

ACTINOMICETE ACVATICE CU POTENȚIAL DE BIOCONTROL AL FUNGILOR FITOPATOGENI

Artiomov Laurenția*, <https://orcid.org/0000-0002-4478-4375>

Bolocan Nistor, <https://orcid.org/0000-0003-2724-7719>

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, UTM, Chișinău, Republica Moldova

*e-mail: laurentia.artiomov@imb.utm.md

Summary. Fungal diseases of crops affect crop quantity and quality and have become a major impediment to the development of sustainable agriculture. The widespread use of synthetic fungicides leads to ecological problems, food contamination and serious damage to human health. Biocontrol of phytopathogens using actinomycetes is a less dangerous option. In this research we tested the antifungal activity of three actinomycetes strains from the genera *Streptomyces*, *Micromonospora* și *Actinomadura* from the water and silt of La Izvor lake. All strains had a moderate power to inhibit the development of the fungi *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*, but practically did not affect the development of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*.

Keywords: actinomycetes, phytopathogenic fungi, biological control.

Introducere

Stresul biotic, cum ar fi dăunătorii și agenții patogeni este unul din principalii factori de amenințare pentru producția de culturi agricole la nivel global. În agricultură, protejarea culturilor împotriva bolilor fungice este esențială pentru a asigura o roadă bogată și sănătoasă. Fungicidele utilizate în agricultura tradițională sunt substanțe de sinteză chimică, străine agroecosistemelor, ce reprezintă pentru biocenozele acestora un factor de stres. Multe pesticide sunt greu degradabile, cauzează contaminarea alimentelor, solurilor și apelor cu reziduuri toxice, afectează grav sănătatea oamenilor.

Astfel, măsurile de biocontrol a fitopatogenilor sunt considerate o abordare alternativă sigură și de succes. *Actinobacteriota* este unul dintre cele mai mari filumuri bacteriene care s-a răspândit în toate habitatele naturale și include numeroși membri, inclusiv recunoscuți ca agenți eficienți de biocontrol a diversilor fungi fitopatogeni. În prezent, este important să se caute noi tulpini care produc metaboliți antimicrobieni, deoarece unele preparate preexistente au eșuat din cauza dezvoltării rezistenței agenților patogeni la ele.

Numeroase cercetări au demonstrat că actinomicetele posedă un potențial important ca agenți de biocontrol ai agenților patogeni ai plantelor și ca promotori de creștere a plantelor [1, 10]. Deși majoritatea actinomicetelor studiate din perspectiva folosirii ca agenți de control a fitopatogenilor provin din sol, rizosfera plantelor, un număr impunător de lucrări științifice sunt consacrate și studierii potențialului biotehnologic al actinomicetelor din mediul acvatic [3, 11, 16]. Mediile puțin explorate, inclusiv ecosistemele acvatice, pot fi surse promițătoare de actinomicete rare, producătoare de compuși utili în diverse biotehnologii [5]. „Actinomicetele rare” sunt definite ca tulpini de actinomicete izolate mai rar decât cele ale *Streptomyces spp.*, chiar dacă este posibil să nu fie rare în mediu.

Subramani R. și Sipkema D. [12] în cadrul unui studiu amplu și îndelungat (2007-2017) al actinomicetelor noi și rare din mediul marin au determinat 46 compuși bioactivi noi, produși de actinomicetele genului *Micromonospora* și 8, proveniți de la cele din genul *Actinomadura*. Astfel, reieșind din sursele bibliografice, genurile *Streptomyces*, *Actinomadura* și *Micromonospora* posedă potențial de control a fungilor fitopatogeni.

Materiale și metode

A fost studiată activitatea antifungică a unor tulpini de actinomicete din genurile *Actinomadura* sp.2 (*Thermosporaceae*), *Streptomyces* sp.21 (*Streptomycetaceae*) *Micromonospora* sp.56 (fam. *Micromonosporaceae*). Actinomicetele genurilor *Streptomyces* și *Actinomadura* provin din apa lacului „La Izvor” (municipiul Chișinău), iar cele din genul *Micromonospora* – din mărul acestui lac. Aceste actinomicete au fost izolate în cadrul laboratorului *Colecția de Microorganisme Nepatogene* al *Institutului de Microbiologie și Biotehnologie*, UTM [3, 11]. Actinomicetele au fost cultivate 14 zile pe mediul nutritiv Gause 1. Activitatea antifungică a fost determinată conform metodei de difuziune a metaboliților cu utilizarea blocurilor din mediul cu culturile de actinomicete și a culturilor fungilor fitopatogeni: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* pe mediul Malt-Agar. Metoda este bazată pe capacitatea de difuziune a metaboliților produși de microorganismele studiate în profunzimea agarului și a acțiunii substanței active din zona de difuzie asupra culturilor-test. După 2 zile de incubare apar zonele de inhibiție (de liză) din jurul discurilor cu cultura actinomicetelor, diametrul cărora reflectă intensitatea antagonismului dintre actinomicete și fungi.

Rezultate și discuții

Pentru aprecierea activității antifungice a tulpinilor de actinomicete au fost testați 4 fungi fitopatogeni, care afectează un spectru larg de culturi agricole din Republica Moldova și cauzează pierderi economice enorme.

Alternaria alternata este în prezent considerată a fi o specie cosmopolită cu o gamă largă de gazde, inclusiv plante importante de cultură. Provoacă pătarea, putrezirea multor părți ale plantelor și alte boli. Este un agent patogen oportunist pentru peste 380 de specii gazdă de plante [4, 14].

Botrytis cinerea este una din cele mai distructive ciuperci fitopatogene ce cauzează putregaiul cenușiu la circa 230 specii de plante [13].

Fusarium solani este un complex de specii filogenetice similare morfologic, un important fitopatogen care cauzează putrezirea tuberculilor de cartofi, fructelor de tomate, ardei, pepene galben, a boabelor de cereale ș.a. [2, 9].

Fusarium oxysporum este un fitopatogen care afectează o gamă largă de gazde la care provoacă ofilirea fuzariană vasculară și putrezirea fuzariană. Putrezirea afectează predominant plantele cu organe de depozitare (tuberculi, bulbi, rizomi) [6].

În ultimii ani, actinobacteriile, inclusiv cele rare, au devenit din ce în ce mai recunoscute ca o sursă bogată de noi metaboliți bioactivi [7, 15]. Rolul de agenți de biocontrol a unor tulpini ce aparțin genurilor de actinomicete *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinomadura* a fost reflectat în multe publicații științifice. Astfel, LeBlanc [8] menționează că, în general, agenții de control biologic *Streptomyces* reduc semnificativ bolile fungice ale plantelor cu 56%, iar eficacitatea controlului biologic este mai mare în medii controlate și când bacteriile *Streptomyces* sunt aplicate sub presiune mare a bolii. În agricultură se utilizează preparate comerciale de biofungicide pe bază de actinomicete: Mycostop (*Streptomyces griseoviridis* strain K61), înregistrat în SUA, Canada și Uniunea Europeană; Actinovate SP (*Streptomyces lydicus* WYEC 108, înregistrat în SUA, Canada și Turcia. Speciile de *Micromonospora*, *Actinomadura* produc, de asemenea, compuși antibacterieni și antifungici care acționează pentru a proteja plantele de agenți patogeni [3, 7, 12].

În experimentele noastre tulpina de *Actinomadura* a avut o activitate antifungică moderată față de *Alternaria alternata* și *Botrytis cinerea*, exprimată prin diametrele în mm a zonelor de inhibare (DZI), respectiv 13,75 și 16,25. Inhibarea creșterii fitopatogenilor *Fusarium solani* a fost slabă (DZI-10), iar creșterea *Fusarium oxysporum* nu a fost afectată (DZI-0). Actinomicetele genului *Micromonospora* a avut putere de inhibiție medie față de *Botrytis cinerea* (DZI-15,3) și *Alternaria alternata* (DZI-11,5) și slabă față de *Fusarium solani* (DZI-9,5) și *Fusarium oxysporum* (DZI-8). Tulpina de *Streptomyces* a avut potențial mediu de inhibare a creșterii *Alternaria alternata*

(DZI-13,5) și *Botrytis cinerea* (DZI-11,17). Dezvoltarea coloniilor de *Fusarium solani* (DZI-13,5) și *Fusarium oxysporum* (DZI-13,5) a fost afectată nesemnificativ.

Toate actinomicetele studiate au demonstrat activitate de inhibare slabă (DZI-5-9) sau moderată (DZI – 10-19). Nici o tulpină nu a demonstrat activitate puternică de inhibare a fungilor fitopatogeni (DZI ≥ 20). Cei mai susceptibili funghi la activitatea antagonistă a actinomicetelor investigate au fost *Alternaria alternata* (DZI – 11,5-15,33) și *Botrytis cinerea* (DZI – 10-16,25). Cele mai rezistente la acțiunea actinobacteriilor au fost *Fusarium oxysporum* (DZI – 0-8) și *Fusarium solani* (DZI – 0-9,4). Eficiența antifungică a fost: *Actinomadura* (DZI – 0-16,25), *Streptomyces* (DZI – 8-13,5), *Micromonospora* (DZI – 8-15,33) [Tab].

Tabel

Inhibarea creșterii fungilor fitopatogeni de către actinomicetele izolate din lacul La Izvor

Genul actinomicetelor	Diametrul zonei de inhibiție a microorganismelor testate (DZI) mm			
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Actinomadura</i> (2)	13,75 $\pm$ 0,63	16,25 $\pm$ 0,48	10 $\pm$ 0,577	0
<i>Micromonospora</i> (56)	11,5 $\pm$ 0,58	15,33 $\pm$ 1,45	9,5 $\pm$ 0,33	8 $\pm$ 0
<i>Streptomyces</i> (21)	13,5 $\pm$ 1,2	11,17 $\pm$ 0,65	9,6 $\pm$ 0,33	8 $\pm$ 0

Concluzii

Preocuparea crescândă a consumatorilor, opiniei publice cu privire la utilizarea fungicidelor sintetice și dezvoltarea rezistenței de către fungii fitopatogeni la aceste fungicide conduce la căutarea unei strategii alternative de control. Actinomicetele izolate din diverse medii au demonstrat un potențial promițător pentru controlul biologic al ciupercilor fitopatogene. Deși există un număr impresionant de investigații consacrate acestui subiect, utilizarea actinomicetelor din mediile acvatice ca agenți de biocontrol al fungilor fitopatogeni este mai puțin studiată.

Rezultatele experimentelor noastre indică în mod clar, că izolatele de actinomicete *Actinomadura* sp.2, *Streptomyces* sp.21, *Micromonospora* sp.56 din apa și mărul (sedimentele) lacului La Izvor au fost capabile să restricționeze moderat creșterea *in vitro* a culturilor ciupercilor fitopatogene *Alternaria alternata* și *Botrytis cinerea*. Aceste tulpini pot fi recomandate pentru continuarea cercetărilor în vederea utilizării în calitate de agenți de biocontrol a acestor fitopatogeni în experimente *in planta*. Actinomicetele *Actinomadura* sp.2, *Streptomyces* sp.21, *Micromonospora* sp.56 ar putea fi utilizate pentru a formula amestecuri de microorganisme benefice în scopul la ameliorării eficienței produselor de biocontrol, ce ar contribui la extinderea bunelor practici agricole în gestionarea sănătății plantelor.

Mulțumiri: Autorii își exprimă profunda recunoștință colegilor doctor șt. Bârsa Maxim și doctor hab. Burțeva Svetlana pentru furnizarea tulpinilor de actinomicete pentru cercetare și consultanță.

Notă. Lucrarea a fost realizată în cadrul subprogramului de cercetare 020101 InBioS „Soluții biotehnologice inovative pentru agricultură, medicină și protecția mediului”.

Referințe bibliografice

1. Artiomov L. Unele considerente vizând rolul actinomicetelor în agricultura durabilă. In: *Știința în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective*, Ed. 8, Bălți, RM, 2024, p. 169-175 https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/206622
2. Bahadur A. Current status of *Fusarium* and their management strategies. In *Fusarium-An Overview of the Genus*. 2021, IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/79176>
3. Burtseva S., Byrsa M. The ability of actinobacteria from silt sediments of the lake system "La Izvor" (Chisinau) to delay the growth of phytopathogenic microorganisms. In: *Biology and*

- sustainable development*, Ed. 20, Bacău, Romania: 2022, Ediția 20, p. 31. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/169659
4. Chaverri, P., Samuels, G. J. Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology. *Evolution*, 2013, 67(10), p. 2823-2837. <http://dx.doi.org/10.1111%2Fevo.12169>
 5. Dhakal D., Pokhrel A.R., Shrestha B., Sohng J.K. Marine rare actinobacteria: Isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. In: *Frontiers in microbiology*, 2017, 8, 1106. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01106>
 6. Edel-Hermann V., Lecomte C. Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. In: *Phytopathology*, 2019, 109(4), p. 512-530. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW>
 7. Lahoum A., Aouiche A., Bouras N., Verheeecke C. Antifungal activity of a Saharan strain of *Actinomadura* sp. ACD1 against toxigenic fungi and other pathogenic microorganisms. In: *Journal de Mycologie Medicale*, 2016, 26(3), p.193-200. <https://core.ac.uk/reader/163105040>
 8. LeBlanc, N. Bacteria in the genus *Streptomyces* are effective biological control agents for management of fungal plant pathogens: a meta-analysis. In: *BioControl* , 2022, 67, p. 111–121 <https://doi.org/10.1007/s10526-021-10123-5>
 9. Mihnea N., Lupașcu G., Gavzer S. Reacția unor linii de perspectivă de tomate la fungii *Alternaria alternata* și *Fusarium* spp. In : *Știința agricolă*, 2018, 1,p. 50-54. ISSN 1857-0003. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/65029
 10. Patel Ishita B., Jhala Y. K., Patel H. K., Patel, M. H., Shelat H. N., Vyas R. V. Evaluation of Antagonistic Potential of Actinomycetes against Phytopathogenic Fungi. In: *Ind. J. Pure App. Biosci*, 2021, 9(2), 138-150. <http://dx.doi.org/10.18782/2582-2845.8633>
 11. Sîrbu, T., Burțeva, S., Bîrsa, M., Balan, L., Slanina, V., Țurcan, O., & Moldovan, C. Study of the microbial biodiversity of the Lake La Izvor, Chisinau municipality. In: *ACROSS*, 2022, 6(2), p.56-66
 12. Subramani R., Sipkema D. Marine rare actinomycetes: a promising source of structurally diverse and unique novel natural products. In: *Marine drugs*, 2019, 17(5), p. 249. <https://doi.org/10.3390/md17050249>
 13. Walker A. S., Gladieux P., Decognet, V., Fermaud M., Confais J., Roudet J., Fournier E. Population structure and temporal maintenance of the multi-host fungal pathogen *Botrytis cinerea*: causes and implications for disease management. In: *Environmental Microbiology*, 2015, 17(4), p. 1261–1274. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12563>
 14. Woudenberg, J. H., Groenewald, J. Z., Binder, M., Crous, P. W. *Alternaria* redefined. In: *Studies in mycology*, 2013, 75(1), p. 171-212. <https://doi.org/10.3114%2Fsim0015>
 15. Zamora-Quintero A. Y., Torres-Beltrán M., Guillén Matus, D. G., Oroz-Parra I., Millán-Aguiñaga N. Rare actinobacteria isolated from the hypersaline Ojo de Liebre Lagoon as a source of novel bioactive compounds with biotechnological potential. In: *Microbiology*, 2022, 168(2), 001144. <https://doi.org/10.1099%2Fmic.0.001144>
 16. Zothanpuia Passari, A. K., Yadav M. K., Singh B. P. *In vitro* evaluation of antimicrobial activities and antibiotic susceptibility profiling of culturable actinobacteria from fresh water streams. In: *Indian J. of experimental Biology*, 2018, 56, p 665-673 <https://imsear.searo.who.int/bitstreams/44e1c7ab-48df-45b4-b80a-f0083f9b2308/download>