



ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

В Е С Т Н И К
ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2020 ТОМ **103** ВЫПУСК **4**
VOLUME ISSUE



ВЛИЯНИЕ ХИТИНА НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS*

И.Л. Краснобаева, Н.М. Коваленко*, Э.В. Попова

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

* ответственный за переписку, e-mail: nadyakov@mail.ru

Цель работы состояла в оценке влияния различных форм хитина и хитозана при глубинном культивировании штаммов *Bacillus subtilis*, составляющих основу лабораторного образца Витаплан, КЖ, на синтез хитиназы, а также на антагонистическую активность и индуцирующий эффект штаммов *B. subtilis* на примере патосистем: пшеница - *Cochliobolus sativus* и *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. Включение в среду для глубинного культивирования бактерий хитина в форме сухого порошка или хитина и хитозана в виде коллоидной суспензии показало, что только коллоидный хитин повышал антагонистическую активность штаммов *B. subtilis* в отношении тест-культур – *Alternaria solani*, *Clavibacter michiganensis*. Экспериментально обнаружена способность штаммов *B. subtilis* синтезировать внеклеточную хитиназу, при культивировании в среде, содержащий коллоидный хитин. Выявлен более высокий фунгистатический эффект лабораторного образца Витаплан КЖ + коллоидный хитин по отношению к *Cochliobolus sativus* по сравнению с исходным образцом. Показано, что лабораторный образец Витаплан, КЖ+ коллоидный хитин в 1.5–2.0 раза эффективнее повышает устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости и бурой ржавчине, чем Витаплан, КЖ. В результате проведенных исследований получен лабораторный образец Витаплан, КЖ + коллоидный хитин с повышенной антагонистической и индуцирующей активностью по сравнению с исходной формой- Витаплан, КЖ.

Ключевые слова: лабораторный образец Витаплан, антибактериальная активность, фунгистатический эффект, коллоидный хитин, *Cochliobolus sativus*, индуцированная устойчивость

Поступила в редакцию: 23.04.2020

Принята к печати: 29.11.2020

Разработка новых экологизированных технологий защиты сельскохозяйственных культур от вредных организмов – одно из самых перспективных направлений современной сельскохозяйственной науки. Исследователи всего мира уделяют все больше внимания этому направлению, создавая методы защиты растений, которые альтернативны химическим и безопасны для окружающей среды, нетоксичны для людей и животных (Максимов др., 2011, Zalila-Kolsi et al., 2016). Этим требованиям отвечают микробиологические препараты, являющиеся основным элементом современных технологий фитосанитарной оптимизации агроценозов. Принцип действия таких биопрепаратов отличается от классических химических средств защиты растений и основан на регуляции численности фитопатогенов.

В нашей стране широко известен биопрепарат Витаплан, КЖ созданный в ВИЗР на основе высокоактивных штаммов *Bacillus subtilis* (ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D) с широким спектром активности, который используется для защиты сельскохозяйственных культур от грибных и бактериальных болезней (Новикова и др., 2011, 2013, 2017). Защитное действие препаратов на основе *B. subtilis* обусловлено комплексом взаимодействий, например, антибиозом, лизисом клеток патогенных грибов, запуском системной индуцированной устойчивости (СИУ) и системной приобретенной устойчивости (СПУ), а также конкуренцией с патогенной микрофлорой за пространство для колонизации и за питательные вещества (Максимов и др., 2015; Новикова и др., 2011; Wang et al., 2015; Cao Y et al., 2012).

Считается, что антагонизм бактерий рода *Bacillus* ко многим фитопатогенным грибам обусловлен, в первую очередь, синтезом соединений антибиотической природы

(Сидорова и др., 2018; Wang et al., 2015, 2018). Доказано также, что в разрушении клеточной стенки мицелиальных грибов участвует комплекс гидролитических ферментов, продуцируемых антагонистами, в том числе хитинолитических (Актуганов и др., 2003, 2008; Широков и др., 2003). Хитинолитическая активность зачастую рассматривается как один из важнейших критериев, определяющий антагонистические свойства бактерий, и как признак, коррелирующий с их миколитической активностью и способностью утилизировать биомассу грибов (Актуганов и др., 2007). Среди внеклеточных гидролаз, способных разрушать структурные полисахариды клеточной стенки и лизировать гифы грибов, наибольший интерес представляют хитиназы (Широков, 2003; Журавлева и др., 2004). В большинстве случаев хитиназы являются индуцибельными ферментами, образующимися в присутствии специфического субстрата.

В этой связи для усиления биологической активности лабораторного образца Витаплан, КЖ целесообразным представляется включение в среду для культивирования соединений, способствующих индукции хитиназ, в частности, хитин и хитинсодержащие субстраты.

С другой стороны, известно, что хитин, хитозан и их олигомеры считаются мощными элиситорами иммунитета растений (Yin et al., 2013; Deermala et al., 2014). Эти природные полисахариды в последнее время активно используются для улучшения биологической активности биопрепаратов, так как предполагается, что хитин и хитозан могут индуцировать (отдельно или в комбинации с бактериальными клетками) системную устойчивость к фитопатогенам. Это нашло подтверждение в ряде работ, в которых было установлено, что добавление хитозана к микробам-антагонистам повышало эффективность

биоагентов в защите овощных культур и клубники от мучнистой росы (Abdel-Kader et al., 2012), а добавление хитина к штаммам *Bacillus* значительно сокращало увядание растений хлопка (Rajendran et al., 2008).

Цель работы состояла в оценке влияния различных форм хитина и хитозана при добавлении их в стандартную

среду для глубинного культивирования штаммов *B. subtilis*, входящих в состав лабораторного образца Витаплан, КЖ, на синтез хитиназы, а также на антагонистическую и индуцирующую активность биопрепарата на примере патосистем пшеница *Cochliobolus sativus* и *Puccinia recondita*.

Материал и методы

В экспериментах использовали штаммы фитопатогенных микроорганизмов (*Alternaria solani* Sorauer, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Smith) Davis et al (штамм101)), *Cochliobolus sativus* (S. Ito & Kurib.) Drechler ex Dastur, *Puccinia recondita* Roberge ex Desmaz f. sp. *tritici*), а также штаммы микробов-антагонистов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D из «Государственной коллекции микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей» Центра коллективного пользования научным оборудованием «Инновационные технологии защиты растений» ВИЗР. Возбудители темно-бурой пятнистости (St-19) и бурой ржавчины (Lr-19), получены из растений пшеницы сорта Галина в Ленинградской области, находящиеся в рабочей коллекции лаборатории ВИЗР.

Лабораторный образец, названный нами, Витаплан, КЖ, представляет собой культуральную жидкость высокоактивных штаммов *Bacillus subtilis* (*B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D), полученных методом глубинного культивирования при соотношении 1:1 с титром жизнеспособных клеток *B. subtilis* 10^{10} КОЕ/мл. Для глубинного культивирования штаммов *B. subtilis* использовали кукурузно-мелассовую среду оптимизированного состава (кукурузный экстракт – 30г/л; меласса – 15г/л (рН=7.8). В состав культуральной жидкости входят споры штаммов-продуцентов, остатки питательной среды и метаболиты, выделенные в среду микроорганизмами в процессе ферментации.

Поскольку синтез хитиназ индуцируется только специфическими индукторами, такими как хитин и хитин-содержащие субстраты, то в стандартную среду для глубинного культивирования включали хитин с молекулярной массой 100 кДа («Биопрогресс», РФ) в виде сухого порошка и коллоидной суспензии. Получение коллоидного хитина проводили по методу Roberts and Selitrennikoff (1988). Хитозан с молекулярной массой 60 кДа и степенью деацетиляции 85% был получен методом окислительной деструкции (Muzzarelli, 1977) из хитозана с молекулярной массой 150 кДа («Биопрогресс», РФ). Коллоидный хитозан получали по модифицированному нами методу Ильиной и Варламова (2004), путем осаждения растворенного в водном 2.5% растворе молочной кислоты хитозана (ММ 60 кДа) раствором гидроксида натрия (1.5%) до доведения рН=8.

Для получения различных вариантов лабораторных образцов в исходную кукурузно-мелассовую среду вносили испытуемые вещества в соответствующей концентрации. Затем колбы с питательной средой стерилизовали, остужали и засеивали 5-ти суточной культурой штаммов *B. subtilis*. Время культивирования – 3-е суток на орбитальной качалке (180 оборотов/мин) при $T = 27-28^{\circ}\text{C}$. Варианты при культивировании штаммов в среде с добавлением хитина и других компонентов названы лабораторными образцами.

Варианты лабораторных образцов Витаплан, КЖ:

1. Контроль – лабораторный образец Витаплан, КЖ – культуральная жидкость двух штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D в соотношении 1:1 (титр жизнеспособных клеток 10^{10} КОЕ/мл).

2. Лабораторный образец Витаплан, КЖ + хитин. Сухой хитин вводили в состав питательной среды при культивировании штаммов в концентрации 1.0%.

3. Лабораторный образец Витаплан, КЖ + коллоидный хитин. Коллоидный хитин вводили в состав питательной среды для культивирования штаммов в концентрации 1.0% (из расчета на сухой вес хитина).

4. Лабораторный образец Витаплан, КЖ + коллоидный хитозан. Коллоидный хитозан вводили в состав питательной среды для культивирования штаммов в концентрации 1.0% (из расчета на сухой вес хитозана).

Титр жизнеспособных клеток определяли стандартным методом серийных разведений с последующим высевом на агаризованную среду СПА и подсчетом количества выросших колоний (КОЕ/мл).

Для лабораторных опытов *in vitro* использовали следующие агаризованные питательные среды (Билай, 1982): синтетическая среда Чапека: NaNO_3 – 2г, KH_2PO_4 – 1г, MgSO_4 – 0.5г, KCl – 0.5г, FeSO_4 – 0.01г, сахароза – 20г, агар-агар – 20г, вода – 1л (Биокомпас-С); сухой питательный агар (СПА) на основе гидролизата рыбной муки (НПО «Микроген»).

Оценку способности штаммов *B. subtilis* биопрепарата Витаплан к синтезу внеклеточных хитиназ проводили чашечным экспресс-методом (Rasul et al., 2015, Adhikari et al., 2017). Для выявления хитиназной активности использовали агаризованную среду Чапека, куда добавляли коллоидный хитин (1.0%). Активность хитиназы оценивали по величине зон просветления вокруг лунок, куда при помощи стерильной пипетки вносили культуральную жидкость (0.2 мл) полученных образцов и выражали в условных единицах в виде диаметра зон гидролиза непрозрачного субстрата (коллоидного хитина) в мм.

Оценку антибактериальной активности образцов по отношению к возбудителю бактериального рака томатов *S. michiganensis* (штамм 101) и антигрибной активности по отношению к возбудителю альтернариоза томата *A. solani* проводили методом бумажных дисков по диаметру зоны лизиса тест-культур фитопатогенов на агаризованной питательной среде (Билай, 1982). Для этого поверхность агаризованных сред в чашках Петри засеивали сплошным газоном суспензией тест-культуры с титром 10^5 КОЕ/мл, а затем на поверхность агара помещали стерильные бумажные фильтры диаметром 8 мм, на которые пипеткой наносили суспензию (0.1 мл) лабораторного образца с титром бактериальных клеток 10^{10} КОЕ/мл. Выращивание тест-культур проводили в термостате при $22-25^{\circ}\text{C}$ в течение 3–5 суток.

Изучение прямого фунгистатического действия исследуемых образцов проводили *in vitro* методом агаровых блоков (Билай, 1982). В стерильные чашки Петри разливали охлажденную до 40 °С агаризованную среду Чапека. После застывания на поверхность среды равномерно наносили суспензии испытуемых образцов (0.2 мл), а затем помещали блоки 10 суточного микромицета *C. sativus* диаметром 6 мм. В качестве контроля служили чашки с агаризованной средой Чапека с блоками тест-культуры без испытуемых образцов. Чашки инкубировали в темноте при 25 °С. Диаметры колоний гриба измеряли на 3-е, 5-е, 7-е сутки совместного культивирования, после чего оценивали фунгистатическое действие испытуемых образцов по формуле Эббота:

$$П = \frac{Дк-Доп}{Дк} \times 100,$$

где П – подавление роста гриба по сравнению с контролем, %;

Дк – диаметр колонии гриба в контроле, мм;

Доп – диаметр колонии гриба в опыте, мм.

Повторность опыта 3-х кратная.

Опыты по оценке индуцирующей активности образцов проводили методом отделенных листьев (Михайлова, 2012). Для оценки индуцирующей активности 7-дневные проростки пшеницы сорта Саратовская 29 опрыскивали исследуемыми растворами лабораторных образцов за 24 ч до инокуляции патогеном. Для опрыскивания растений культуральную жидкость Витаплан, КЖ, и Витаплана, КЖ

+ коллоидный хитин разводили дистиллированной водой в 10 раз (титр рабочего раствора составил 10⁹ КОЕ/мл). В контрольных вариантах растения пшеницы обрабатывали водой и 0.1 % коллоидным хитином.

Заражение листьев пшеницы проводили суспензией спор (4000 спор/мл) гемибиотрофа *C. sativus* и суспензией пустул биотрофа *P. recondita* (4000 пустул/мл). Интенсивность развития болезни листьев пшеницы оценивали при инокуляции *C. sativus* на 4-е сутки после заражения, а при инокуляции *P. recondita* на 7-е сутки после заражения по степени поражения площади листа. Все опыты проводили в 3-кратной повторности, полученные данные обрабатывали с использованием методов описательной статистики (на основе стандартных ошибок средних \pm SEM, 95 % доверительных интервалов и t-критерия Стьюдента).

Статическая обработка

Все опыты проводили в 3-кратной повторности, полученные данные обрабатывали с использованием методов описательной статистики (на основе стандартных ошибок средних \pm SEM, 95 % доверительных интервалов и t-критерия Стьюдента). В табл. 2 приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам. Уровень различий между средними значениями в табл. 1 и 3 определяли по критерию наименьшей существенной разницы (НСР) при $p < 0.05$.

Результаты

Включение хитина и хитозана в среду при глубинном культивировании штаммов *B. subtilis* не оказало влияния на концентрацию клеток бактерий; титр клеток штаммов во всех вариантах опыта был одинаковым (табл. 1). Антагонистическая активность испытуемых образцов №1 и №3

в отношении фитопатогенных организмов была на уровне контроля. Введение в среду при глубинном культивировании штаммов *B. subtilis* коллоидного хитина повышало антагонистическую активность образца №2 в отношении обеих тест-культур – *A. solani*, *C. michiganensis* (табл. 1).

Таблица 1. Влияние коллоидного хитозана, сухого и коллоидного хитина при глубинном культивировании штаммов (*B. subtilis* ВКМ В-2604D) и (*B. subtilis* ВКМ В-2605D) в стандартной питательной среде на число клеток и его антагонистическую активность

Table 1. Influence of colloidal chitosan, dry and colloidal chitin during submerged cultivation of strains (*B. subtilis* VKM В-2604D) and (*B. subtilis* VKM В-2605D) of laboratory sample Vitaplan, CL in a standard nutrient medium on the number of cells and its antagonistic activity

Вариант опыта, лабораторные образцы	Титр штамма-продуцента, КОЕ/мл	*Диаметр зоны отсутствия роста, мм	
		<i>A. solani</i> , 5 сутки	<i>C. michiganensis</i> 101, 2 сутки
Витаплан, КЖ (контроль)	10 ¹⁰	40.3±0.2	31.9±0.2
1. Витаплан, КЖ + 1 % сухой хитин	10 ¹⁰	37.8±0.2	31.9±0.2
2. Витаплан, КЖ + 1 % коллоидный хитин	10 ¹⁰	43.6±0.2	34.8±0.1
3. Витаплан, КЖ + 1 % коллоидный хитозан	10 ¹⁰	36.0±0.15	31.6±0.1
НСР _{0.05}		1.1	0.9

* Д – среднее из трех значений

Таким образом, экспериментально показано, что лабораторный образец Витаплан, КЖ + коллоидный хитин обладает повышенной антагонистической активностью по отношению к тест объектам – *A. solani*, *C. michiganensis* (штамм 101).

Сравнительная оценка способности штаммов-продуцентов *B. subtilis* биопрепарата Витаплан к синтезу внеклеточных хитиназ показала, что штаммы *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D, составляющие основу лабораторных образцов Витаплан, КЖ, не обладают конститутивным синтезом внеклеточной хитиназы. Из всех

вариантов опыта только при глубинном культивировании в среде, содержащей коллоидный хитин, была обнаружена способность этих штаммов к синтезу индуцибельной хитиназы, активность которой на 8 сутки опыта составила 34±0.5 мм (диаметр зоны просветления на агаризованной среде вследствие расщепления коллоидного хитина).

На данном этапе исследований нашей задачей был подбор для включения в состав оптимальной для глубинного культивирования бактерии *B. subtilis* среды, той формы полисахарида, которая позволит штамму-антагонисту синтезировать индуцибельную хитиназу и продемонстрировать

повышенную антагонистическую активность по сравнению с исходным образцом.

На основании этих критериев был отобран лабораторный образец Витаплан, КЖ+ коллоидный хитин, как наиболее перспективный для изучения антигрибной активности по отношению к микромицету *C. sativus* и способности индуцировать устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости и бурой ржавчине.

Таблица 2. Влияние различных лабораторных образцов Витаплана КЖ на линейный рост гриба *Cochliobolus sativus*
Table 2. Influence of laboratory sample Vitaplan, CL formulation on the mycelial growth of *Cochliobolus sativus*

Вариант опыта, лабораторный образец	Титр, КОЕ/мл	Ингибирование линейного роста мицелия гриба <i>C.sativus</i> , %			
		5-сутки		7-сутки	
		*Д мм	% ингибирования	*Д мм	% ингибирования
Контроль	–	52.5± 0.5	–	80.0± 1.2	–
Витаплан, КЖ	10 ¹⁰	13.5±0.5	74.3	15.0±1.2	81.2
Витаплан, КЖ + коллоидный хитин 1 %	10 ¹⁰	8.0±0.2	84.9	9.5±1.0	88.1

* Д – среднее из трех значений.

Более высокий фунгистатический эффект лабораторного образца Витаплан КЖ + коллоидный хитин по сравнению с исходным, по всей видимости, является результатом совместного действия антибиотических веществ штаммов *B. subtilis* и способности индуцибельной хитиназы, лизировать клеточные стенки микромицета *C. sativus*. Полученные результаты согласуются с исследованиями Акутанова и др. (2007, 2008), которые продемонстрировали способность миколитических ферментов штаммов *Bacillus* и именно хитиназы, лизировать клеточные стенки микромицета *C. sativus*.

Таблица 3. Влияние различных лабораторных образцов Витаплана, КЖ на устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости и бурой ржавчине, (метод отделенных листьев, сорт Саратовская 29)

Table 3. Effect of spraying Vitaplan, CL formulation on wheat resistance to *Puccinia recondita* and *Cochliobolus sativus*

Вариант опыта, лабораторный образец	Титр штаммов продуцентов, КОЕ/мл	Поражение листьев, %	
		Темно-бурая пятнистость, НСР _{0.05} =4.5	Бурая ржавчина, НСР _{0.05} =9.0
Контроль (вода)	–	65	90
Коллоидный хитин 0.1 %	–	65	90
Витаплан, КЖ	10 ⁹	50	80
Витаплан, КЖ+ коллоидный хитин 1 %	10 ⁹	40	70

В контрольных растениях пшеницы, инфицированных *C. sativus*, площадь поражения листьев составила 65%. Предварительная обработка растений пшеницы лабораторным образцом Витаплан, КЖ с последующим заражением возбудителем темно-бурой пятнистости *C. sativus*, снизила площадь поражения листьев на 15% по отношению к контролю. Опрыскивание растений пшеницы лабораторным образцом Витаплана, КЖ + коллоидный хитин сократило пораженность листьев на 25% по отношению к контролю, что свидетельствует о более высокой индуцирующей активности этого образца по сравнению с исходным. В опыте с заражением пшеницы бурой ржавчиной предобработка растений Витапланом, КЖ уменьшила

пораженность листьев на 10% по отношению к контролю, в то время как лабораторный образец Витаплан, КЖ + коллоидный хитин, показал более высокий индуцирующий эффект, снизив площадь поражения листьев на 20%.

Коллоидный хитин (0.1%) не повлиял на интенсивность развития болезней. Хитин – нейтрально заряженный линейный полимер, цепь которого состоит из N-ацетил гликопиранозных звеньев. Хитин не растворим в воде и коллоидная суспензия полимера имеет низкую биологическую активность, так как для ее проявления необходимо определенное соотношение ацетильных и аминных групп в молекуле (Тюттерев, 2014).

Обсуждение

В плане обсуждения механизмов, лежащих в основе взаимоотношений в патосистемах пшеница – *C. sativus* и *P. recondita*, можно говорить, как о прямом биоцидном воздействии бактерий рода *Bacillus* на микромицеты, так и об их способности усиливать системную устойчивость

растений. Прямое биоцидное действие *B. subtilis* связывают с синтезом ими различных метаболитов с антибиотической активностью – антибиотиков, биосурфактантов, сидерофоров и др. (Cao et al.2012; Rezuanul et al.2012; Wang et al., 2015). В некоторых случаях снижение болезни

связано главным образом с антибиозом, как например, согласно исследованиям Romero et al (2007) итурин и фенгидин играют основную роль в антагонизме *B. subtilis* по отношению к грибу *Podosphaera fusca*, вызывающего мучнистую росу тыквенных.

Согласно исследованиям Шенина и др., (1995) и Новиковой и др. (2011) высокая биологическая эффективность биопрепаратов обусловлена синтезом штаммами *B. subtilis* метаболитного комплекса сложного состава, включающего пептидные и полиеновые антибиотики. Следовательно, экспериментально установленная высокая фунгистатическая активность образца Витаплан, КЖ по отношению к *C. sativus* (81.2%) (табл.2), по-видимому, определяется синтезом штаммами *B. subtilis* антибиотических веществ, подавляющих или замедляющих рост фитопатогена. Повышенная фунгистатическая активность образца Витаплан, КЖ + коллоидный хитин по отношению к *C. sativus* (88.1%), по всей видимости, является результатом совместного действия метаболитного комплекса штаммов *B. subtilis* и хитиназы, синтезируемой ими (табл. 2).

Помимо прямого антагонистического действия на клетки возбудителя, бактерии способны повышать болезнестойкость растений синтезируя соединения – элиситоры, благодаря которым происходит активация системной индуцированной устойчивости (СИУ) и системной приобретенной устойчивости (СПУ) (Ongena et al., 2007; Ahn et al., 2002). Элиситорами, запускающими защитный механизм растения, могут быть белки, липопептиды, полисахариды и другие соединения, ассоциированные с клеточной стенкой бактерии *B. subtilis* (Van der Ent S et al., 2009; Van Loon et al., 2007; De Vleeschauwer D., Höfte M., 2009), а также антибиотики и биосурфактанты (Ongena et al., 2007, 2010; Falardeau et al., 2013). Бактериальные метаболиты, обладающие свойствами индукторов устойчивости, включают цепочку взаимосвязанных друг с другом защитных реакций, в том числе образование активных форм кислорода, фосфорилирование белков, запуск базовых механизмов фитоиммунитета, которые приводят к развитию системной устойчивости (Максимов и др., 2014, 2015; Pieterse et al., 2014; Veselova et al. 2014). Так, Park et al., (2007) на примере пяти штаммов *Bacillus* показали, что снижение развития ризоктониоза у томатов происходит не из-за прямого антагонизма, а в результате активации генов устойчивости растения-хозяина.

Индуктирующая активность исходного образца Витаплан, КЖ проявилась в понижении пораженности листьев пшеницы *C. sativus* и *P. recondita* на 15–10% (соответственно) по отношению к контролю (табл. 3). Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе

данными. Так, по мнению Kriuchkova (2017) снижение развития болезни в результате опрыскивания листьев ячменя фильтратом культуральной жидкости штамма *B. amyloliquefaciens* перед инокуляцией *C. sativus*, обусловлено запуском индуцированной устойчивости. По данным Максимова и др. (2015), штамм *B. subtilis* 26Д индуцировал системную устойчивость растений пшеницы инфицированных гембиотрофным грибом *Septoria nodorum*. В своей работе Jasem et al (2018) выявили несколько бактериальных штаммов, в основном относящихся к *Bacillus* spp., которые эффективно подавляли развитие офиоблеза при опрыскивании всходов пшеницы до инокуляции патогеном, причем индукция защитных реакций растений была основным механизмом подавления развития болезни.

По нашему мнению, обнаруженная у образца Витаплан, КЖ + коллоидный хитин более высокая способность индуцировать устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости и бурой ржавчине по сравнению с исходным, обусловлена хитоолигосахаридами, образующимися при гидролизе коллоидного хитина хитиназами бактерии (San-Lang et al., 2006). Известно, что хитоолигосахариды являются эффективными элиситорами индуцированной устойчивости в растениях (Yin et al., 2013; Deermala et al, 2014). В результате их взаимодействия с рецепторами происходит активация комплекса защитных реакций неспецифического иммунитета растений. Механизм индуцирующего действия хитоолигосахаридов включает активацию генов защитных белков, в том числе растительной хитиназы (Kavitha et al., 2012), усиление генерации активных форм кислорода, прежде всего H_2O_2 , которая, в свою очередь, может также выполнять сигнальную функцию, активируя гены белков через редокс-контроль транскрипционных факторов или с помощью взаимодействия с другими сигнальными компонентами (Togges, 2010; Sewelam et al., 2013).

Полученные нами данные согласуются с работами, утверждающими, что добавление хитина при культивировании штаммов *Bacillus* позволяет увеличить их эффективность; например, в защите хлопка от ризоктониозного увядания (Rajendran, 2008), гороха от фузариозного увядания, а арахиса от микромицета *A. niger* (Manjula, Podile, 2001).

Таким образом, в результате проведенных исследований получен лабораторный образец Витаплан, КЖ + коллоидный хитин с повышенной биоцидной и индуцирующей активностью по сравнению с исходной формой Витаплан, КЖ.

Библиографический список (References)

- Акуганов ГЭ, Мелентьев АИ, Кузьмина ЛЮ, Галимзянова НФ и др. (2003) Хитинолитическая активность бактерий *Bacillus* Cohn - антагонистов фитопатогенных грибов. *Микробиология* 72(3):356–360
- Акуганов ГЭ, Галимзянова НФ, Мелентьев АИ, Кузьмина Л.Ю (2007) Внеклеточные гидролазы штамма *Basillus* sp. 739 и их участие в лизисе клеточных стенок микромицетов. *Микробиология* 76:471–479
- Акуганов ГЭ, Галимзянова НФ, Мелентьев АИ, Широков АВ (2008) Исследование миколитических свойств аэробных спорообразующих бактерий - продуцентов внеклеточных хитиназ. *Микробиология* 77(6):788–797
- Андреева ЕИ, ред (1990) Методические рекомендации по испытанию химических веществ на фунгицидную активность. Черкассы: НИИТЭХИМ. 67 с.
- Билай ВИ, ред (1982) Методы экспериментальной микологии. К.: Наукова думка. 275 с.
- Журавлева НВ, Лукьянов ПА (2004) Хитинолитические ферменты: источники, характеристика и применение в биотехнологии. *Вестник ДВО РАН* (3):76–86

- Ильина А.В., Варламов В.П. (2004) Гидролиз хитозана в молочной кислоте. *Прикладная биохимия и микробиология* 40(3):354–358
- Максимов ИВ, Абизгильдина РР, Пусенкова ЛИ (2011) Стимулирующие рост растений микроорганизмы как альтернатива химическим средствам защиты от патогенов. *Прикладная биохимия и микробиология* 47(4):373–385
- Максимов ИВ, Абизгильдина РР, Сорокань АВ, Бурханова ГФ (2014) Регуляция пероксидазной активности под влиянием сигнальных молекул и *Bacillus subtilis* 26Д инфицированных *Phytophthora infestans* растениях картофеля. *Прикладная биохимия и микробиология* 50(2):197–202
- Максимов ИВ, Веселова СВ, Нужная ТВ, Сарварова ЕР и др. (2015) Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам. *Физиология растений* 62(6):763–775
- Михайлова ЛА, Мироненко НВ, Коваленко НМ (2012) Желтая пятнистость пшеницы. Методические указания по изучению популяций возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis* и устойчивости сортов. СПб: ВИЗР. 56 с.
- Новикова ИИ, Шенин ЮД (2011) Выделение, идентификация и антигрибная активность метаболитов комплекса Гамаир, образуемого штаммом *Bacillus subtilis* М-22 – продуцентом биопрепарата для защиты растений от микозов и бактериозов. *Биотехнология* 47(98):45–58.
- Новикова ИИ, Бойкова ИВ, Павлюшин ВА, Зейрук ВН и др. (2013) Перспективы использования биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для защиты картофеля от болезней при хранении. *Вестник защиты растений* 4:12–21
- Новикова ИИ, Титова ЮА, Бойкова ИВ, Зейрук ВН и др. (2017) Биологическое обоснование оптимизации препаративных форм биопрепаратов на основе микробов антагонистов для контроля популяций фитопатогенных грибов и бактерий – возбудителей болезней растений. *Вестник защиты растений* 3(93):16–23
- Сидорова ТМ, Асатурова АМ, Хомяк АИ (2018) Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов (обзор). *Сельскохозяйственная биология* 53(1):29–37. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.1.29rus>
- Тютюрев СЛ (2014) Природные и синтетические индукторы устойчивости растений к болезням. СПб: ВИЗР. 212 с.
- Шенин ЮД, Новикова ИИ, Кругликова ЛФ, Калько ГВ (1995) Характеристика Алирина Б, основного компонента фунгицидного препарата, продуцируемого штаммом *Bacillus subtilis*-10-ВИЗР. *Антибиотики и химиотерапия* 40(5):3–7
- Широков АВ (2003) Хитинолитическая активность бактерий *Bacillus Cohn* – антагонистов фитопатогенных грибов. *Микробиология* 72(3):356–360.
- Abdel-Kader MM, El-Mougy NS, Aly MD, Lashin SM (2012) Integration of biological and fungicidal alternatives for controlling foliar diseases of vegetables under greenhouse conditions. *Int J Agric Forestry* 2(2): 8–48 <https://doi.org/10.5923/j.ijaf.20120202.07>
- Adhikari M, Yadav DR, Kim SW, Um YH, Kim HS et al (2017) Biological control of bacterial fruit blotch of watermelon pathogen (*Acidovorax citrulli*) with rhizosphere associated bacteria. *Plant Pathol J* 33(2):170–183. <https://doi.org/10.5423/ppj.oa.09.2016.0187>
- Ahn I-P, Park K, Kim C-H. (2002) Rhizobacteria-induced resistance perturbs viral disease progress and triggers defense-related gene expression. *Mol Cells* 13 (2):302–308.
- Cao Y, Xu Z, Ling N, Yuan Y, Yang X et al (2012) Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. *Sci Hortic* 135:32–39. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.12.002>
- Deepmala K, Hemantaranjan A, Bharti S, Nishant Bhanu A (2014) A future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides. *Adv Plants Agric Res* 1(1):23–30. <https://doi.org/10.15406/apar.2014.01.00006>
- De Vleeschauwer D, Höfte M (2009). Rhizobacteria-induced systemic resistance. *Adv Bot Res* 51:223–281
- Falardeau J, Wise C, Novitsky L, Avis TJ (2013) Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *J Chem Ecol* 39:869–878. <http://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
- Jasem AM, Sharii R, Abbasi S (2018) Induced systemic resistance to wheat take-all disease by probiotic bacteria. *J Plant Protect Res* 58 (3):304–310. <https://doi.org/10.24425/jppr.2018.124639>
- Kavitha K, Nakkeeran S, Chandrasekar G (2012) Rhizobacterial-mediated induction of defense enzymes to enhance the resistance of turmeric (*Curcuma longa* L.) to *Pythium aphanidermatum* causing rhizome rot. *Arch Phytopathol Plant Protect* 45:199–219.
- Kriuchkova LO (2017) Biological control of leaf disease of barley with *Bacillus* strain. *Biologija* 63(3):289–295.
- Manjula K, Podile A (2001) Chitin supplemented formulations improve biocontrol and plant growth promoting efficiency of *Bacillus subtilis* AF 1. *Can J Microbiol* 47(7):618–625.
- Muzzarelli RA (1977) Chitin. Oxford: Pergamon Press. 309 p.
- Ongena M, Adam A, Jordan E, Paquot M, Brans A et al (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol* 9:1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Ongena M, Henry G, Thonart P (2010) The role of cyclic lipopeptides in the biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. Recent Developments in Management of Plant Diseases (Plant Pathology in the 21st century). V. 1 / Eds. Gisi U., Chet L., Guillino M.L., Dordrecht, Heidelberg, London New York: Springer Science+Business Media B.V 1:59–69. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8804-9_5
- Park K, Diby P, Kim YK et al (2007) Induced systemic resistance by *Bacillus vallismortis* EXTN-1 suppressed bacterial wilt in tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Pathol J* 23(1):2225. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2007.23.1.022>
- Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, van Wees SC et al (2014) Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu Rev Phytopathol* 52:347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Rajendran L, Samiyappan R (2008) Endophytic *Bacillus* species confer increased resistance in cotton against damping off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathol J* 7(1):1–12. <https://doi.org/10.3923/ppj.2008.1.12>

- Rasul F, Afroz A, Rashid U, Mehmood S, Sughra K et al (2015) Screening and characterization of cellulase producing bacteria from soil and waste (molasses) of sugar industry. *Int J Biosci* 6(3):230–238. <https://doi.org/10.12692/ijb/6.3.230-238>
- Rezuhanul I, Yong T, Yong S, Chi H (2012) Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 40(1):59–66. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.059>
- Roberts W K, Selitrennikoff CP (1988) Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J Gen Microbiol* 134:169–176. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-1-169>
- Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, Dufour SE, Arrebola E et al (2007) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol Plant Microbe Interact* 20(4):430–40. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>
- San-Lang W, Tzu-Yin L, Yue-Horng Y, Hui-Fen L, Yu-Jen C (2006) Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydr Res* 341(15):2507–2515. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.06.027>
- Sewelam N, Kazan K, Thomas-Hall S.R., Kidd B.N., Manners J.M et al (2013) Ethylene response factor 6 is a regulator of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 8(8):e70289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070289>
- Torres MA (2010) ROS in biotic interactions. *Physiol. Plant.* 138(4):414–429. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x>
- Yin H, Li Y, Zhang HY, Wang WX, Lu H et al (2013) Chitosan Oligosaccharides–Triggered Innate Immunity Contributes to Oilseed Rape Resistance against *Sclerotinia Sclerotiorum*. *Int J Plant Sci* 174(4): 722–732. <https://doi.org/10.1086/669721>
- Zalila-Kolsi I, Ben Mahmoud A, Hacina A, Sellami S et al (2016) Antagonist effects of *Bacillus spp.* strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum L. subsp. durum*). *Microbiol Res* 192:148–158. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.012>
- Veselova SV, Nuzhnaya TV, Maksimov IV (2014) Role of jasmonic acid in interaction of plants with plant growth promoting rhizobacteria during fungal pathogenesis. In: Morrison L (ed) *Jasmonic acid* (Chapter: 3). New York: Nova Sci. Publ. 33–66
- Van der Ent S, van Wees S, Pieterse C (2009) Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70(13-14):1581–1588. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.06.009>
- Van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:243–254. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6776-1_2
- Wang T, Liang Y, Wu M, Chen Z et al (2015) Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese J Chem Eng* 23(4):744–754. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2014.05.020>
- Wang XQ, Zhao DL, Shen LL, Jing CL et al (2018) Application and mechanisms of *Bacillus subtilis* in biological control of plant disease. In: Meena VS (ed) *Role of rhizospheric microbes in soil*. Springer, Singapore. 225–250. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8402-7-9>

Translation of Russian References

- Aktuganov GE, Melentyev AI, Kuzmina LJ, Galimzyanova NF, et al (2003) Chitinolytic activity of bacteria *Bacillus Cohn*, antagonists of phytopathogenic fungi. *Mikrobiologiya* 72(3):356–360 (In Russian)
- Aktuganov GE, Galimzyanova NF, Melentyev AI, Kuzmina L.Yu (2007) Extracellular hydrolases of the strain *Bacillus sp.* 739 and their participation in the lysis of cell walls of micromycetes. *Mikrobiologiya* 76:471–479 (In Russian)
- Aktuganov GE, Galimzyanova NF, Melentyev AI, Shirokov AV (2008) Study of the mycolytic properties of aerobic spore-forming bacteria - producers of extracellular chitinases. *Mikrobiologiya* 77(6):788–797 (In Russian)
- Andreeva EI, ed (1990) Metodicheskie rekomendatsii po ispytaniyu khimicheskikh veshchestv na fungitsidnyuyu aktivnost [Guidelines for testing chemicals for fungicidal activity]. Cherkassy: NIITEKHIM 67p. (In Russian)
- Bilay VI, ed (1982) Metody eksperimentalnoy mikologii [Methods of experimental mycology]. Kiev: Naukova Dumka. 275 p (In Russian)
- Zhuravleva NV, Lukyanov PA (2004) Chitinolytic enzymes: sources, characteristics and applications in biotechnology. *Vestnik of FEB RAS* 3(76–86) (In Russian)
- Maksimov IV, Abizgildina PP, Pusenkova LI (2011) Plant growth-promoting microorganisms as an alternative to chemical means of protection against pathogens. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 47:73–385 (In Russian)
- Maksimov IV, Abizgildina RR, Sorokan AV, Burhanova GF (2014) Regulyaciya peroksidaznoj aktivnosti pod vliyaniem signalnykh molekul i *Bacillus subtilis* 26D inficirovannykh *Phytophthora infestans* rasteniyah kartofelya. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 50(2):197–202 (In Russian)
- Maksimov IV, Veselova SV, Nuzhny TV, Sarvarova EP et al (2015) Stimulating plant growth bacteria in the regulation of plant resistance to stress factors. *Fiziologiya rasteniy* 62(6):763–775 (In Russian)
- Mikhailova LA, Mironenko NV, Kovalenko NM (2012) Zheltaya pyatnistost pshenitsy. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu populyatsiy vzbuditelya zheltoy pyatnistosti *Pyrenophora tritici-repentis* i ustoychivosti sortov. [Yellow spot of wheat. Guidelines for the study of populations of the yellow spotted pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* and the resistance of varieties]. SPb: VIZR 56p (In Russian)
- Novikova II, Shenin YuD (2011) Isolation, identification and antifungal activity of metabolites of the Gamair complex, formed by the *Bacillus subtilis* M-22 strain, a producer of the biological agent for plant protection against mycoses and bacterioses. *Biotechnology* 47(98):45–58 (In Russian)
- Novikova II, Boykova IV, Pavlyushin VA, Zeyruk VN et al (2013) Prospects for the use of biological products based on antagonist microbes to protect potatoes from diseases during storage. *Bulletin of plant protection* 4:12–21 (In Russian)
- Novikova II, Titova YuA, Boykova I.V, Zeyruk VN et al (2017) Biological justification for the optimization of preparative forms of biological preparations based on antagonist microbes to control populations of phytopathogenic fungi

- and bacteria that cause plant diseases. *Bulletin of plant protection* 3:16–23 (In Russian)
- Sidorova TM, Asaturova AM, Homyak AI (2018) Biologically active metabolites of *Bacillus subtilis* and their role in the control of phytopathogenic microorganisms (review). *Agricultural biology* 53(1):29–37. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.1.29rus> (In Russian)
- Tyuterev SL (2014) Natural and synthetic inducers of plant disease resistance. SPb:VIZR 212 p. (In Russian)
- Shanin YuD, Novikova II, Kruglikova LF, Kalko GV (1995) Harakteristika Alirina B, osnovnogo komponenta fungicidnogo preparata, produciruemogo shtammom *Bacillus subtilis*-10-VIZR. *Antibiotiki i khimioterapiya* 40(5):3–7 (In Russian)
- Shirokov AB (2003) Chitinolytic activity of bacteria *Bacillus* Cohn – antagonists of pathogenic fungi. *Mikrobiologiya* 72(3):356–360 (In Russian)

Plant Protection News, 2020, 103(4), p. 233–240

OECD+WoS: 4.01+AM (Agronomy)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-4-13272>

THE EFFECT OF CHITIN ON THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF *BACILLUS SUBTILIS* STRAINS

I.L. Krasnobaeva, N.M. Kovalenko*, E.V. Popova

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

*corresponding author; e-mail: nadyakov@mail.ru

The aim of the work was to assess the effect of various forms of chitin and chitosan during submerged cultivation of *Bacillus subtilis* strains, which form the basis of the laboratory sample Vitaplan, CL, on the synthesis of chitinase, as well as on the antagonistic activity and inducing effect of *B. subtilis* strains in the pathosystems of wheat - *Cochliobolus sativus* and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. The inclusion of chitin in the form of dry powder or chitin and chitosan in the form of a colloidal suspension into the medium for deep cultivation of bacteria showed that only colloidal chitin increased the antagonistic activity of *B. subtilis* strains against test cultures of *Alternaria solani* and *Clavibacter michiganensis*. The ability of *B. subtilis* strains to synthesize extracellular chitinase when cultivated in a medium containing colloidal chitin was established. A higher fungistatic effect of the laboratory sample Vitaplan CL + colloidal chitin against *Cochliobolus sativus* was revealed as compared to the original sample. It was shown that the laboratory sample Vitaplan, CL + colloidal chitin increases the resistance of wheat to dark brown spot and brown rust 1.5–2.0 times more effectively as compared to Vitaplan, CL. As a result of the research, a laboratory sample of Vitaplan, CL + colloidal chitin was obtained with increased antagonistic and inducing activity as compared to Vitaplan, CL.

Keywords: biological control, Vitaplan, fungistatic activity, antagonistic effect, chitosan, chitin, induced resistance, *Triticum aestivum*, *Cochliobolus sativus*, *Puccinia recondita*

Received: 23.04.2020

Accepted: 29.11.2020