

УДК 632.937

К. Ф. Бахшалиева, Л. М. Исмаилова, Я. Ю. Атакишиева

Институт микробиологии  
Национальной академии наук Азербайджана,  
Азербайджан, Баку**ВЛИЯНИЕ МИКРОБНЫХ ЛИПИДОВ НА ФИТОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ  
КОСТОЧКОВЫХ ФРУКТОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ**

Была установлена антимикробная активность липидов *Cephalosporium humicola* и *Mucor globosus* на жизнеспособность штаммов фитопатогенных грибов *Monilia cinerea*, *Clasterosporium carpothilum*, *Cytospora leucostoma* и *Verticillium dahliae*. В экспериментах *in vitro* у микробных липидов выявлено выраженное противогрибковое действие, зависящее от состава жирных кислот. Наиболее активными оказались липиды, содержащие линолевую и  $\gamma$ -линоленовую кислоты.

*Ключевые слова:* фитопатогенные грибы, микробные липиды, антимикробная активность.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда Развития Науки при Президенте Азербайджанской Республики – Грант № EIF/GAM-2-2013-2(8)-25/18/3.*

**Введение.** В настоящее время в Азербайджане наблюдается тенденция устойчивого развития сельского хозяйства. Это развитие в первую очередь касается производства фруктов, овощей и бахчевых культур. Улучшение методов сбора урожая и использование природного генетического разнообразия являются главными факторами, определяющими генеральное направление развития региона. Кроме того, такие общемировые процессы, как глобализация, либерализация торговли и возрастающая потребность в плодовоовощных продуктах в странах ЕС, Азии и Северной Африке, создают новые возможности для рынка плодовоовощной продукции и развития их обрабатывающей промышленности.

Развитие агропромышленного комплекса в настоящий момент характеризуется повышенным вниманием к экологическим проблемам. Это относится и к фитосанитарии, специфика которой связана с масштабным антропогенным воздействием на агроэкосистемы при широком использовании пестицидных ксенобиотиков. Все это обуславливает настоятельную необходимость формирования систем фитосанитарного контроля в растениеводстве и разработки экологически менее опасных средств и методов защиты растений [3; 5].

В последние годы новые антимикробные метаболиты, такие как поверхностно-активные вещества, липиды, содержащие ненасыщенные жирные кислоты, и антимикробные пептиды,

привлекают внимание исследователей для использования их как потенциальных кандидатов для защиты растений от патогенов. Целью настоящей работы являлось изучение влияния липидных экстрактов, выделенных из биомассы нефтедеградирующих микромицетов, на рост и выживаемость некоторых видов фитопатогенных грибов *in vitro*.

**Объекты и методы исследований.** В качестве основных объектов исследования использовали фитопатогенные штаммы микроорганизмов, выделенных из различных косточковых деревьев на территории Республики Азербайджан.

Фитосанитарная информация, необходимая для проведения анализа ареалов и зон распространения, а также степени вредоносности патогенов культурных растений, собиралась всеми доступными способами из различных источников:

- собственные наблюдения участников экспедиций;
- материалы географической сети (научно-исследовательские и опытные станции);
- в отдельных случаях использовалась информация, предоставленная службой защиты растений и гидрометеорологической службой региона.

Для выделения чистых культур грибов, определения антимикробной активности липидов использовали следующие агаризованные питательные среды: для грибов *Monilia cinerea* Bonord – картофельно-глюкозный (г/л: картофель – 200,

глюкоза – 100, агар – 20), для *Cytospora leucostoma* картофельно-декстрозно-пептонный агар (г/л: картофель – 200; декстроза – 20; пептон – 5, агар – 20), для *Clasterosporium carphophilum* – овсяный агар (г/л: овес – 100, агар – 20). Чистая культура возбудителя вертициллезного увядания (*Verticillium dahliae* Kleb) была получена нами путем инкубации на сусло-агаре (г/л: неохмеленное 7 %-е пивное сусло вместо воды и агар – 20) и на среде Чапека (г/л: сульфат магния – 0,5, безводный фосфат калия – 1,0, хлорид калия – 0,5, сульфат железа – 0,01, нитрат натрия – 2,0), декстроза – 30, агар – 20) при температуре 25 °С.

Для получения биомассы липогенные грибы *Mucor globosus* и *Cephalosporium humicola* выращивали на среде Чапека с глюкозой или углеводородным субстратом.

Липиды из влажного мицелия экстрагировали методом Фолча в модификации Блайя и Дайэра [4; 6]. Качественный и количественный состав жирных кислот изучали методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «Хром-5» с пламенно-ионизационным детектором, используя колонку длиной 2,8 м, заполненную хроматином N-AW-HMDS (0,16–0,20 мм) с 15 % полиэтиленгликольсукцинатом в качестве жидкой фазы, температура колонки – 180 °С, испарителя – 210 °С. В качестве газа носителя использовали гелий (30 мл/мин).

Для определения антигрибной активности раствор липидов добавляли в стерильные агаризованные питательные среды в различных концентрациях, затем на поверхность сред в центр чашки Петри вносили фрагменты фитопатогенного грибного мицелия. Диаметр выросших колоний измеряли на 7-й и 12-й дни роста. Степень ингибирования роста колоний определяли как отношение диаметра колоний грибов, выращенных на средах с добавлением различных концентраций липидов, к диаметру контрольных колоний, выращенных на среде без добавления липидов. Каждый тест проводился в 3-кратной повторности.

**Результаты и обсуждение.** Из зараженных органов косточковых деревьев, выращенных на территории Ленкорань, Гянджа, Губа и Газахского района, выделены и идентифицированы следующие фитопатогенные микроорганизмы:

1) 2 штамма *Monilia cinerea* Bonord – возбудители монилиального ожога – серой гнили – выделены из побегов плодовых веточек персиковых деревьев в Губинском районе. Монилиоз – распространенная болезнь вишни, сливы, черешни,

алычи, абрикоса в исследуемых районах и является одной из серьезных причин низкой урожайности. Но самый большой ущерб был зафиксирован в Губинском районе;

2) 3 штамма *Clasterosporium carphophilum* (Lev.) Aderh – возбудители клястероспориоза – самой распространенной и вредоносной болезнью среди косточковых. Клястероспориоз еще называют дырчатой пятнистостью. Эта болезнь обычно поражает такие плодовые деревья, как вишня, черешня, слива, абрикос, персик. Она имеет широкое распространение во всех экономических районах Азербайджана. В исследуемых районах общая поражаемость абрикоса 38,3–71,4 % в зависимости от сорта [2];

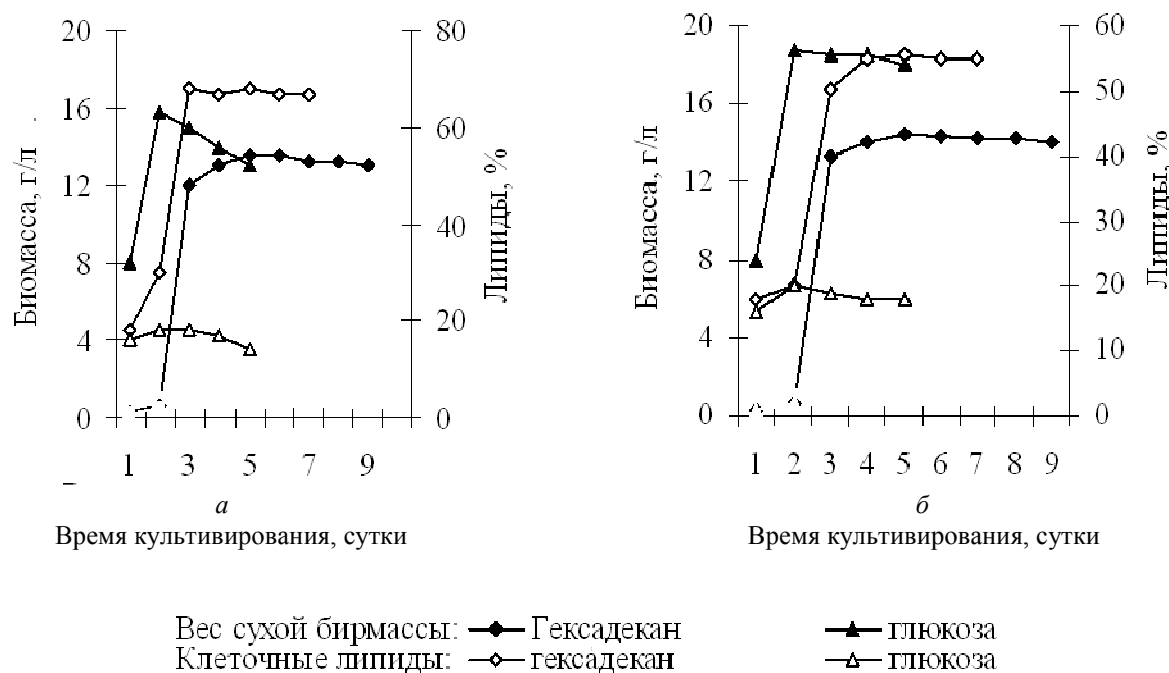
3) 3 штамма *Cytospora leucostoma* (Pers.) Sacc. – возбудители мучнистой росы персика, которая является распространенной и вредоносной болезнью;

4) 2 штамма *Verticillium dahliae* Kleb – возбудитель **вертициллезного увядания выделены из сливового дерева. В результате мониторинга только у 4–5 % фруктовых деревьев обнаружены зараженность вертициллезным увяданием.** Наиболее часто болезнь охватывает насаждения косточковых плодовых деревьев (персик, абрикос, слива). Сильно проявляется в черешневых садах Ленкоранского и Губинского районов, поражает и другие косточковые породы. Вертициллезным увяданием могут поражаться плодовые деревья в любом возрасте, но наиболее восприимчивы молодые посадки.

Таким образом, была проверена антимикробная активность микробных липидов на жизнеспособность 10 идентифицированных фитопатогенных грибных штаммов.

С целью получения липидного экстракта использовали липогенные грибные культуры *C. humicola* и *M. globosus*, выделенные из нефтезагрязненных почв. По предварительным и повторно полученным данными оба гриба способны расти на гексадекане как единственном источнике углерода и аккумулируют 67,0 и 49,5 % липидов в биомассе, что соответствует 8,7 и 5,9 г на литр. Содержание липидов этих грибов при росте на глюкозе было 15,8 и 13,7 % (рис.) [1].

Хроматографический анализ состава образцов липидов показал множество жирных кислот, как насыщенных, так и ненасыщенных. Оба гриба в ходе исследований показали большие различия в процентном соотношении жирных кислот (табл. 1).



Рост и образование липидов в культурах гриба *Cephalosporium humicola* (А) и *Mucor globosus* (В) при культивировании на глюкозе и гексадекане

Таблица 1  
Жирнокислотный состав липидов  
*Cephalosporium humicola* EI и *Mucor globosus* II  
при росте на глюкозе и гексадекане

Культура/ субстрат	Жирные кислоты, %							другие
	C14:0	C16:0	<sup>Δ</sup> C16:1	C18:0	<sup>Δ9</sup> C18:1	<sup>Δ9,12</sup> C18:2	<sup>Δ6,9,12</sup> C18:3	
<i>C. humicola</i> гексадекан	1,9	53,0	7,3	2,8	15,0	9,0	10,0	2,0
<i>C. humicola</i> глюкоза	2,6	52,0	Сл.	16,0	28,0	Сл.	Сл.	1,4
<i>M. globosus</i> гексадекан	2,6	49,0	4,7	5,9	12,0	9,0	14,0	2,8
<i>M. globosus</i> глюкоза	3,0	46,0	12,0	29,0	8,0	Сл.	12,0	2,0

Мицелий *M. globosus*, растущий на глюкозе, содержал в основном пять видов жирных кислот, включая миристиновую, пальмитиновую, пальмитоолеиновую, стеариновую и олеиновую. У *C. humicola* при росте на глюкозе 98,6 % от общего содержания жирных кислот составляли миристиновая, пальмитиновая, стеариновая и олеиновая кислоты. В составе липидов *M. globosus* были преимущественно насыщенные жирные кислоты, такие как миристиновая, пальмитиновая, стеариновая кислоты. У *C. humicola* наибольший процент насыщенных кислот приходился на пальмитиновую (52 %) и стеариновую (16 %) кисло-

ты. У обоих грибов при росте на глюкозе в составе жирных кислот ненасыщенные жирные кислоты составляли 20 и 28 % от общего содержания жирных кислот. При росте исследованных грибов на глюкозе не были обнаружены полиненасыщенные C18 жирные кислоты. Липиды, экстрагированные из клеток, культивированных на гексадекане, содержали не только вышеперечисленные насыщенные жирные кислоты, но также имели линолевую и  $\gamma$ -линолевую кислоты. В обоих грибах наблюдалось резкое уменьшение содержания стеариновой кислоты от 16,0–29 % до 2,8–5,9 % при замене глюкозы на гексадекан.

Проведенные исследования показали, что все липидные экстракты имеют определенную противогрибковую активность по отношению к исследуемым фитопатогенным грибам. В лабораторных опытах они существенно подавляли рост наиболее распространенных фитопатогенных видов грибов косточковых деревьев. Липиды, полученные из биомассы липогенных грибов после культивирования на гексадекане, проявили наибольший фунгистатический эффект. Результаты изучения антигрибковой активности липидов *C. humicola* и *M. globosus*, выращенных на углеводородном субстрате, представлены в таблице 2.

Ингибирующий эффект микробных липидов на линейный рост колоний был в той или иной степени отмечен для всех исследуемых грибов.

Однако степень антигрибковой активности у каждого липида различна по отношению к конкретному возбудителю грибковой патологии.

Таблица 2

**Изменения диаметров колоний  
фитопатогенных грибов липидами  
в различных концентрациях, % к контролю**

Патогенная культура	Концентрация липидов, г/л					
	<i>Cephalosporium humicola</i>			<i>Mucor globosus</i>		
	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
<i>Monilia cinerea</i> Bonord (штамм 1)	80	60	50	88	70	55
<i>M. cinerea</i> Bonord (штамм 2)	80	62	50	89	75	56
<i>Clasterosporium carpothilum</i> (Lev.) Aderh (штамм 1)	52	32	0	58	39	5
<i>C. carpothilum</i> (Lev.) Aderh (штамм 2)	50	30	0	58	40	7
<i>C. carpothilum</i> (Lev.) Aderh (штамм 3)	51	33	0	55	36	4
<i>Cytospora leucostoma</i> (Pers.) Sacc (штамм 1)	100	82	80	100	89	86
<i>C. leucostoma</i> (Pers.) Sacc (штамм 2)	100	80	79	100	87	85
<i>C. leucostoma</i> (Pers.) Sacc (штамм 3)	100	79	72	100	89	82
<i>Verticillium dahliae</i> Kleb (штамм 1)	93	74	70	95	75	70
<i>V. dahliae</i> Kleb (штамм 2)	92	72	69	98	76	71

Липиды, экстрагированные из 5-дневной биомассы *C. humicola*, задерживали рост грибов в концентрации от 0,5 до 1,0 г/л. Наиболее устойчивой оказалась *Cytospora leucostoma* (Pers.) Sacc. – возбудитель мучнистой росы персика. В концентрации 0,5–1,0 г/л липида на 7-е сутки скорость роста ингибировалась в среднем на 20–28 % относительно контроля. Менее устойчивой к липидам была культура штаммов рода *V. dahliae* Kleb. Ингибирование роста на 7-е сут. в среднем было на 10 % выше, чем у *Cytospora leucostoma* (Pers.) Sacc.

Максимальный эффект ингибирования был обнаружен для культуры *Clasterosporium carpothilum* (Lev.) Aderh. При концентрации липидов 0,1 % диаметр колоний на 7-е сутки уменьшался на 50 %, а при концентрациях 0,5 % на 70 %, и выше рост был полностью подавлен. Рост фитопатогенных культур *Monilia cinerea* Bonord в концентрации липидов от 1,0 г/л был ингибирован на 50 %. Липиды *Mucor globosus* оказались малоэффективными в сравнении с липидами *C. humicola*.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* у липидов грибов *Cephalosporium humicola* и *Mucor globosus* выявлено выраженное противогрибковое действие, зависящее от состава жирных кислот. Наиболее активными оказались липиды, содержащие линолевую и  $\gamma$ -линоленовую кислоты.



1. Атакишиева Я. Ю. Изучение липидообразования грибов, разлагающих углеводороды // Сумгаитский государственный университет. Научные известия. 2006. № 1. С. 53–57.

2. Джафаров И. О микобиоте косточковых плодовых культур Азербайджана // Труды Института ботаники национальной академии наук Азербайджана. Баку: Элм. 2007. Т. XXVII. С. 125–131.

3. Alabouvette C., Olivain C., Steinberg C. Biological control of plant diseases: the European situations // Eur J Plant Pathol. 2006. V. 114. P. 329–341.

4. Bligh E. and Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. P. 911–917.

5. Nautiyal C. Biocontrol of Plant Diseases for Agricultural Sustainability. Biocontrol Potensial and its Exploitation in sustainable Agriculture. 2000. P. 9–24.

6. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497–590.

1. Atakishieva Ya. Yu. Izuchenie lipidoobrazovaniya gribov, razlagayushchikh uglevodorody, Sumgaitskii gosudarstvennyi universitet, Nauchnye izvestiya, 2006, No. 1. pp. 53–57.

2. Dzhafarov I. O mikobiote kostochkovykh plodovykh kul'tur Azerbaidzhan, Trudy instituta Botaniki natsional'noi akademii nauk Azerbaidzhana, Baku, «Elm», 2007, t. XXVII, pp. 125–131

3. Alabouvette C., Olivain C., Steinberg C. Biological control of plant diseases: the European situations, Eur J Plant Pathol, 2006, v. 114, pp. 329–341.

4. Bligh E. and Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol, 1959, v. 37, pp. 911–917.

5. Nautiyal C. Biocontrol of Plant Diseases for Agricultural Sustainability. Biocontrol Potensial and its Exploitation in sustainable Agriculture, 2000, pp. 9–24.

6. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, J. Biol. Chem. 1957, v. 226, pp. 497–590.

UDK 632.937

**K. F. Bakshaliyeva, L. M. Ismayilova,  
Y. Y. Atakishiyeva**

***Institute of Microbiology, Azerbaijan National academy of sciences,  
Azerbaijan, Baku***

### **MICROBIAL LIPIDS EFFECT ON DISEASE-CAUSING FUNGI IN STONE FRUIT TREES**

This research indicates the antimicrobial activity of lipid *Cephalosporium humicola* and *Mucor globosus* on the viability of strains of disease-causing fungi *Monilia cinerea*, *Clasterosporium carpohilum*, *Cytospora leucostoma* and *Verticillium dahliae*. Experiments in vitro showed in microbial lipids strong antifungal activity, which depends on the composition of fatty acids. The most active were the lipids containing linoleic and  $\gamma$ -linolenic acid.

*Keywords:* disease-causing fungi, microbial lipids, antimicrobial activit.