғлар сақланади.

Саноат учун муҳим *Aspergillus terreus* 455, 482, *Aspergillus niger* 606, 607 ва *Trichoderma harzianum* 445 авлодига мансуб микроскопик замбуруғ штамларининг антагонистик фаоллиги 4 йил давомида турли усулларда сақланганидан сўнг текшириб кўрилди. Тест культуралар сифатида ғўзада вертицилийоз (*Verticillium dahliae*) ва фузариоз (*Fusarium oxysporum*) вилт касаллигини қўзғатувчиларидан фойдаланилди. Натижаларга кўра, ўрганилган барча микромицет штамлари турли усулларда сақланганда текширилган фитопатогенларга нисбатан антагонистик фаоллигини сақлаб қолди.

M.S.BAKHTIYOROVA, N.K.BEKMUKHAMEDOVA, J.J.TASHPULATOV, M.S.MAMIEV

Preservation of antagonistic capability of micromycetes at storage by different methods

There are many publications available devoted to study of preservation of microorganisms' properties during storage by different methods. In the collection of industrially important cultures of microorganisms of the Institute of Microbiology over 100 strains of microscopic fungi are preserved, which possess antagonistic capacity towards different phytopathogens. The antagonistic activity of industrially important strains of micromycetes *Aspergillus terreus* 455 and 482, *Aspergillus niger* 606 and 607 and *Trichoderma harzianum* 445 was studied at storage by the different methods for 4 years. Microscopic fungi-agents of Verticillium (*Verticillium dahliae*) and Fusarium (*Fusarium oxysporum*) wilt of cotton were used as test-cultures. Results of study revealed that all studied strains of micromycetes-antagonists in all tested methods of storage preserved antagonistic activity towards phytopathogens.
