

652 мик

К-93

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР
ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФИТОПАТОЛОГИИ

На правах рукописи

Т. И. КУРАХТАНОВА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОГРИБНОЙ
АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
НЕКОТОРЫХ МИКОФИЛЬНЫХ ГРИБОВ**

096. Микробиология

Диссертация на русском языке

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук.

МОСКВА — 1972

632 мик

К-93

Работа выполнена во Всесоюзном научно-исследовательском институте фитопатологии.

Научный руководитель — доктор биологических наук Г. С. Муромцев.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук И. В. Воронкевич, кандидат биологических наук А. Н. Полин.

Ведущее предприятие — Институт по изысканию новых антибиотиков Академии медицинских наук СССР.

Автореферат разослан « 20 » *марта* 1972 г.

Защита диссертации состоится *конца апреля* 1972 г. на заседании Совета по присуждению ученых степеней Всесоюзного научно-исследовательского института фитопатологии (Московская область, Большие Вяземы, ВНИИФ).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Отзывы, заверенные печатью, просьба направлять в двух экземплярах.

Ученый секретарь Совета

кандидат биологических наук

С. А. Меликова.

21498

Одним из путей повышения урожайности сельскохозяйственных культур является борьба с болезнями, вредителями и сорняками с помощью пестицидов. В последние годы большое внимание уделяется поиску и применению пестицидов микробного происхождения, выгодно отличающихся от химических препаратов высокой эффективностью (на 2—3 порядка), избирательностью действия и способностью к быстрому и полному разложению в почве.

Наиболее изученной группой таких пестицидов являются антибиотики, в частности, антибиотики с противогрибным действием, особенно важные для борьбы с грибными болезнями растений. Возможны два пути изыскания антибиотиков, перспективных в фитопатологии: изучение уже известных, но непригодных для медицинских целей антибиотиков и поиск новых.

Одной из групп микроорганизмов, среди которых ведется интенсивный поиск продуцентов антибиотиков, являются грибы. К 1951 году число изученных на антибиотическую активность грибов составляло 2200 видов; к настоящему времени это число значительно увеличилось, тем не менее изученные виды составляют не более 10% от 150 000 описанных видов грибов. Поэтому можно считать, что поиск новых продуцентов антибиотиков среди грибов только начат.

Наряду с изучением грибов по систематическому признаку (Benedict a. Langlucke, 1947; Brian, 1951; Broadbent, 1968) внимание исследователей стало привлекать изучение антибиотической активности отдельных экологических групп грибов (почвенные антагонисты; фитопатогенные грибы; грибы, вызывающие микотоксикозы человека и животных; дереворазрушающие и микоризные грибы и совсем еще мало изученные микофильные грибы). Экологический подход к поиску новых продуцентов антибиотиков следует признать наиболее целесообразным.

Микофильные грибы составляют довольно своеобразную экологическую группу, отличительной особенностью которой является способность использовать в качестве питательного субстрата различные грибы, в том числе и фитопатогенные.

21498
БИБЛИОТЕКА
ВНИИФ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Культуры микопаразитов

Исследованные нами культуры микопаразитов были получены во ВНИИ фитопатологии от канд. биол. наук О. Л. Рудакова. Уточнение некоторых видовых названий было проведено на кафедре низших растений МГУ. Мы приносим искреннюю благодарность О. Л. Рудакову за предоставление культур микопаразитов, а также канд. биол. наук И. И. Сидоровой за практическую помощь в уточнении видовой принадлежности некоторых культур.

Были исследованы 35 культур микопаразитов, данные о которых (микопаразит, гриб-хозяин и место сбора) приведены ниже.

Микопаразиты, грибы-хозяева и место их сбора в природе
(Данные канд. биол. наук О. Л. Рудакова)

Микопаразит	Гриб-хозяин	Место сбора
1	2	3
1. Aposphaeria caespitosa Jacz.	Puccinia graminis	Московская обл.
2. Dactylium boletorum Sacc.	Russula sp.	»
3. Darluca filum (Biv-Bern) Cast	Puccinia sorghi	Грузинская ССР
4. Didymocladium ternatum Sacc.	Трутовик	Московская обл.
5. D. ternatum	Валуй	»
6. D. ternatum	Трутовик	Сахалин
7. Cicinnobolus polygoni Potebni	Мучнистая роса горца	Крым
8. C. rosacearum Dejeva	Мучнистая роса дыни	Астрахань
9. C. compositarum Vassig	Мучнистая роса огурцов	Московская обл.
10. Gliocladium album Petch	Гифомицет	—
11. G. fimbriatum Gillman et Abbot	Шампиньон	Московская обл.
12. G. penicilloides Corda	Fusarium sp.	Овощехранилище
13. G. roseum Link.	На грибах ка- гатной гнили	Московск. обл.
14. G. deliquescens Sopp	Шампиньон	Киргизия
15. Fusarium pteridis Ell et Ev.	Мукор	Московская обл.
16. F. pucciniophilum Sacc et Syd	Puccinia graminis	»
17. F. sp.	Phytophthora infes- tans	Грузия
18. Lejosepium aureum Sacc.	Plasmopara viticola	Московская обл.
19. Mortierella isabellina Oud.	Glytocybe sp.	—
20. Monosporium agaricinum Bon	Russula sp.	Московская обл.
		»

В некоторых случаях они полностью подавляют рост и развитие гриба-хозяина.

Интерес к микофильным грибам, первые сведения о которых относятся к концу прошлого столетия (Brefeld, 1892; Matruchot, 1900), в последние годы значительно вырос; информация с каждым годом увеличивается (Butler, 1957; Shigo, 1958; Barnett, 1963; Voosalis, 1964; Сидорова, 1964, 1966, 1971, Пылдмаа, 1966; Рудаков, 1968, 1971; Осипян, 1970; Арнольд, 1971 и др.). Но до сих пор изучение их имеет в основном эколого-систематический характер.

По способу питания и характеру паразитизма микофильные грибы делят на 2 группы: биотрофные и некротрофные.

Биотрофные микопаразиты получают питательные вещества из живых клеток гриба-хозяина, которые при этом не всегда погибают. Угнетение проявляется в ослаблении роста и развития гриба-хозяина и зависит от целого ряда внешних и внутренних факторов (Barnett a. Lylli, 1958; Shigo, 1960; Shigo et al, 1961, Voosalis, 1964).

Некротрофные микопаразиты извлекают питательные вещества из клеток мертвого гриба-хозяина, которого паразит убивает, прежде чем в него внедряется (Weindling, 1940; Butler, 1957; Barnett a Lylli, 1962). Угнетающее действие проявляется или при непосредственном контакте гиф обоих партнеров (Butler, 1957; Barnett a Lylli, 1962), или на расстоянии, и в этом случае микопаразит убивает хозяина с помощью антибиотиков (Weindling, 1940; Brian, 1960; Билай, 1956, 1961; Сидорова, 1964, 1966).

Известные нам сведения об антибиотической активности микофильных грибов исчерпываются данными об антагонистах из родов Trichoderma и Trichothecium, которые относят к некротрофным микопаразитам.

Исходя из этого было сделано предположение (Муромцев, 1967) о широком распространении среди микофильных грибов способности к синтезу антибиотиков и перспективности поиска среди них новых продуцентов антибиотиков. Именно эта гипотеза легла в основу данной работы.

Систематического изучения противогрибной антибиотической активности микофильных грибов, судя по известной нам литературе, до сих пор не проводилось. Очень скудны сведения о глубинном культивировании этих грибов.

Задачей наших исследований было изучение антибиотической активности микофильных грибов при глубинном культивировании с целью оценки их как продуцентов противогрибных антибиотиков.

Работа проводилась во ВНИИ фитопатологии в 1967--1971 гг.

Микопаразит	Гриб-хозяин	Место сбора
1	2	3
21. <i>Oospora nectricola</i> Richon	<i>Nectria cinnabagina</i>	Московская обл.
22. <i>O. hypoxylicola</i> (Prens) Sacc et Vogl	Трутовик	»
23. <i>Sepedonium aureo-fulvum</i> Cooke et Masse	Валуи	—
24. <i>S. sp.</i>	Валуи	—
25. <i>Sporotrichum aeruginosum</i> Schw.	<i>Agaricus bisporum</i>	—
26. <i>S. biparasiticum</i> Bubak	Мучнистая роса шиповника	—
27. <i>S. olivaceum</i> Link (Fries)	Трутовик	—
28. <i>S. hospicida</i> Schulz et Sacc.	<i>Agaricus bisporum</i>	—
29. <i>S. mycophilum</i> Link	<i>Alternaria tenuis</i>	—
30. <i>S. falloidearum</i> Corda	Мучнистая роса клевера	—
31. <i>S. triumfettae</i> Hansf	Мучнистая роса горца	Крым
32. <i>Verticillium aspergillus</i> Berk et Br.	<i>Polygopus sp.</i>	—
33. <i>V. capitatum</i> Chrenb	Антракноз арбуза	Астрахань
34. <i>V. cercosporae</i> Peter	Церкоспороз свеклы	Краснодар
35. <i>V. niveum</i> Berk.	Ржавчина барбариса	Грузия

Методы работы

Исследование с целью получения сравнимых результатов мы проводили по единой для всех микофильных грибов схеме, с очень небольшими изменениями для некоторых культур. Схема включает последовательно разработку способов культивирования микопаразитов в лабораторных условиях, выявление оптимальных условий глубинного культивирования, установление спектра активности продуцента, выявление качественного состава антибиотиков методом хроматографии на бумаге.

Для изучения роста и антибиотической активности микопаразитов использованы среды, различающиеся между собой сочетанием 5 источников углерода (глюкоза, сахароза, крахмал, маннит, подсолнечное масло) и 4 источников азота (пептон, соевая мука, NH_4NO_3 + кукурузный экстракт, аспарагин) — всего 20 сред. Содержание источников питания в средах составляет: глюкоза, сахароза, крахмал, маннит, подсол-

нечное масло — 5%, пептон — 1%, соевая мука — 1,5%, NH_4NO_3 — 0,5% и аспарагин — 1,0%. В среды с NH_4NO_3 дополнительно вносили 1% кукурузного экстракта.

Солевая основа во всех средах одна и та же: KH_2PO_4 — 0,2%, K_2SO_4 — 0,02%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,02%, 1 мл/л смеси микроэлементов (в 100 мл дистиллированной воды содержится: $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 8 мг, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 40 мг, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 880 мг, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 10 мг, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 100 мг, молибдата аммония — 30 мг, H_3BO_4 — 6 мг, CaCl_2 — 100 мг). pH среды — 5,5.

Для предварительной оценки антибиотической активности использовали 6 сред, где сахароза, крахмал, маннит — источники углерода, а соевая мука или NH_4NO_3 + кукурузный экстракт — источники азота. Для грибов, обладающих, по данным предварительной оценки, значительной активностью, использовали полный набор сред (20).

Изучение роста на плотных средах проводили на скошенном питательном агаре, в пробирках, при $t + 24 - 26^\circ \text{C}$. Оценка роста визуальная.

Глубинное культивирование осуществляли в колбах (100 мл среды) на ротационной качалке (220 об/мин.) при $t + 26 \pm 2^\circ \text{C}$. Рост при этом оценивался по весу сухого мицелия (г/100 мл среды), накопленного в течение 5 суток культивирования.

Антибиотическую активность проверяли методом бумажных дисков или лунок (Егоров, 1957). Определяли отдельно активность фильтратов культуральной жидкости (внеклеточные антибиотики) и спиртовых экстрактов мицелия (внутриклеточные антибиотики).

В качестве тест-объектов использовали следующие культуры: *Saccharomyces carlsbergensis*, *Endomyces reesii*, *Pestalotia sp.*, *Kabatiella caulivora*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum*, *Helminthosporium sativum*, *Cephalosporium gramineum*.

На газоне отзывчивых тест-объектов измеряли величину зон угнетения (диаметр зоны в мм), отмечали характер угнетения (фунгицидный или фунгистатический).

Для выявления примерного состава антибиотиков применяли хроматографию на бумаге (Блинов и др., 1964), с проявлением хроматограмм на газоне чувствительных тест-объектов. Исследования по хроматографическому изучению антибиотиков проводили под методическим руководством и при содействии канд. хим. наук Держинского А. Р.

Общая схема оценки продуцента

Для оценки изученных микопаразитов как продуцентов противогрибных антибиотиков использовали как отдельные

показатели антибиотической активности, так и их совокупность (общую или суммарную активность). Суммарная оценка антибиотической активности слагалась из следующих показателей: 1) способность к синтезу внутри- и внеклеточных антибиотиков; 2) спектр активности (т. е. число отзывчивых тест-объектов из всего набора использованных тест-организмов); 3) степень угнетения тест-объекта (величина зон угнетения); 4) характер угнетающего действия (фунгицидный, фунгистатический); 5) примерное количество синтезируемых микопаразитом антибиотиков.

Результаты исследования и обсуждение

Общая характеристика изученных микофильных грибов включает два основных показателя: 1) рост этих грибов на ряде плотных и жидких сред и, главное, 2) способность к синтезу противогрибных антибиотиков.

1) Рост микофильных грибов на плотных и жидких средах

По способности к росту на двадцати испытанных агаризованных средах изученные микопаразиты можно условно разбить на 2 группы.

Первая — с хорошим ростом на подавляющем большинстве сред — включает 26 видов: *Aposphaeria caespitosa*, *Dactylium boletorum*, *Didymocladium ternatum*, *Gliocladium penicilloides*, *G. roseum*, *G. album*, *G. fimbriatum*, *Cicinnobobus rosacearum*, *C. polygona*, *C. compositarum*, *Fusarium pteridis*, *F. sp.*, *Monosporium agaricinum*, *Mortierella isabellina*, *Oospora hypoxylicola*, *Sepedonium sp.*, *Sporotrichum triumfettae*, *S. mycophilum*, *S. olivaceum*, *S. hospicida*, *S. aeruginosum*, *S. biparasiticum*, *Verticillium capitatum*, *V. cercosporae*, *V. niveum*.

Вторая группа — культуры, слабо растущие вообще и совсем не растущие на средах с крахмалом или подсолнечным маслом — включает 7 видов: *Gliocladium deliquescens*, *Darlucula filum*, *Lejosporium aureum*, *Oospora nectricola*, *Sepedonium aureo-fulvum*, *Sporotrichum falloidearum*, *Verticillium aspergillum*.

Наиболее подходящими источниками углерода для большинства микопаразитов были глюкоза, сахароза, маннит, несколько хуже — крахмал и наименее благоприятным — подсолнечное масло. Из источников азота малоприспособным оказался аспарагин, особенно в сочетании с крахмалом и подсолнечным маслом.

Значительные различия по росту на агаризованных средах отмечены между отдельными видами в пределах рода. При-

мером этому могут служить виды *Oospora* и *Verticillium*. Так, *Oospora hypoxylicola* хорошо растет на 17, а *O. nectricola* — всего лишь на четырех средах из 20 испытанных. Из 4 видов рода *Verticillium* наиболее требователен *V. aspergillum*, хорошо растущий только на 8 средах (данные табл. 1).

При глубинном культивировании (жидкие среды), так же как и выращивании на плотных средах, рост микопаразитов зависит от состава среды. За пять суток культивирования исследованные микопаразиты накапливали от 0 до 4,8 г сухого мицелия на 100 мл жидкой культуры. Большое значение для роста имеет источник азота. Так, в подавляющем большинстве случаев соевая мука лучше, чем NH_4NO_3 (+кукурузный экстракт). И только для 3 видов — *Gliocladium roseum*, *G. penicilloides*, *Sporotrichum mycophilum*, вообще характеризующихся относительно слабым ростом, — наоборот.

Влияние отдельных источников углерода на рост испытанных микопаразитов довольно четко прослеживается на средах

Таблица 1
Рост некоторых микофильных грибов на 20-ти агаризованных средах

Среда	Микофильный гриб			
	<i>Oospora nectricola</i>	<i>Oospora hypoxylicola</i>	<i>Verticillium aspergillum</i>	<i>Verticillium capitatum</i>
Глюкоза — пептон	+	+++	+++	+++
Глюкоза — соевая мука	++	+++	+++	+++
Глюкоза — NH_4NO_3^*	+++	+++	+++	+++
Глюкоза — аспарагин	+	++	+++	+++
Сахароза — пептон	+	+++	+	+++
Сахароза — соевая мука	—	+++	+	+++
Сахароза — NH_4NO_3^*	++	+++	++	+++
Сахароза — аспарагин	+	++	+	+++
Крахмал — пептон	—	+++	+	+++
Крахмал — соевая мука	—	+++	+	+++
Крахмал — аспарагин	—	++	+	+
Крахмал — NH_4NO_3^*	—	+++	+	++
Маннит — пептон	+	+++	+++	+++
Маннит — соевая мука	+	+++	+++	+++
Маннит — аспарагин	+	+	+	+
Маннит — NH_4NO_3^*	++	+++	+++	++
Подсолнечное масло — соевая мука	—	+++	—	+++
Подсолнечное масло — пептон	—	+++	—	+++
Подсолнечное масло — NH_4NO_3^*	—	++	—	++
Подсолнечное масло — аспарагин	—	+	—	+

* NH_4NO_3 с добавлением 1% кукурузного экстракта.

+++ — хороший рост.

++ — слабый рост.

+ — средний рост.

— — нет роста.

с NH_4NO_3 . Так, хорошо усваивают все 3 источника углерода (с выходом сухой биомассы свыше 1,5%) культуры: *Gliocladium fimbriatum*, *Fusarium pteridis*, *Sepedonium aureo-fulvum*, *Sporotrichum hospicida*, *S. aeruginosum*.

Хорошо усваивают (биомасса > 1,5%) два источника углерода из 3-х следующие культуры: *Sporotrichum olivaceum* и *S. mycophilum* (крахмал и маннит), *Cicinnobolus compositarum*, *Verticillium aspergillus*, *Sepedonium sp.* (сахароза и маннит), *Verticillium capitatum* (сахароза и крахмал). И, наконец, к грибам, хорошо усваивающим только один источник углерода, относятся: *Gliocladium deliquescens*, *G. penicilloides* (сахароза), *G. roseum* (маннит) и *Didymocladium ternatum* (крахмал). Соответствующие данные приведены в табл. 2.

Другие испытанные источники углерода (глюкоза, подсолнечное масло) и азота (пептон, аспарагин) также влияют на глубинный рост грибов. Соответствующие данные получены при глубинном культивировании наиболее активных продуцентов.

Таблица 2

Рост некоторых микофильных грибов при глубинном культивировании на средах с различными источниками углерода (биомасса в г/100 мл среды)

Успеваемость	Микопаразит	Источник углерода*		
		сахароза	крахмал	маннит
Хорошо усваивают 3 источника углерода	<i>Gliocladium fimbriatum</i>	1,80	2,00	2,70
	<i>Fusarium pteridis</i>	1,98	1,80	1,65
	<i>Sepedonium aureo-fulvum</i>	2,40	2,38	1,76
	<i>Sporotrichum aeruginosum</i>	2,18	1,64	1,92
	<i>S. hospicida</i>	2,10	1,76	2,40
Хорошо усваивают два источника углерода	<i>S. olivaceum</i>	1,22	1,81	2,55
	<i>S. mycophilum</i>	1,20	2,20	2,10
	<i>Cicinnobolus compositarum</i>	2,12	1,28	2,26
	<i>Verticillium aspergillus</i>	2,20	1,20	2,40
	<i>Sepedonium sp.</i>	2,01	1,25	2,42
	<i>Verticillium capitatum</i>	2,70	4,50	0,0
Хорошо усваивают только один источник углерода	<i>Gliocladium deliquescens</i>	1,50	0,80	0,80
	<i>G. penicilloides</i>	1,80	0,0	1,10
	<i>G. roseum</i>	0,50	0,70	1,50
	<i>Didymocladium ternatum</i>	0,60	1,50	0,70

* В качестве источника азота — $\text{NH}_4\text{NO}_3 + 1\%$ кукурузного экстракта.

В таблице 3 приведены данные по росту 3 культур микофильных грибов, выращенных на средах с глюкозой и подсолнечным маслом.

Таблица 3

Рост трех культур микофильных грибов при глубинном культивировании на некоторых средах (сухая биомасса в г/100 мл среды)

Микопаразит	N		Соевая мука		$\text{NH}_4\text{NO}_3 +$ кукур. экстр.		Аспарагин	
	глюкоза	подсолнечное масло	глюкоза	подсолнечное масло	глюкоза	подсолнечное масло	глюкоза	подсолнечное масло
<i>Darluka filum</i>	0,52	0,75	1,58	2,10	0,10	1,05	0,20	0,35
<i>Didymocladium ternatum</i>	1,00	2,90	0,80	0,80	1,10	1,40	1,60	1,43
<i>Sporotrichum mycophilum</i>	0,42	1,19	1,45	1,48	0,92	0,68	1,14	2,26

Как видно из табл. 3, рост микопаразитов определяется не только отдельно взятым источником углерода или азота, но и их сочетанием. Так, глюкоза и подсолнечное масло в целом примерно равноценные источники углерода, с некоторым преимуществом последнего. Однако наиболее эффективны они в сочетании с разными источниками азота: подсолнечное масло с пептоном и аспарагином, а глюкоза — с соевой мукой.

Между отдельными видами в пределах рода наблюдается довольно значительная разница по росту на ферментационных средах. Так, из четырех видов рода *Verticillium* один — *V. niveum* — характеризуется слабым ростом (биомасса колеблется от 0,10 до 0,76 г/100 мл среды), другой — *V. cersopogae* — средним ростом (биомасса от 0 до 1,65 г), остальные — очень хорошим ростом (биомасса до 4,8 г). Соответствующие данные представлены в табл. 4.

Литературные сведения о культивировании микофильных грибов на искусственных питательных средах очень немногочисленны и связаны в основном либо с изучением физиологии паразитизма (Barnett, 1963; Woosalis, 1964), либо с накоплением спорового материала при разработке биометода (Федоринчик, 1940; Владимирская, 1939).

Высказывалось мнение, что для роста и спороношения некоторых микопаразитов необходимо вносить в питательную среду добавки из гриба-хозяина: споры, мицелий или экстракт из него (Barnett, 1963; Woosalis, 1964). В частности, для нор-

Таблица 4

Рост микофильных грибов рода *Verticillium* при глубинном культивировании (биомасса, г/100 мл среды)

Источник питания		Микопаразит			
углерод	азот	<i>V. niveum</i>	<i>V. cercosporae</i>	<i>V. aspergillus</i>	<i>V. capitatum</i>
Сахароза	Соевая мука	0,74	1,31	3,60	3,40
	NH ₄ NO ₃ *	0,14	1,12	2,20	2,70
Крахмал	Соевая мука	0,76	1,65	3,10	3,10
	NH ₄ NO ₃ *	0,55	1,02	1,20	4,50
Маннит	Соевая мука	0,63	1,60	3,60	4,80
	NH ₄ NO ₃ *	0,10	0,0	2,40	0,0

* NH₄NO₃ везде с добавлением 1% кукурузного экстракта.

мального роста *Darlusa filum* необходимо внесение спор ржавчины-хозяина этого микопаразита (Schroeder u. Hassebrauk, 1957). По данным Арнольда (1971) рост микопаразитов на искусственной питательной среде, а также их спорообразование зависят от характера паразитизма. А именно, некротрофные микопаразиты хорошо растут на обычных лабораторных средах, рост биотрофных — значительно хуже; они, как правило, не образуют спороношения.

Практически не изучена возможность глубинного культивирования микофильных грибов. Известно лишь, что большую роль для глубинного роста *Darlusa filum* имеют не только отдельные источники углерода и азота, но и витамины (тиамин, биотин), при отсутствии которых гриб не растет (Nicolas, Villanueva, 1965).

Наши данные показывают, что микофильные грибы хорошо растут на обычных агаризованных средах и хорошо развиваются при глубинном культивировании в жидких средах.

2. Общая антибиотическая активность изученных микопаразитов и разделение их на группы

Согласно полученным результатам, все изученные микопаразиты способны к синтезу внутриклеточных, а примерно 3/4 из них — и к синтезу внеклеточных антибиотиков. По общему (суммарному) антибиотическому действию их можно примерно разбить на 3 группы: сильные, слабые и средние (промежуточные) продуценты антибиотиков (данные таблицы 5).

Сильные продуценты — *Fusarium pucciniophilum*, *Darlusa filum*, *Didymocladium ternatum*, *Sporotrichum triumfettae*,

Таблица 5

Общая (суммарная) активность изученных микопаразитов и разделение их на группы

Группа	Микопаразиты	Активность		Спектр активности (к-во подавляемых тест-организмов из 8, взятых в опыте)	Характер антибиотического действия (фунгицидный, фунгистатич.)	Примерное количество антибиотиков (по данным хроматографии на бумаге)
		экстракты мицелия	фильтраты культур. жидкости			
Сильные	1. <i>Fusarium pucciniophilum</i>	++	++	6	фунгицидный	не менее 4-х
	2. <i>Darlusa filum</i>	+++	0	6	»	» 4-х
	3. <i>Didymocladium ternatum</i>	+++	++	7	»	» 2-х
	4. <i>Sporotrichum triumfettae</i>	+++	+++	6	»	» 1-го
	5. <i>S. mycophilum</i>	+++	+++	7	»	» 3-х
	6. <i>S. olivaceum</i>	++	0	6	»	»
Средние (промежуточные)	7. <i>Dactylium boletorum</i>	++	++	7	»	1-го
	8. <i>Gliocladium deliquescens</i>	+++	++	6	»	2-х
	9. <i>G. penicilloides</i>	+++	++	5	»	2-х
	10. <i>G. album</i>	+++	++	4	»	»
	11. <i>G. roseum</i>	+++	++	5	»	не установлено
	12. <i>Fusarium pteridis</i>	++	++	5	»	не менее 1-го
	13. <i>Sporotrichum aeruginosum</i>	+	+	8	фунгицидный, фунгистатич.	не менее 2-х
	14. <i>S. biparasiticum</i>	+	+	5	»	» 2-х
	15. <i>Verticillium niveum</i>	+	0	4	»	» 2-х

Группа	Микопаразиты	Активность		Спектр активности (к-во подавляемых тест-организмов из 8, взятых в опыте)	Характер антибиотического действия (фунгицидный, фунгистатич.)	Примерное кол-во антибиотиков (по данным хроматографии на бумаге)
		экстракты мицелия	фильтраты культур. жидкости			
Слабые	16. <i>V. capitatum</i>	+	+	4	»	»
	17. <i>Sporotrichum kospicida</i>	+	0	3	»	»
	18. <i>S. falloidearum</i>	+	0	4	»	не установлено
	19. <i>Cicinnobolus polygoni</i>	+	+	5	»	»
	20. <i>C. rosacearum</i>	+	+	5	»	»
	21. <i>C. compositarum</i>	+	+	5	»	»
	22. <i>Fusarium</i> sp.	+	0	3	»	»
	23. <i>Oospora hypoxylicola</i>	+	+	3	»	не менее 2-х
	24. <i>Aposphaeria caespitosa</i>	+	0	3	»	не менее 1-го
	25. <i>Gliocladium fimbriatum</i>	+	0	4	»	не установлено
	26. <i>Lejosepium aureum</i>	+	+	2	»	»
	27. <i>Monosporium agaricinum</i>	+	+	2	»	»
	28. <i>Oospora nectricola</i>	+	+	3	»	»
	29. <i>Sepedonium aureo-fulvum</i>	+	+	3	»	»
	30. <i>Mortierella isabellina</i>	+	+	3	»	»
	31. <i>Sepedonium</i> sp.	+	0	1	»	»
32. <i>Verticillium cercosporae</i>	+	+	2	»	»	
33. <i>V. aspergillus</i>	+	+	4	»	не менее 1-го	

+++ — сильное угнетение.
 ++ — среднее угнетение.
 + — слабое угнетение.
 0 — нет угнетения.

S. mycophilum, *S. olivaceum* — характеризуются тем, что синтезируют как внутри-, так и внеклеточные антибиотики, обладающие широким спектром активности (подавляют рост не менее 6 тест-организмов из 8 использованных), фунгицидным и фунгистатическим характером действия. По данным хроматографии на бумаге микопаразиты этой группы синтезируют до 4-х антибиотиков.

К слабым продуцентам относятся микопаразиты родов: *Aposphaeria*, *Cicinnobolus*, *Lejosepium*, *Mortierella*, *Oospora*, *Sepedonium*, а также некоторые виды *Sporotrichum* и *Verticillium*. Они отличаются тем, что синтезируют в основном внутриклеточные антибиотики значительно более узкого спектра активности и обладающие фунгистатическим характером действия. У большинства культур этой группы (у 11 из 17) не удалось установить примерное количество синтезируемых ими антибиотиков.

В качестве иллюстрации в таблице 6 выборочно приведены исходные данные по антибиотической активности трех наиболее типичных представителей от каждой группы продуцентов: *Darlucalium filum*, *Fusarium pucciniophilum*, *Sporotrichum mycophilum* (сильные), *Fusarium pteridis*, *Gliocladium album*, *Verticillium niveum* (средние) и *Sporotrichum falloidearum*, *Cicinnobolus compositarum*, *Oospora nectricola* (слабые продуценты антибиотиков).

Как показывают данные таблицы 6, при переходе от сильных к слабым продуцентам сужается спектр активности (до 2 тест-организмов из 8), исчезают антибиотики с фунгицидным действием.

Большое значение для биосинтеза антибиотиков имеет состав ферментационных сред, что, в первую очередь, относится к сильным продуцентам. У промежуточных, и особенно слабых продуцентов, влияние состава ферментационных сред на антибиотикообразование выражено слабо. В большинстве случаев наиболее благоприятной для синтеза антибиотиков оказалась среда с маннитом и соевой мукой. У сильных продуцентов увеличивается число сред, благоприятных для синтеза антибиотиков. Это связано, вероятно, со способностью таких микопаразитов синтезировать более сложный комплекс антибиотиков, причем синтез каждого из них, в свою очередь, может в значительной степени определяться составом ферментационных сред. Подтверждением сказанному служат исходные данные по антибиотической активности *Sporotrichum mycophilum* (сильный продуцент), *Verticillium niveum* (средний продуцент) и *Oospora nectricola* (слабый продуцент), выращенных на 6 ферментационных средах (табл. 7).

Кроме того, для сильных продуцентов, синтезирующих, как правило, сложный комплекс антибиотических веществ, удава-

Антибиотическая активность некоторых микопаразитов при глубинном культивировании на наиболее благоприятной для антибиотикообразования среде (экстракты мицелия, d зон угнетения в мм)

Группа продуцентов	Микопаразит (продукент)	Ферментационная среда	Тест-организм							
			Endomyces	Pestalotia	Kabatiella	Helminthosporium	Saccharomyces	Fusarium	Serphothalium	Aspergillus
Сильная	Darlusa filum	Глюкоза — пелтон	11ст42	10ст	12ст35	19ст	12ст	13ст	10ст	0
	Fusarium pucciniophilum	Сахароза — соевая мука	28	9ст26	9ст15	9ст12	7ст29	0	12ст	0
	Sporotrichum musophilum	Маннит — соевая мука	19ст35	9ст28	7ст23	8ст18	31ст	0	14ст	19ст
Средняя	Fusarium pteridis	Маннит — соевая мука	30	9ст12	10ст17	7ст14	28	0	0	0
	Gliocladium album	»	26	21	17	0	0	0	0	0
	Verticillium niveum	»	50	30	0	15ст20	0	0	0	0
Слабая	Sporotrichum falloidearum	Маннит — соевая мука	17	14	0	0	0	0	0	0
	Cicinnobolus compositarum	»	31	9ст23	0	0	0	0	0	0
	Oospora nectricola	»	25	10	0	0	0	0	0	0

Условные обозначения: «0» — нет угнетения, «ст» — зоны стерильные, остальные — замедленного роста.

Антибиотическая активность трех культур микопаразитов при культивировании на 6 средах (экстракт мицелия, d зон угнетения в мм)

Микопаразит	Тест-организм*	Ферментационная среда					
		сахароза — соевая мука	сахароза — NH ₄ NO ₃	крахмал — соевая мука	крахмал — NH ₄ NO ₃	маннит — соевая мука	маннит — NH ₄ NO ₃
Sporotrichum microspophilum	Saccharomyces	19ст	0	23ст	12	31ст	0
	Endomyces	8ст29	19	11ст30	7ст31	19ст35	22
	Pestalotia	22	+	+	18	28	0
	Kabatiella	21	0	21	+	7ст23	0
Verticillium niveum	Saccharomyces	21ст	19ст	0	19ст	28ст	21ст
	Endomyces	22	+	36	18	26	11
	Pestalotia	18	12	17	21	21	28
	Kabatiella	40	11	36	21	17	22
Oospora nectricola	Saccharomyces	0	0	0	0	0	0
	Endomyces	19	22	22	29	26	28
	Pestalotia	12	8	12	0	40	+
	Kabatiella	0	0	0	0	0	0

«ст» — стерильная зона; остальные — замедленного роста;

«0» — нет угнетения;

«+» — d зоны угнетения ≤ 6 мм;

* Приведены данные только по наиболее чувствительным тест-объектам.

лось с помощью хроматографии на бумаге довольно четко разделить эти вещества и выявить их количество. Для средних, и особенно слабых продуцентов, выявить компонентный состав оказалось очень затруднительным, а в некоторых случаях невозможным. Это связано, вероятно, со слабой активностью и неустойчивостью антибиотиков.

В табл. 8 приведены R_i антибиотиков, синтезируемых *Darlusa filum* (сильный продуцент), *Verticillium niveum* (средний продуцент) и *Cicinnobolus polygoni* (слабый продуцент).

Литературные данные по изучению антибиотической активности микофильных грибов, кроме *Trichoderma* и *Trichothecium*, нам неизвестны. При этом изучение антибиотической активности у указанных грибов, как правило, не связано с их микопаразитической природой.

По нашим данным, все 35 культур микопаразитов (33 ви-

Таблица 8

Rf антибиотиков, синтезируемых микопаразитами из различных групп продуцентов

Микопаразит	Антибиотик	Система растворителей					
		бутанол— 1:5N NH ₃	бутанол, насыщен- ный водой	бутилацетат, насыщенный водой	CCl ₄ +1% укусн. к-ты	CHCl ₃ , на- сыщенный водой	бензол— метанол— вода (2:1:1)
<i>Darluca filum</i>	I	—	0,80	0,0	0	0	0
	II	—	0,80	0,68	—	0,5—0,6	0,2
	III	—	0,80	0,75	—	0,75	0,5
	IV	—	0,70	0,80	0,4	0,85	0,6
<i>Cicinnobolus polygoni</i>	I	0—0,20	0—0,3	0—0,3	0—0,43	0—0,45	0—0,45
<i>Verticillium niveum</i>	I	0,70	0,70	0,76	0,40	0,75	0,55
	II	—	—	—	—	0	0

да из 14 родов) оказались в той или иной степени продуцентами внутриклеточных, а примерно $\frac{3}{4}$ из них (23 вида из 33) — и внеклеточных антибиотиков. Для сравнения укажем, что по данным чешских исследователей (Sasek, Musilek, 1967) только 6% изученных микоризных базидиомицетов обладали антибиотической активностью. Хорошо изучена антибиотическая активность таких почвенных антагонистов, как грибы рода *Aspergillus* и *Penicillium*. Показано, что число активных культур составляет у этих грибов от 50 до 100% от общего числа изученных (Оразов, Сизова, 1966; Никитина, Левина, Исабаева, 1962). Примерно таков же процент активных культур у актиномицетов, которые образуют большинство практически важных антибиотиков.

Следовательно, микопаразиты можно отнести к весьма перспективной, но малоизученной группе микроорганизмов — продуцентов противогрибных антибиотиков.

ВЫВОДЫ

1. Изучена антибиотическая противогрибная активность 35 культур (33 вида из 14 родов) микофильных грибов, а также их способность к росту на плотных (агаризованных) и жидких (глубинно) средах.

2. Установлено широкое распространение способности к синтезу противогрибных антибиотиков у микофильных грибов. Все изученные грибы способны при глубинном культивировании к синтезу внутриклеточных, а примерно $\frac{3}{4}$ из них (23 из 33 видов) — и внеклеточных противогрибных антибиотиков.

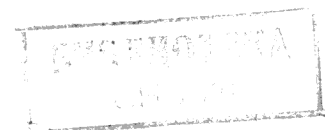
3. Изучены условия биосинтеза антибиотиков микофильными грибами при глубинном их культивировании. Отобраны благоприятные для образования антибиотиков ферментационные среды. Для большинства изученных грибов таковыми оказались среды с маннитом как источником углерода.

4. По общей антибиотической активности все изученные культуры микопаразитов можно примерно разбить на 3 группы: сильные (6 видов), средние (9) и слабые (17) продуценты. Первая группа характеризуется способностью к синтезу внутри- и внеклеточных антибиотиков с широким суммарным спектром активности, значительным угнетающим действием, наличием не менее 2—4 антибиотиков. Слабые продуценты синтезируют, как правило, только внутриклеточные антибиотики с узким спектром активности. Особенно активны грибы: *Darluca filum*, *Didymocladium ternatum*, *Fusarium pucciniophilum*, *Sporotrichum mycophilum*, *S. triumfettae*, *S. olivaceum*.

5. Все изученные микопаразиты способны в лабораторных условиях расти на ряде агаризованных и жидких сред. Лучшими источниками углерода при росте на плотных средах являются глюкоза, сахароза, маннит; менее благоприятно подсолнечное масло. Из испытанных источников азота (пептон, соевая мука, NH₄NO₃ + кукурузный экстракт, аспарагин) наименее пригоден аспарагин, особенно в сочетании с крахмалом и подсолнечным маслом.

6. При глубинном культивировании в жидких средах требования к источникам питания (азоту и углероду) качественно меняются. При этом оценку тем или иным источникам углерода можно давать только во взаимосвязи с конкретными источниками азота (и наоборот). Благоприятны для глубинного роста микопаразитов сочетания глюкозы или сахарозы с соевой мукой, подсолнечного масла с аспарагином.

7. По способности к синтезу антибиотических (противогрибных) веществ микофильные грибы можно отнести к перспективной группе микроорганизмов — продуцентов антибиотиков.



По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Антибиотическая активность гиперпаразита *Fusarium rusciniophilum* Sacc et Syd — С.-х. биология, 1969, т. IV, № 3, 403—407 (совместно с Г. С. Муромцевым, А. Р. Держинским, Н. С. Дроздовой, О. Л. Рудаковым).

2. Антибиотическая активность микофильных грибов. Материалы II Всесоюзного биохимического съезда, Ташкент, 1969 (совместно с Г. С. Муромцевым, А. Р. Держинским, О. Л. Рудаковым).

3. Микроорганизмы — продуценты пестицидов.— Научн. доклады Высшей школы, биол. науки, 1970, 6, 88—93 (совместно с Г. С. Муромцевым, В. Н. Агнестиковой, А. Р. Держинским).

4. Глубинное культивирование и антибиотическая активность микопаразита *Darlusa filum* (Viv-Bern) Cast. С.-х. биология, 1970, т. V, № 4 (совместно с Г. С. Муромцевым, А. Р. Держинским, Л. П. Дубовой, О. Л. Рудаковым).

5. Синтез противогрибных антибиотиков гиперпаразитами из рода *Gliocladium* Sda. Микология и фитопатология, 1971, 5, № 2, 137—142 (совместно с Г. С. Муромцевым, А. Р. Держинским, О. Л. Рудаковым).

6. Грибы-микопаразиты как продуценты фунгицидных антибиотиков. Изв. АН СССР, сер. биологическая, 1972, 5 (совместно с Г. С. Муромцевым, А. Р. Держинским).

7. Antibiotics activity of fungi-mycoparasites. VII Congress International de la Protection des Plantes. Resumes des Communications. Paris, 1970 (совместно с Г. С. Муромцевым, А. Р. Держинским, О. Л. Рудаковым).