

Отбор штаммов рода *Bacillus* с противогрибковой активностью для создания эффективных биопрепаратов

Ботбаева Ж.Т.¹, Мустафина И.Е.¹, Аюпова А.Ж.¹, Науанова А.П.², Жамангара А.К.¹

¹РГП «Национальный центр биотехнологии Республики Казахстан», Астана;

²Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина, Астана

Мақалада Ақмола облысының топырақтарынан бөлініп алынған *Bacillus* туысына жататын бактерия штаммдарының антагонистік белсенділік көрсеткіштері келтірілген. Топырақ микроағза-антагонистері фитопатогендік микромицеттердің дамуын тежеуге қабілетті. Авторлар ұсынып отырған микроағза-антагонистері оңай культивирленеді, ұзақ уақыт бойы сақталады, сонымен қатар олардың споралары егінді материалдарды өндеуді жеңілдетеді және табиғи ортада биопрепараттың әсер ету уақытын ұзартады. Штаммдардың фунгицидтік белсенділігі бойынша жүргізілген тестілеу нәтижелері, зерттелінген штаммдардың үшеуі фитопатогенді саңырауқұлақтарды тежеу белсенділігі бойынша жоғары екендігі тәжірибелер арқылы дәлелденген.

In the article presents data of the antagonistic resulted activity for strains of bacteria. The active strains of the bacteria genus *Bacillus* isolated from soil of Akmola region. Soil microorganisms' antagonists can inhibit the development of pathogenic fungi. Featured authors of bacteria-antagonists are easily cultured, can be stored for a long time, and also used in the form of spores, which facilitates the inoculation of seed and prolong the duration of the biological product in the environment. The experiments for testing fungicidal activity of strains revealed that the three strains have the highest antagonistic activity against phytopathogenic fungi.

Ежегодный ущерб, наносимый вредителями и болезнями сельскохозяйственным культурам, по данным организации по продовольствию и сельскому хозяйству ООН, составляет примерно 20–25 % потенциального мирового урожая продовольственных культур. Поэтому роль защиты растений в увеличении производства и сохранении сельхозпродуктов огромна [1]. В северном регионе — основной житнице республики — чрезвычайную опасность для яровой пшеницы представляют корневая гниль, бурая ржавчина и септориоз, которые проявляются почти ежегодно и в зависимости от природных условий года и других факторов распространяются на площади до 3–5 млн. га, потери урожая достигают 15–20 % и более [2]. Основной урон сельскому хозяйству наносят фитопатогенные грибы родов *Fusarium*, *Bipolaris*, *Penicillium* и др., являющиеся возбудителями различных гнилей, пятнистостей, увядания, скручивания листьев и других заболеваний растений. Биологический контроль фитопатогенов *in vitro* является до сих пор одним из основных критериев отбора практически полезных штаммов. Для селекции бактерий-антагонистов против возбудителей наиболее распространенных болезней зерновых и овощных культур были выделены изоляты спорообразующих микроорганизмов.

Анализ тенденции развития в области защиты растений в России, США и других странах показал, что против фитопатогенных организмов определенную перспективу имеет применение биологического метода, в частности, микроорганизмов-антагонистов и индуцированной устойчивости растений. Ученые многих стран мира отдают предпочтение использованию биологических препаратов бактериального происхождения [3]. Так, в связи с биологизацией и экологизацией сельскохозяйственного производства направление по созданию биопрепаратов для защиты растений становится все более актуальным. Существует множество биологических функций микроорганизмов, направленных на осуществление биосинтеза метаболитов различного действия. Потенциальным объектом агробиотехнологии являются ризосферные PGPR (от Plant Growth-Promotion Rhizobacteria), широко используемые для разработки биологических средств защиты растений от фитопатогенов, а также биопрепаратов, стимулирующих рост и повышающих продуктивность растений [4].

Механизм действия этих микроорганизмов на фитопатогены включает конкуренцию за источник питания, эффективную колонизацию ризосферы, синтез антибиотических и росторегулирующих веществ [5, 6]. Так, использование микробных культур на основе микроорганизмов-антагонистов фитопатогенов позволяет не только надежно контролировать развитие бактериальных и грибных инфекций в течение всего вегетационного периода, но и во время хранения сельскохозяйственной продукции или посевного материала [7].

Известно, что 60–90 % живой биомассы почвы составляют микроорганизмы, физиолого-биохимическая активность которых в 100–1000 раз выше, чем макроорганизмов. Почвенные микроорганизмы-антагонисты способны подавлять развитие фитопатогенных микромицетов, в том числе и фузариев, за счет секреции в среду экзометаболитов с выраженной антибиотической активностью, а также ферментативного разрушения гифов грибов и жесткой конкуренции за жизненное пространство и питательный субстрат. Использование бактерий рода *Bacillus* как биоагентов микробных препаратов имеет ряд преимуществ: данные микроорганизмы легко культивируются, могут длительное время храниться, а также использоваться в виде спор, что облегчает инокуляцию посевного материала и пролонгирует длительность действия биопрепарата в природной среде [8]. Российские ученые уделяют большое внимание использованию для биологической защиты растений бактерий из родов *Pseudomonas* *Bacillus* [9].

Отечественных разработок по созданию биологических фунгицидов очень мало, поэтому данная проблема для нас представляет огромный интерес, так как Казахстан полностью зависит от ввозимых иностранных пестицидов и биофунгицидов.

Материалы и методы

Отбор антагонистов фитопатогенов проводили методом диффузии в агар с применением агаровых блоков. Суспензию тест-культуры фитопатогена вносили в расплавленный агар и разливали его в чашки Петри. Пробочным сверлом (диаметр 6–8 мм), предварительно опущенным в спирт и обожженным в пламени горелки, вырезают 4 агаровых блока. На поверхность агара после застывания помещали агаровые блоки, вырезанные с питательной средой СПА, где можно культивировать бактерии-антагонисты. После агаровые блоки засеивали исследуемыми культурами. Чашки с агаровыми блоками инкубировали 7 суток при температуре 30 °С. Суспензию тест-культуры фитопатогена вносили в среду из расчета 10 мл на 100 мл питательной среды.

Результаты и их обсуждение

Биологический контроль фитопатогенов *in vitro* является до сих пор одним из основных критериев отбора практически полезных штаммов. Для селекции бактерий-антагонистов против возбудителей наиболее распространенных болезней зерновых и овощных культур были выделены изоляты спорообразующих микроорганизмов.

Целью нашей работы являлось изучение противогрибковой активности бактерий рода *Bacillus* для создания в дальнейшем на их основе эффективных биопрепаратов. Проведена проверка выделенных изолятов спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* на антагонистическую активность против фитопатогенных грибов в условиях *in vitro*.

Нами были взяты на проверку антагонистической активности 10 штаммов рода *Bacillus*, выделенных из почв Акмолинской области спорообразующих микроорганизмов. В качестве тест-объектов при определении антагонистического спектра бактерий использовали штаммы грибов *Fusarium oxysporum* 91, *Fusarium heterosporum* 84 и *Alternaria alternata* А8, взятых из коллекции Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина, кафедры агрохимии и почвоведения. Данные грибы являются возбудителями наиболее распространенных болезней растений.

Особенности воздействия метаболитов бактерий группы *Bacillus* на развитие мицелия проявлялись в следующем. Вокруг колоний бактерий группы *Bacillus* формируется округлая, четко выраженная зона подавления роста мицелия гриба. На границе зоны подавления роста гриба и колонии бактерий сформировался ободок, чуть приподнятый над средой.

Результаты микроскопирования мицелиальной клетки гриба *A.Alternata* А8 представлены на рисунках 1 и 2. При микроскопировании подавленного мицелия просматриваются морфологические изменения клеток мицелия. Они заметно округляются, укорачиваются в гифах, наблюдается грануляция цитоплазмы, происходит образование хламидоспор, на концах конидий образуются пузырьвидные вздутия (рис. 2).

Рис. 1. Мицелий гриба *A. alternata A8*Рис. 2. Подавление гриба *A. alternata A8*

Показатели антагонистической активности выделенных штаммов бактерий рода *Bacillus* по отношению к фитопатогенным грибам приведены в таблице 1.

Таблица 1

Антагонистическая активность бактерий рода *Bacillus* по отношению к фитопатогенным грибам

№	Наименование культуры	<i>F. oxysporum</i> 91	<i>F. heterosporum</i> 84	<i>A. alternata A8</i>
1	<i>Bacillus</i> sp. 31	30,0±0,50	39,7±0,45	28,3±0,29
2	<i>Bacillus</i> sp. 46	8,33±0,50	7,00±0,76	5,0±0,29
3	<i>Bacillus</i> sp. 18	12,67±0,50	25,33±0,76	25,0±0,29
4	<i>Bacillus</i> sp. 33	13,6±0,50	3,33±0,76	5,0±0,29
5	<i>Bacillus</i> sp. 29	18,0±0,50	14,33±0,76	18,0±0,29
6	<i>Bacillus</i> sp. 38	14,33±0,50	12,33±0,76	5,0±0,29
7	<i>Bacillus</i> sp. 43	15,0±0,50	13,67±0,76	15,0±0,29
8	<i>Bacillus</i> sp. 2	45,0±0,50	41,7±0,76	38,0±0,29
9	<i>Bacillus</i> sp. 9	33,3±0,29	21,7±0,29	36,7±0,58
10	<i>Bacillus</i> sp. 40	8,0±0,50	7,33±0,76	5,0±0,29

Как показывают данные таблицы 1, в результате антагонистического действия бактерий рода *Bacillus* на фитопатогенные грибы вокруг колоний бактерий наблюдается отсутствие зоны роста гриба. Наиболее сильными антагонистическими свойствами по отношению к *F. heterosporum* 84 обладали бактерии *Bacillus* шт. 2, *Bacillus* шт. 31, *Bacillus* шт. 9, *Bacillus* шт. 18. Диаметр зон подавления роста гриба колебался в пределах от 21 до 41 мм. Диаметр в пределах 3–14 мм отмечен у 6 испытываемых штаммов бактерий по отношению к *F. heterosporum* 84. Активность против гриба *F. oxysporum* 91 проявили бактерии *Bacillus* шт. 31, *Bacillus* шт. 2, *Bacillus* шт. 9, *Bacillus* шт. 29, зона подавления мицелия колебалась в пределах 18–45 мм. Активность против гриба *A. Alternata A8* проявили бактерии *Bacillus* шт. 31, *Bacillus* шт. 2, *Bacillus* шт. 9, *Bacillus* шт. 29, *Bacillus* шт. 18, зона подавления мицелия колебалась в пределах от 18 до 38 мм. По тестированию фунгицидной активности штаммов бактерий было выявлено, что все штаммы давали четко выраженную границу между бактериальной и грибной культурами.

В результате проведенных экспериментов были отобраны 3 активных штамма микроорганизмов (*Bacillus* шт. 31, *Bacillus* шт. 2, *Bacillus* шт. 9) с наибольшей антифунгальной активностью по отношению к фитопатогенным грибам и на их основе наработана культуральная жидкость. Диаметр зон подавления роста гриба *F. oxysporum* 91 колебался в пределах от 23,3 до 45 мм. Диаметр в пределах 21,7–41,7 мм отмечен у отобранных штаммов бактерий по отношению к *F. heterosporum* 84. Активность против гриба *A. alternata A8*, зона подавления мицелия колебалась в пределах 25 до 36,7 мм.

Далее нами был поставлен повторный опыт по отношению к фитопатогенам. Результаты исследования показаны на рисунках 3 и 4.



Рис. 3. Антагонистическая активность бактерий рода *Bacillus subtilis* um.2 по отношению к *F. heterosporum* 84

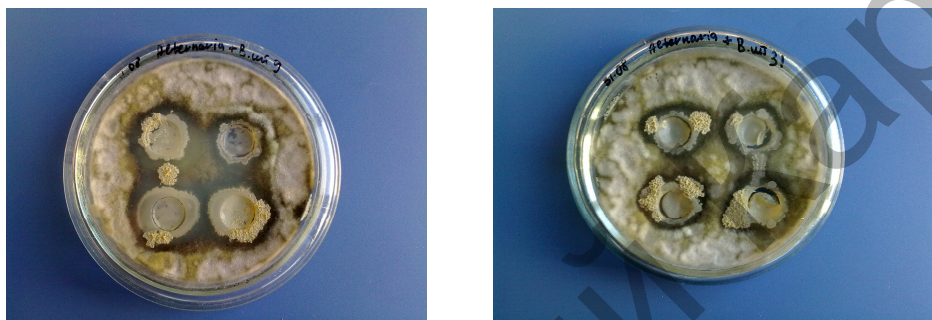


Рис. 4. Антагонизм штаммов бактерий группы *Bacillus* um. 31и *Bacillus* um. 9 по отношению к *A.alternata* A8

При изучении штамма *Bacillus* um. 2 выявлено, что он обладает наиболее сильным антибиотическим действием по отношению ко всем исследуемым фитопатогенным грибам. Сильно выраженный антагонизм он проявил особенно в отношении фитопатогенных грибов рода *Fusarium oxysporum* 91, где прозрачная зона достигла 46,0 мм, эффективность подавления роста гриба *F. heterosporum* 84 также была высокой — 42,0 мм. В отношении остального фитопатогена — *A.Alternata* A8 проявил среднюю степень антагонизма. Средний радиус зоны лизиса данного штамма составляет 41,5 мм. Из числа исследуемых тест-культур штамм *Bacillus* шт. 9 проявлял ярко выраженное антагонистическое действие только по отношению к двум фитопатогенам — зона подавления *A. alternata* A8 и *F. oxysporum* 91 составляет от 36,7 до 33,3 мм. При изучении антибиотического действия штамма *Bacillus* sp. 31 установлено, что он ингибирует развитие всех изучаемых фитопатогенных грибов. При подсевах фитопатогенов отмечен рост штамма в виде волнообразного полукруга и в радиусе 28,3 мм для гриба *A.Alternata* A8, 30,0 мм — для гриба *F. oxysporum* 91, 39,7 мм — для гриба *F. heterosporum* 84.

Отобранные активные штаммы-антагонисты были идентифицированы генно-молекулярными, а также классическими методами исследования. На основании изученных методов штамм *Bacillus* sp. 31 отнесен к виду *Bacillus cereus*, штамм *Bacillus* sp. 2 — к виду *Bacillus subtilis*, штамм *Bacillus* sp. 9 — к виду *Bacillus cereus*.

Выводы

В настоящее время перспективным направлением является разработка безопасных и эффективных биологических средств борьбы с патогенными грибами и микроорганизмами, которая предполагает широкое применение препаратов на основе бактерий-антагонистов и их метаболитов, проявляющих активность против широкого спектра грибных патогенов. Наибольшей антифунгальной активностью из всех исследованных штаммов по отношению к фитопатогенным грибам обладали штаммы бактерий *Bacillus subtilis* 2, *Bacillus cereus* 31 и *Bacillus cereus* 9.

В заключение можно сказать, что отбор активных штаммов позволит рекомендовать бактерио-антагонистов для создания на их основе высокоэффективных экологически безопасных препаратов защиты растений от заболеваний, вызываемых патогенными грибами.

Список литературы

1. Газета «Казах Зерно. kz» 2009. — № 5 (5). 20 июля.
2. Койшибаев М., Пономарева Л.А. Вредоносность болезней яровой пшеницы с воздушно-капельной инфекцией в Северном Казахстане // Вестн. сельхоз. науки Казахстана. — 2008. — № 8. — С. 15–19.
3. Morgounov A., Rosseva L. and Koyshibayev M. Leaf rust Wheat in Northern Kazakhstan and Siberia incidence virulence and breeding for resistance // Australian Journal of Agricultural Research. — 2007. — № 56. — P. 847–853.
4. Maurhofer M., Keel C., Schider C. et al. Disease control and pest management, Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strains CHAO on its disease suppressive capacity // Phytopathology. — 1992. — № 82. — P. 190–195.
5. Pfender W.F., Kraus J. and Loper J.E. A genomic region from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 required for pirrolnitrin production and inhibition of *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat straw // Phytopathology. — 1993. — № 83. — P. 1223–1228.
6. Надькта В.Д. Перспективы биологической защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов // Защита и карантин растений. — 2004. — № 6. — С. 26–28.
7. Боронин А.М., Кочетков В.В. Биологические препараты на основе псевдомонад // АГРО XXI. — 2000. — 140 с.
8. Benizri E., Baudon E., Guckert A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria // Biocontrol science and technology. — 2001. — № 11. — P. 557–574.
9. Штерншис М.В., Джалилов Ф.С., Андреева И.В. и др. Биопрепараты в защите растений. — Новосибирск, 2000. — 128 с.
10. Кузин А.И., Кириченко П.М., Кузнецова Н.И. и др. Фунгицидные свойства штамма *Bacillus subtilis* // Сельскохозяйственная микробиология в XVIII–XIX веках: Материалы Всерос. конф. — СПб., 2001. — С. 30.

УДК 57.083/619:578.835

Оптимизация duplex-ПТР метода для выявления провируса лейкоза крупного рогатого скота

Каирова М.Ж.¹, Сарина Н.И.²¹ РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, Астана;² РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, Астана

Duplex-ПТР әдісін қою үшін ИФТ-да позитивті, «сұр», яғни күмән тудыратын, аумақтағы және негативті нәтиже көрсеткен ІҚМ қанынан бөлінген ДНК-үлгілері алынды. Зерттеу нәтижесінде көрсетілгендей, әзірленген ПТР әдісі ИФТ-да кейбір позитивті, «сұр» аумақтағы және негативті үлгілерден ІҚМ лейкоз провирусын анықтауға мүмкіндік береді, сонымен қатар ІҚМ α -Globin генинің ішкі бақылауына сәйкес келетін ПТР-өнімдері ДНК үлгілерінен айқындалды. ІҚМ геномінде интеграцияланған провирустың геномы әр түрлі мөлшерде болуы мүмкін. Сол себепте әзірленген duplex-ПТР әдісінде ДНК-нің және провирустың генине негізделген праймерлердің концентрациясы ішкі бақылау гендеріне спецификалы праймерлердің концентрациясына қарағанда жоғары болуы тиіс.

For the duplex-PCR analysis we used ELISA-positives, ELISA-indeterminate and ELISA-negative DNA hosts samples that were isolated from a blood of cows. Our results showed that developed in this work duplex-PCR method may be applied to detect Bovine leukemia provirus in some ELISA-positive, ELISA-indeterminate and ELISA-negatives hosts. What is more PCR-products corresponded to internal control α -Globin gene of cattle may be amplified by the duplex-PCR method. Depend on viral DNA copy number integrated in host's genome an increased DNA concentration in a PCR mix can be applied with increasing of concentration of pair primers that is targeted to proviral *env* gene in compare to pair primers are targeted to internal control gene to improve the duplex-PCR amplification.

Лейкоз крупного рогатого скота (ЛКРС) является широко распространенным заболеванием и наносит огромный ущерб, связанный с гибелью и преждевременной выбраковкой высокопродуктивных коров, снижением продуктивности, качества молока и рождением телят с иммунодефицитами [1].

ЛКРС — хроническая инфекционная болезнь, вызываемая РНК-содержащим вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС или BLV — bovine leukosis virus) из семейства *Retroviridae*. Лейкозом болеет крупный рогатый скот (КРС) всех возрастов, но в основном молочных пород. Вначале заболевание протекает бессимптомно, а затем переходит в персистентный лимфоцитоз (persistent lymphocytosis (PL)) и (или) образует опухолевидные разрастания в кроветворных и других органах и тканях. Клинически болезнь проявляется чаще у животных в возрасте старше 4 лет [2].