

АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ ПАТОГЕНОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР И ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКА ШТАММА *Streptomyces* sp. К-541, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМ КАЗАХСТАНА*

Л.П. ТРЕНОЖНИКОВА, А.С. БАЛГИМБАЕВА, Г.Д. УЛТАНБЕКОВА,
Р.Ш. ГАЛИМБАЕВА

Необходимое свойство биопрепаратов — сохранение биологической активности в изменяющихся природных условиях, в почвах разного физико-химического состава, с разной степенью плодородия и значениями pH. Актиномицеты из экстремальных мест обитания способны вырабатывать биологически активные вещества не только в нейтральных условиях, но также в соленой, щелочной и кислой среде, чем определяется их значимость в составе биопрепаратов, разрабатываемых для растениеводства. Нашей целью было исследование антагонистических свойств штамма *Streptomyces* sp. К-541, выделенного из экстремальных экосистем в Казахстане, против грибных патогенов зерновых культур в разных экологических условиях и групповая идентификация полученного антибиотика. Штамм К-541 выращивали в нейтральных и альтернативных условиях (25,0 г/л NaCl, pH 7,2; 2,5 г/л Na₂CO₃, pH 8,0). Антифунгальные свойства определяли методом агаровых блоков в отношении возбудителей основных грибных заболеваний пшеницы и риса: фузариоза — *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *F. oxysporum* Schlecht., *F. heterosporum* Nees, *F. sporotrichiella* Sherb., пирикулярриоза — *Piricularia oryzae* Cavara, альтернариоза — *Alternaria trititina* Prasada & Prabhu, *A. alternata* (Fr.) Keissl., биполяриоза — *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, аспергиллеза — *Aspergillus niger* van Tieghem. После культивирования штамма К-541 на трех вариантах глюкозо-дрожжевого агара вырезали блоки растущей культуры буром (диаметр 7 мм), переносили их на чашки Петри, предварительно засеянные тест-культурами фитопатогенных грибов, и культивировали при 25 °С. Об антагонистической активности судили по диаметру зоны лизиса грибных тест-культур, которую измеряли через 72 ч культивирования. Антифунгальные свойства штамма при совместном культивировании с фитопатогенными грибами исследовали на агаре Чапека-Докса (pH 7,0) при внесении 2,0 % NaCl (pH 7,0) и 0,2 % Na₂CO₃ (pH 8,0). Результаты учитывали на 10-е сут культивирования при 25 °С, измеряя диаметр колоний фитопатогенных грибов. Биосинтез антибиотика А-541 осуществляли на круговой качалке (180-200 об/мин) при температуре 28 °С в течение 120 ч. Антибиотик извлекали экстракцией органическими растворителями и изучали с использованием тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии. Проведенные исследования показали, что штамм К-541 может быть перспективным агентом для биоконтроля грибных инфекций у зерновых культур, так как обладает высокой антифунгальной активностью. В отношении грибов рода *Fusarium* она проявлялась формированием зоны лизиса диаметром 30-45 мм в нейтральных условиях, 40-48 мм — при засолении, 20-33 мм в щелочных условиях; в отношении грибов рода *Alternaria* — соответственно 32-35, 36-37, 20-22 мм; рода *Bipolaris* — 36-38, 38-40, 30 мм; рода *Piricularia* — 40, 56, 50 мм. Показана возможность использования штамма для интродукции в почвенные биоценозы с целью биоконтроля грибных патогенов зерновых культур. При совместном культивировании штамма К-541 и фитопатогенных грибов диаметр колоний грибов уменьшался в 1,8-2,7 раза. Высокая степень ингибирования роста фитопатогенных грибов наблюдалась также в условиях засоления и в щелочной среде. Антибиотик, образуемый штаммом К-541, отнесен к группе полиенов, подгруппе гексаенов. Таким образом, штамм К-541 признан перспективным для разработки нового биопрепарата с фунгицидным действием в отношении возбудителей грибных инфекций зерновых культур в разных экологических условиях.

Ключевые слова: экстремофильный стрептомицет, антибиотик, антифунгальная активность, фитопатогенные грибы, фузариоз, пирикулярриоз, альтернариоз, биполяриоз, аспергиллез, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. heterosporum*, *F. sporotrichiella*, *Piricularia oryzae*, *Alternaria trititina*, *A. alternata*, *Bipolaris sorokiniana*, *Aspergillus niger*, зерновые культуры.

В последнее время резко возросло распространение токсиногенных грибов — возбудителей болезней зерновых культур. Грибы, вызывающие фузариозы, пирикулярриозы, альтернариозы и аспергиллезы, приводят к потере более 40 % урожая зерновых (1). Поражая растения, микромицеты

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (проект № 0358/ГФ4).

наносят значительный экономический ущерб сельскому хозяйству и оказывают вредное воздействие на окружающую среду. Вместе с тем широкое использование химических средств для защиты растений от грибных заболеваний представляет особую опасность, причем негативное влияние фунгицидов со временем возрастает. Ситуация ухудшается из-за развития устойчивости грибов к фунгицидам с последующей необходимостью увеличения дозы применения препаратов. В системах интегрированной защиты растений особое место занимают биометоды, в частности использование микроорганизмов и их вторичных метаболитов для создания эффективных, экологически безопасных фунгицидов с разными механизмами действия, а также для повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам. При этом актуально выявление новых микроорганизмов, образующих соединения с широким спектром биологической активности, для поиска которых представляют интерес различные экосистемы, включая малоизученные экстремальные (2-4).

Актиномицеты — продуценты вторичных метаболитов с антибактериальными, антифунгальными, инсектицидными и другими свойствами (5-7). Они служат важным компонентом микробоценозов, а их количественный и качественный состав признан фактором, характеризующим экологическое состояние природных экосистем (8). Многие виды актиномицетов, в том числе принадлежащие к роду *Streptomyces*, известны как антимикотические агенты, которые ингибируют патогенные грибы (9-11). Способность актиномицетов колонизировать поверхность корней растений, осуществлять биосинтез антибиотиков и внеклеточных ферментов обеспечивает их высокую эффективность в качестве инструментов биоконтроля в системе защиты растений от заболеваний (12-14).

Зерновое хозяйство — основная отрасль растениеводства Казахстана, при этом на засоленные земли в республике приходится 15,2 % от всей площади сельскохозяйственных угодий. Остальные почвы также в разной степени засолены, неоднородны по составу и характеризуются низким содержанием гумуса (15). Разработка биопрепаратов для применения в таких сложных условиях должна основываться на использовании микроорганизмов, сохраняющих биологическую активность в разных экологических нишах. Засоления почвы и pH мешают проявлению защитного и стимулирующего действия микроорганизмов. Актиномицеты, выделенные из экстремальных мест обитания, могут расти и вырабатывать биологически активные вещества при засолении, в щелочной и кислой среде (16, 17). Несмотря на обилие информации о биологических свойствах актиномицетов, их способность регулировать рост патогенных микроорганизмов, в том числе фитопатогенных грибов, в условиях сильной засоленности, высоких и низких значений pH мало изучена (18, 19).

В настоящей работе мы впервые использовали биотехнологический потенциал экстремофильных актиномицетов для разработки антифунгального биопрепарата с универсальным действием.

Нашей целью было изучение антагонистических свойств штамма *Streptomyces* sp. К-541 в отношении грибов — возбудителей болезней зерновых культур в разных экологических условиях и групповая идентификация полученного антибиотика.

Методика. Объектом исследований был штамм *Streptomyces* sp. К-541, выделенный в экстремальной экосистеме (соровый солончак, Костанайская обл., Республика Казахстан). Штамм выращивали на трех вариантах глюкозо-дрожжевого агара. Состав питательных сред (г/л) был следу-

ющим: среда 1 — глюкоза (2,0), дрожжевой экстракт (1,0), пептон (2,0), агар (20,0), pH 7,2; среда 2 — глюкоза (2,0), дрожжевой экстракт (1,0), пептон (2,0), NaCl (25,0), агар (20,0), pH 7,2; среда 3 — глюкоза (2,0), дрожжевой экстракт (1,0), пептон (2,0), Na₂CO₃ (2,5), агар (20,0), pH 8,0. Значение pH изменяли 0,1 н. раствора NaOH, используя pH-метр MP220 («Mettler-Toledo International, Inc.», США).

Штамм К-541 рассеивали на три варианта агара и культивировали 7 сут при температуре 28 °С. Антифунгальные свойства определяли методом агаровых блоков (20). Антифунгальную активность штамма, выросшего на нейтральной, засоленной и щелочной среде, оценивали в отношении представителей пяти родов фитопатогенных грибов, которые служат возбудителями основных грибных заболеваний пшеницы и риса: фузариоза — *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *F. oxysporum* Schlecht., *F. heterosporum* Nees, *F. sporotrichiella* Sherb., пирикулярриоза — *Piricularia oryzae* Cavara, альтернариоза — *Alternaria triticina* Prasada & Prabhu, *A. alternate* (Fr.) Keissl., биполяриоза — *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, аспергиллеза — *Aspergillus niger* van Tieghem. В расплавленную и остуженную до 40-50 °С среду Чапека-Докса вносили суспензию конидий фитопатогенных грибов (10⁸ КОЕ/мл) из расчета 1 мл на 100 мл среды и разливали в чашки Петри. После культивирования штамма К-541 на трех вариантах глюкозо-дрожжевого агара вырезали блоки растущей культуры буром (диаметр 7 мм), переносили их на чашки Петри, предварительно засеянные тест-культурами фитопатогенных грибов, и оставляли на 72 ч при температуре 25 °С. Контролем служили блоки, вырезанные из чистых агаровых сред. Об антагонистической активности судили по диаметру зоны лизиса тест-культур, которую измеряли с точностью до 1 мм.

Антифунгальные свойства штамма при совместном культивировании с фитопатогенными грибами исследовали на агаре Чапека-Докса (среда А, pH 7,0), при внесении в агар 2,0 % NaCl (среда Б, pH 7,0) и 0,2 % Na₂CO₃ (среда С, pH 8,0). В контрольном варианте фитопатогенные грибы выращивали на агаровых средах индивидуально. Результаты учитывали на 10-е сут культивирования при 25 °С, измеряя диаметр колоний фитопатогенных грибов в контрольном и опытном вариантах.

Для накопления спорового материала штамм К-541 выращивали в течение 7 сут при температуре 28 °С на минеральном агаре 1 Гаузе. Готовили инокулюм спор смывом с поверхности растущей культуры (10⁹ КОЕ/мл) и засевали в жидкую питательную среду с овсяной мукой (1 мл инокулюма на 100 мл питательной среды). Состав среды с овсяной мукой (г/л) был следующим: глюкоза (15,0), овсяная мука (15,0), CaCO₃ (2,5), NaCl (5,0), pH 7,0-7,2.

При получении антибиотика штамм К-541 культивировали в колбах Эрленмейера (750 мл) в овсяной среде (объем 100 мл) на круговой качалке (180-200 об/мин) в течение 120 ч при температуре 28 °С. Биомассу, отжатую до 70 % влажности, взвешивали и экстрагировали 96 % этанолом (из расчета 3 мл этанола на 1 г биомассы). Экстракцию антибиотика А-541 проводили с использованием механической мешалки с верхним приводом RW 20 digital («ИКА», Германия) в течение 2 ч при комнатной температуре в вытяжном шкафу, затем в течение 3 ч в холодильнике. Экстракт концентрировали в вакууме на ротационном испарителе RV 10 basic («ИКА», Германия) при 35-40 °С. Из культуральной жидкости антибиотик извлекали экстракцией н-бутанолом (pH 7,0). Экстракт отделяли на делительной воронке, упаривали в вакууме и рекстрагировали этиловым спиртом.

Этанольные препараты, полученные из культуральной жидкости и биомассы штамма К-541, хроматографировали на пластинах Silufol марок R и UV 254 («Cavalier», Чехия), Sorbfil («Сорбполимер», Россия) и DC-Alu-folien Kieselgel 60 («Merck», США). При выборе оптимальных условий хроматографирования использовали системы растворителей хлороформ—этанол (20:1, 20:7), н-бутанол—уксусная кислота—вода (2:1:1, 3:1:1), хлороформ—этилацетат (1:1), этанол—бутанол—вода (4:1:1).

Антибиотик обнаруживали на хроматограммах визуально по свечению в УФ-свете (облучатель УФС-254/365, «ЗАО НПО Техноком», Россия) и биоавтографическим методом с использованием в качестве тест-организма *Fusarium oxysporum*. Зоны, соответствующие положению отдельных компонентов на хроматограмме, вырезали и накладывали на поверхность агара, засеянного тест-организмом. Для накопления компонентов активные зоны с пластинок снимали вместе с основой, элюировали этанолом, фильтровали, экстракт выпаривали до сухого остатка. Спектры поглощения антибиотика в суммарном препарате и его индивидуальных фракциях в УФ и видимой областях измеряли в 96 % этаноле на спектрофотометре Cary 60 UV-Vis («Agilent Technologies», США).

Статистическую обработку результатов проводили согласно описанию В.Ю. Урбах (21). В таблицах приведены средние значения (M) и стандартные ошибки средних ($\pm SEM$).

Результаты. Штамм *Streptomyces* sp. К-541 проявил высокое фунгицидное действие против всех изученных фитопатогенных грибов (табл. 1). Его антибиотическая активность в отношении грибов рода *Fusarium* составляла 30-45 мм в нейтральных условиях, 40-48 мм — при засолении, 20-33 мм в щелочных условиях; в отношении грибов рода *Alternaria* — соответственно 32-35, 36-37, 20-22 мм; рода *Bipolaris* — 36-38, 38-40, 30 мм; рода *Piricularia* — 40, 56, 50 мм. Следует отметить, что стрептомицеты широко распространены в почвах разных типов, и для кислых почв также описаны виды, способные подавлять развитие фитопатогенных грибов при низких значениях pH (22, 23).

1. Антифунгальные свойства штамма *Streptomyces* sp. К-541 в отношении возбудителей основных грибных заболеваний пшеницы и риса в зависимости от условий культивирования ($M \pm SEM$)

Вид гриба	Диаметр зоны подавления роста, мм		
	среда 1	среда 2	среда 3
<i>Fusarium oxysporum</i>	31±0,3	42±0,2	20±0,2
<i>F. heterosporum</i>	40±0,3	45±0,1	28±0,4
<i>F. solani</i>	45±0,2	48±0,4	33±0,2
<i>F. sporotrichiella</i>	40±0,1	45±0,1	32±0,3
<i>Aspergillus niger</i>	46±0,3	50±0,3	30±0,4
<i>Piricularia oryzae</i>	40±0,5	56±0,1	50±0,6
<i>Alternaria alternata</i>	32±0,3	36±0,4	20±0,1
<i>A. triticina</i>	35±0,3	37±0,2	22±0,3
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	38±0,1	40±0,5	30±0,6
Контроль (без тест-культуры)	0	0	0

Примечание. Состав использованных для культивирования вариантов глюкозо-дрожжевого агара (среды 1-3) см. в разделе «Методика».

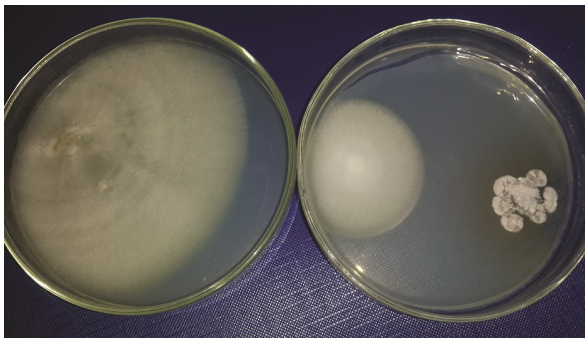
Для выявления возможности интродукции в почвенные биоценозы экстремофильного стрептомицета К-541 как агента биоконтроля грибных инфекций было проведено совместное культивирование этого штамма и фитопатогенных грибов на агаровой среде Чапека-Докса (табл. 2, рис.). При таком культивировании наблюдалось значительное ингибирование роста грибов: диаметр колоний *Fusarium oxysporum* уменьшался в 2,2-2,1 раза, *Piricularia oryzae* — в 1,8-2,7 раза, *Alternaria alternata* — в 2,2-2,4 раза, *Bipolaris sorokiniana* — в 2,0-2,2 раза, *Aspergillus niger* — 2,4-2,5 раза. Пока-

зана высокая степень ингибирования роста фитопатогенных грибов не только на исходной среде, но также в условиях засоления (2,0 % NaCl, среда Б) и при щелочном значении рН (0,2 % Na₂CO₃, среда С).

2. Антифунгальное действие штамма *Streptomyces* sp. К-541 на фитопатогенные грибы — возбудители заболеваний пшеницы и риса при совместном культивировании ($M \pm SEM$)

Вид гриба	Вариант	Диаметр колоний, мм		
		среда А	среда Б	среда С
<i>Fusarium oxysporum</i>	Контроль	116±0,3	112±0,2	100±0,2
	Опыт	52±0,1	50±0,3	48±0,2
<i>Piricularia oryzae</i>	Контроль	64±0,2	66±0,3	60±0,3
	Опыт	36±0,1	30±0,1	22±0,1
<i>Alternaria alternata</i>	Контроль	88±0,4	88±0,5	86±0,3
	Опыт	40±0,2	38±0,2	36±0,2
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Контроль	48±0,1	44±0,4	42±0,4
	Опыт	22±0,3	22±0,1	20±0,1
<i>Aspergillus niger</i>	Контроль	114±0,3	114±0,2	112±0,5
	Опыт	48±0,5	46±0,1	44±0,3

Примечание. Среда А — агар Чапека-Докса; среда Б — агар Чапека-Докса + 2 % NaCl; среда С — агар Чапека-Докса + 0,2 % Na₂CO₃, рН 8,0.



Ингибирование роста у *Fusarium oxysporum* при совместном культивировании со штаммом *Streptomyces* sp. К-541: слева — контроль, справа — опыт (10-е сут роста; среда Чапека-Докса, 2 % NaCl, рН 7,0).

Тонкослойная хроматография показала, что антибиотик А-541 представляет собой комплексный препарат. Была установлена идентичность состава компонентов препаратов, полученных из культуральной жидкости (А-541-1) и из биомассы (А-541-2). Наилучшее разделение на компоненты наблюдалось при использовании системы н-бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1), которая позволила обнаружить 8 индивидуальных химических соединений; все компоненты показали свечение в УФ-свете. Далее эту систему применили для препаративного выделения антибиотически активных фракций на пластинах с закрепленным слоем силикагеля.

Методом биоавтографии с использованием *Fusarium oxysporum* в качестве тест-организма было установлено, что биологической активностью обладает только один компонент (IV компонент) с Rf в системе н-бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1) соответственно 0,52 (антибиотик А-541-1) и 0,46 (антибиотик А-541-2). При тонкослойной хроматографией в системе н-бутанол—уксусная кислота—вода (2:1:1, 3:1:1) IV компонент, имеющий биологическую активность, проявлял себя как однородное вещество. Активный компонент выделяли для антибиотического препарата А-541-2 из зоны с Rf = 0,46. Спектры поглощения комплексного антибиотика А-541 и IV компонента были идентичны и имели основные максимумы в УФ-области при λ 317, 330, 354 и 376 нм. В ультрафиолетовом спектре присутствовали максимумы, характерные для полиеновых антибиотиков, наиболее близкие к таковым у представителей подгруппы гексаенов (при λ 330, 354, 376 нм) (24).

Таким образом, штамм *Streptomyces* sp. К-541 может рассматривать-

ся как перспективный агент против вредоносных грибных инфекций зерновых культур (пшеницы и риса) благодаря высокой антифунгальной активности в отношении всех изученных фитопатогенов. Показана возможность его использования для интродукции в почвенные биоценозы для биоконтроля возбудителей фузариозов зерновых культур в разных экологических условиях (нейтральных, щелочных и при засолении). Это свойство особенно ценно для растениеводства Казахстана, где почвенный покров неоднороден по составу и характеризуется высоким засолением. Выделенный антибиотик А-541 предварительно отнесен к группе полиенов, сделан вывод о его принадлежности к антибиотикам гексаенового типа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Logrieco A., Rizzo A., Ferracane R., Ritieni A. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight. *Appl. Environ. Microb.*, 2002, 68(1): 82-85 (doi: 10.1128/AEM.68.1.82-85.2002).
2. Монастырский О.А. Нужны ли биопрепараты и биологическая защита растений мировому сельскому хозяйству. *Защита растений*, 2006, 11: 6.
3. Elad Y., Freeman S. Biological control of fungal plant pathogens. In: *Agricultural applications. The Mycota (a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research)*. V. 11 /F. Kempken (ed.). Springer, Berlin, Heidelberg, 2002, 11: 93-109 (doi: 10.1007/978-3-662-03059-2_6).
4. Lord J.C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *J. Invertebr. Pathol.*, 2005, 89(1): 19-29 (doi: 10.1016/j.jip.2005.04.006).
5. Prabavathy V.R., Vijayanadraj V.R., Malarvizhi K., Mathivanan N., Mohan N., Murugesan K. Role of actinomycetes and their metabolites in crop protection. In: *Agriculturally important microorganisms* /G.G. Khachatourians, D.K. Arora, T.P. Rajendran, A. Srivastava (eds.). Academic World International, Bhopal, 2009: 243-255.
6. Bressan W. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. *BioControl*, 2003, 48: 233-240 (doi: 10.1023/A:1022673226324).
7. Дегтярева Е.А., Виноградова К.А., Александрова А.В., Филоненко В.А., Кожевин П.А. Почвенные актиномицеты как потенциальные биофунгициды. *Вестник Московского университета*, 2009, 17(2): 22-26.
8. Sajid I., Fotso Fondja Yao C.B., Shaaban K.A., Hasnain S., Laatsch H. Antifungal and antibacterial activities of indigenous *Streptomyces* isolates from saline farmlands: prescreening, ribotyping and metabolic diversity. *World J. Microb. Biot.*, 2008, 25(4): 601-610 (doi: 10.1007/s11274-008-9928-7).
9. Goodfellow M., Williams S.T. Ecology of *Actinomycetes*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1983, 37: 189-216 (doi: 10.1146/annurev.mi.37.100183.001201).
10. Sharma M. Actinomycetes: source, identification, and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2014, 3(2): 801-832.
11. Wellington B., Figueiredo J.E.F. Efficacy and dose—response relationship in biocontrol in *Fusarium* disease in maize by *Streptomyces* spp. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2008, 120(3): 311-316 (doi: 10.1007/s10658-007-9220-y).
12. Kaur T., Sharma D., Kaur A., Manhas R.K. Antagonistic and plant growth promoting activities of endophytic and soil actinomycetes. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2013, 46(14): 1756-1768 (doi: 10.1080/03235408.2013.777169).
13. Sharma H., Parihar L. Antifungal activity of extracts obtained from actinomycetes. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 2010, 1(10): 197-200.
14. Priya C.S., Kalaichelvan P.T. Strategies for antagonistic activity of local actinomycete isolates against rice fungal pathogens. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 2011, 2(4): 648-653.
15. *Мониторинг земель в Республике Казахстан (состояние и перспективы развития)* /Под ред. Б.С. Оспанова, З.Д. Дюсенбекова. Астана, 2001.
16. Fujiwara S. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources. *J. Biosci. Bioeng.*, 2002, 94(6): 518-525 (doi: 10.1016/S1389-1723(02)80189-X).
17. Phoebe C.H., Combie J., Albert F.G., Van Tran K., Cabrera J., Correia H.J., Guo Y., Linder-muth J., Rauer N., Galbraith W., Selitrennikoff C.P. Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds. *J. Antibiot.*, 2001, 54(1): 56-65 (doi: 10.7164/antibiotics.54.56).
18. Mokrane S., Bouras N., Sabaou N., Mathieu F. Actinomycetes from saline and non-saline soils of Saharan palm groves: Taxonomy, ecology and antagonistic properties. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2013, 7(20): 2167-2178 (doi: 10.5897/AJMR2013.5656).
19. Sathyanarayana T., Raghukumar C., Shivaji S. Extremophilic microbes: diversity and perspec-

- tives. *Current Science*, 2005, 89: 78-90.
20. Егоров Н.С. *Основы учения об антибиотиках*. М., 2004.
 21. Урбах В.Ю. *Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях*. М., 1975.
 22. Xu C., Wang L., Cui Q., Huang Y., Liu Z., Zheng G., Goodfellow M. Neutrotolerant acidophilic *Streptomyces* species isolated from acidic soils in China: *Streptomyces guanduensis* sp. nov., *Streptomyces paucisporeus* sp. nov., *Streptomyces rubidus* sp. nov. and *Streptomyces yanglinensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 1109-1115 (doi: 10.1099/ij.s.0.63959-0).
 23. Рябова О.В., Широких И.Г. Рост и антифунгальная активность стрептомицетов на фоне повышенной кислотности среды. *Сельскохозяйственная биология*, 2014, 3: 100-107 (doi: 10.15389/agrobiology.2014.3.100rus).
 24. Ветлугина Л.А., Никитина Е.Т. *Противогрибковые полиеновые антибиотики*. Алма-Ата, 1980.

РГП Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Поступила в редакцию
 050010 Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Богенбай-батыра, 103, 30 марта 2017 года
 e-mail: barahatian@yandex.ru ✉, imv_rk@list.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 1, pp. 96-102

ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST PATHOGENS OF CEREALS AND CHARACTERIZATION OF ANTIBIOTICS OF *Streptomyces* sp. STRAIN K-541 ISOLATED FROM EXTREME ECOSYSTEMS IN KAZAKHSTAN

L.P. Trenožnikova, A.S. Balgimbaeva, G.D. Ultanbekova, R.Sh. Galimbaeva

Institute of Microbiology and Virology, CS MESRK, 103, ul. Bogenbay-batyra, Amaty, 050010, Kazakhstan, e-mail barahatian@yandex.ru (✉ corresponding author), imv_rk@list.ru

ORCID:

Trenožnikova L.P. orcid.org/0000-0003-2873-9635

Ultanbekova G.D. orcid.org/0000-0003-3567-0197

Balgimbaeva A.S. orcid.org/0000-0001-5161-9071

Galimbaeva R.Sh. orcid.org/0000-0003-1378-8768

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Kazakhstan Ministry of Education and Science (project № 0358/GF4)

Received March 30, 2017

doi: 10.15389/agrobiology.2018.1.96eng

Abstract

The general requirement for biologicals is that they must be insensitive to climate change and soil conditions, including soil physicochemical composition, fertility levels, and pH values. Actinomycetes isolated from extreme habitats are able to produce biologically active substances not only under neutral conditions but also in saline, alkaline and acidic environments, which determines their importance in the biopreparations, being developed for plant protection. This study is the first to report the *Streptomyces* sp. strain K-541 antibiosis against the causative agents of several cereal fungal infections under various environmental conditions and the identification of the antibiotic produced. *Streptomyces* sp. strain K-541 isolated from extreme ecosystems of Kazakhstan was cultured under neutral (pH 7.0) and alternative growth conditions at 25.0 g/l NaCl (pH 7.2) or 2.5 g/l Na₂CO₃ (pH 8.0). Antifungal activity was determined in agar block diffusion experiments and under paired co-incubation with phytopathogenic fungi *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *F. oxysporum* Schlecht., *F. heterosporum* Nees, *F. sporotrichiella* Sherb., *Piricularia oryzae* Cavara, *Alternaria triticina* Prasada & Prabhu, *A. alternata* (Fr.) Keissl., *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, and *Aspergillus niger* van Tieghem. For antibiotic A-541 production, the strain was cultured on an orbital shaker (180-200 rpm) for 120 hours at 28 °C. The antibiotic was extracted with organic solvents and analyzed using thin layer chromatography and spectrophotometry. The studies have shown high antifungal activity of K-541 against all the phytopathogens examined. After 72 hour incubation at 25 °C the growth inhibition zones were 20-56 mm in diameter depending on growth conditions which simulated different ecological niches. In co-culturing the strain K-541 and the phytopathogenic fungi, the fungal colonies decreased 1.8-2.7 times in diameter indicating the possibility of K-541 introduction into soil biocenoses for biocontrol of cereal fungal pathogens. High inhibition of growth was also observed under saline (2 % NaCl) and alkaline (0.2 % Na₂CO₃) conditions. The antibiotic produced by strain K-541 was classified as a member of polyene group, a subgroup of the hexaenes. So strain K-541 is recognized as promising for the development of a new biopreparation with fungicidal activity against causal agents of cereal fungal infections under different environmental conditions.

Keywords: extremophilic streptomycete, antibiotic, antifungal activity, phytopathogenic fungi, wilt, rice blast disease, leaf blight, common root rot, spot blotch, mold, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. heterosporum*, *F. sporotrichiella*, *Piricularia oryzae*, *Alternaria triticina*, *A. alternata*, *Bipolaris sorokiniana*, *Aspergillus niger*, cereal crops.