

ВЛИЯНИЕ ХИТИНОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ВЕРМИКОМПОСТА ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ НА ПОДАВЛЕНИЕ РОСТА ХЕРМЕСА СИБИРСКОГО

ДЫДЫМОВ Н.А., БУ «Ханты- мансийская государственная медицинская академия»
ЛЕОНОВА Л.В., БУ «Ханты- мансийская государственная медицинская академия»
РЫБЬЯКОВА Н.Н., БУ ХМАО-ЮГРЫ «Природный Парк «Самаровский чугас»
ЛЕОНОВ В.В., БУ «Ханты- мансийская государственная медицинская академия»
СОКОЛОВА Т.Н. БУ «Ханты- мансийская государственная медицинская академия»

Хермес сибирский относится к хоботным сосущим насекомым тлям, который поражает как хвою, так и молодые побеги, кору и шишки кедровых культур. В работе проведено изучение влияния хитинолитической активности бактерий в отношении хермеса сибирского. Хитинолитические бактерии были выделены из биогумуса, приготовленного из копролитов ассоциации дождевых червей, и идентифицированы с помощью бактериологического метода и хромато-масс-спектрологии MALDI-TOF как *Bacillus pumilus*, *B.subtilis*, *Micrococcus roseus*, *Pseudomonas stutzeri*, *P. Alcaligenes*. С помощью вискозиметрического метода по снижению вязкости коллоидного хитина 48 ч бульонной культурой хитинолитических микроорганизмов, количественно определена их хитинолитическая активность. Выявлено, что наибольшей хитинолитической активностью обладают бактерии рода *Bacillus* и *Pseudomonas*. По результатам полевых испытаний, проведенных на саженцах сосны сибирской кедровой, выявлено уменьшение степени зараженности сибирским хермесом до 47% при использовании штамма *B. pumilus*. При обработке саженцев штаммом *P. Stutzeri* степень зараженности сибирским хермесом саженцев сосны сибирской кедровой снижалась всего на 29%. Все протестированные нами штаммы показали высокие значения снижения степени зараженности сибирским хермесом саженцев сосны сибирской и могут быть рекомендованы для использования в борьбе с хитиносодержащими вредителями растений. Таким образом, в дальнейшем для создания биопрепарата и его использования в лесном хозяйстве для борьбы с хермесом сибирским в условиях Северного региона будут использованы штамм *Bacillus pumilus* 215 или его ассоциация *Pseudomonas stutzeri* 3.

Ключевые слова: вермикомпост, дождевые черви, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pinus sibirica*, хермес сибирский, хитинолитическая активность, лесное хозяйство, вискозиметрический метод, среда Спицайзена.

Для цитирования: Дыдымов Н.А., Леонова Л.В., Леонов В.В., Рыбьякова Н.Н., Соколова Т.Н. Влияние хитинолитических бактерий вермикомпоста дождевых червей на подавление роста хермеса сибирского //Аграрный вестник Верхневолжья. 2017. №1(18).С.

Введение. Хермес сибирский *Pineus cembrae* из отряда *Hemiptera*, подотряда *Sternorrhyncha*, надсемейства *Aphidoidea*, семейства *Adelgidae* [1]. Хермес сибирский относится к хоботным сосущим тлям, то есть является обыкновенной тлей. Поражает как хвою, так и молодые побеги, кору и шишки кедровых культур. В результате, растения покрываются белым пушком и выделениями вредителя. Хермес сибирский широко распространен в местах произрастания сосны кедровой сибирской в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре и на Урале. Пораженность хермесом деревьев сосны кедровой в отдельные годы достигает 85% [2]. В настоящее время против хермеса сибирского используют такие радикальные методы, как обрезка побегов с галлами, обработка инсектицидами. Указанные методы профилактики и уничтожения хермеса сибирского малоэффективны и низкоизбирательны. Сказанное выше делает актуальным поиск новых средств борьбы с хермесом сибирским.

Целью нашей работы явилось выделение и идентификация хитинолитических бактерий, определение возможности подавления развития сибирского хермеса на саженцах сосны сибирской кедровой хитинолитическими бактериями с перспективой создания на их основе биопрепарата, подавляющего размножение хермеса сибирского.

Материалы и методика исследования. В качестве источника хитинолитических микроорганизмов был использован биогукус, приготовленный из копролитов ассоциации дождевых червей *Lumbricus rubellus*, *Aporrectodea caliginosa*, *A. longa* и *A. rosea* (Удобрение «Биогукустин», ООО «НПП Экотехноцентр»).

Для выделения хитинолитических микроорганизмов использовали селективную среду Спицайзена [3, с.823], в которой единственным источником углерода служит хитин. Состав среды (в г/л): дрожжевой экстракт – 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; KH_2PO_4 – 1,36; pH среды – 7,0. Посевы выращивали в течение двух суток при 28°C. Выделенные микроорганизмы идентифицировали по совокупности морфологических, культуральных и биохимических свойств [4, с.799], а также по результатам хромато-масс-спектрологии MALDI-TOF.

Хитинолитическую активность (ХА) определяли вискозиметрически по снижению вязкости коллоидного хитина под действием супернатанта 48 ч бульонной культуры хитинолитических бактерий [5, с.69]. В вискозиметр Освальда помещали реакционную смесь, содержащую 0,45 мл 0,1М калий-фосфатного буфера (pH 6,75); 0,9 мл коллоидного хитина (4 мг/мл); 0,15 мл супернатанта. Замеры времени истечения реакционной смеси начали сразу же после добавления супернатанта и продолжали в течение 120 мин с интервалом 30 мин при температуре 37°C.

Расчет активности проводили по формуле [6]:

$$XA = \left(\frac{\left(\lg \frac{(f_s - f_0)}{f_t - f_0} 10^3 \right)}{t} \right)$$

где XA – хитинолитическая активность фермента в условных вискозиметрических единицах (ЕД);

f_0 – время истечения растворителя;

f_s – время истечения реакционной смеси при первом замере, тотчас после добавления фермента;

f_t – время истечения смеси через t мин после начала реакции;

t – интервал времени между замерами в мин.

Для определения возможности подавления развития хермеса сибирского на саженцах сосны сибирской кедровой (*Pinus sibirica*) были отобраны две грядки с саженцами, имеющими одинаковый состав почвы, находящимися в одинаковых условиях светового режима и естественной циркуляции воздуха. Эксперимент был проведен летом 2015 года с 1 июля по 31 августа включительно на базе БУ ХМАО-Югры «Природный парк «Самаровский чугас». Каждая грядка содержала 50 саженцев с одинаковой плотностью засева. Грядки саженцев экспериментальной группы один раз в 10 дней с помощью распылителя обрабатывались бульонной культурой испытуемых штаммов хитинолитических бактерий. Обработку проводили в течение дня в сухую погоду при достижении максимальной дневной температуры воздуха. Грядку саженцев контрольной группы оставляли необработанной. Каждый раз перед началом обработки на грядках экспериментальной и контрольной групп оценивали степень пораженности саженцев сибирским хермесом, от минимальной до максимальной. Минимальную степень принимали за 1-ю степень пораженности, максимальную зараженность – за 5-ю степень. Все результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследований. На селективной среде Спицайзена было выделено 5 бактериальных штаммов с XA. Все микроорганизмы относились к грамположительным (*Bacillus* spp., *Micrococcus* sp.) и грамотрицательным (*Pseudomonas* spp.) бактериям. По совокупности морфологических, биохимических свойств, а также результатам Масс-спектрологии MALDI-TOF чистые культуры хитинолитических бактерий были идентифицированы как:

- *B. pumilus* 215 (10^4 КОЕ/мл);
- *B. subtilis* 7 (10^4 КОЕ/мл);
- *M. roseus* 6 (10^2 КОЕ/мл);
- *P. stutzeri* 3 (10^3 КОЕ/мл);

- *P. alcaligenes* 1 (10^1 КОЕ/мл).

Доминирующие по численности микроорганизмы с ХА были бактерии рода *Bacillus* – 10^4 КОЕ/мл. Остальные таксоны микроорганизмов содержались в вермикомпосте в меньшем количестве от 10^1 до 10^3 КОЕ/мл.

В первой серии экспериментов была исследована способность выделенных штаммов расти на агаризованной и жидкой питательной среде Спицайзена. Наиболее интенсивный рост был характерен для бактерий рода *Bacillus* и *Pseudomonas*, *P. alcaligenes* отличалась низкой пролиферативной активностью и ХА этого штамма не определялась.

Деградацию хитина осуществляют гидролитические ферменты хитинолитического комплекса бактерий, включающего экзохитиназы и эндохитиназы и N-ацетилглюкозаминидаза. Экзохитиназы расщепляют димерные звенья полимерной цепи с невозстанавливающегося конца хитина, а эндохитиназа расщепляет хитобиозу до N-ацетилглюкозамина. Использование в качестве субстрата для определения ХА 0,2% коллоидного хитина позволяет выявить только экзохитиназную активность микроорганизма [7, с. 627]. Результаты исследования ХА выделенных штаммов микроорганизмов приведены в таблице 1. Во всех исследованных случаях супернатанты исследуемых культур снижали вязкость коллоидного хитина в среднем на 23,6%. Из всех изученных микроорганизмов, продуцентов хитиназ, наибольшей активностью обладали бактерии рода *Bacillus* и *Pseudomonas*.

Таблица 1- Хитинолитическая активность штаммов бактерий, выделенных из вермикомпоста

Микроорганизм	ХА, ЕД
<i>Pseudomonasstutzeri</i> 3	1,48±0,01
<i>Micrococcus roseus</i> 6	1,46±0,03
<i>Bacillus pumilis</i> 215	2,16±0,01
<i>Bacillus subtilis</i> 7	1,52±0,01

Бактерии рода *Bacillus* и *Pseudomonas* являются наиболее перспективными объектами для создания биопрепарата, которые можно использовать в борьбе с вредоносными насекомыми. Род *Bacillus* способен образовывать эндоспоры и сохранять жизнеспособность в значительном диапазоне температур; бактерии рода *Pseudomonas*, как и *Bacillus*, способны использовать в качестве источника углерода и энергии различные

органические вещества, что способствует их широкому распространению в экосистемах [8, с.214]. В суровых условиях Севера наличие этих биологических свойств может быть очень важным для выживания микроорганизмов. Поэтому для проведения полевых испытаний нами были выбраны штаммы – *B. pumilus 215* и *P. stutzeri 3*.

B. pumilus 215 – растет на обычных плотных питательных средах с образованием характерных изолированных колоний. В мясо-пептонном бульоне образует пленку при культивировании в течение 18-24 часов, на МПА непигментированные колонии S-формы, на кровяном агаре дает зону β-гемолиза.

Биохимические свойства: каталаза – положительный, гемолиз – положительный, лецитиназа – положительный, редукция нитратов – отрицательный, глюкоза – положительный, мальтоза – положительный, манит – отрицательный, сахароза – положительный, амилаза – положительный, оксидаза – положительный, разложение казеина – положительный.

P. stutzeri 3 – растет на обычных плотных питательных средах с образованием характерных изолированных колоний. На МПА пигментированные колонии S-формы, на кровяном агаре дает зону β-гемолиза. Биохимические свойства: каталаза – положительный, гемолиз – отрицательный, лецитиназа – положительный, редукция нитратов – положительный, лактоза – отрицательный, мальтоза – положительный, манит – отрицательный, сахароза – положительный, амилаза – положительный, оксидаза – положительный, фенилаланин – отрицательный, цитрат – отрицательный, уреазы – положительный.

Таблица 2 - Результаты динамики степени пораженности сибирским хермесом саженцев сосны сибирской кедровой в зависимости от обработки штаммами хитинолитических бактерий

День	Экспериментальный участок, обработанный штаммом		Контрольный участок
	<i>Bacillus pumilus 215</i>	<i>Pseudomonas stutzeri 3</i>	
1	3,4	2,8	2,9
10	3,2	2,7	3,1
20	2,9	2,3	3,1
30	2,7	2,2	3,1
40	2,3	2,1	3,1
50	2,1	2,0	3,1

60	1,8	2,0	3,7
----	-----	-----	-----

На основании проведенных биологических испытаний штаммов *B. pumilus 215* и *P. stutzeri 3* (таблица 2), установлено снижение степени зараженности саженцев сосны сибирской кедровой сибирским хермесом. Несмотря на высокую ХА обоих штаммов бактерий *in vitro*, наиболее эффективным в отношении хермеса сибирского оказался штамм *B. pumilis 215*. При обработке саженцев сосны кедровой наблюдалось снижение степени зараженности на 47%. При обработке саженцев штаммом *P. stutzeri 3* степень зараженности снижалась всего на 29%. Климатические условия всего экспериментального периода не были оптимальными для активности хитиназного комплекса микроорганизмов. В июле – августе 2015 г. аномально дождливое лето, среднесуточная температура составляла +15,5°C и +12,3°C соответственно [9]. Очевидно, что использование протестированных штаммов в более оптимальных условиях увеличит активность хитиназного комплекса штаммов и будет способствовать большему снижению степени пораженности.

Заключение. В условиях сурового сибирского лета способность к выживанию и проявлению ХА при низких температурах может иметь решающее значение для эффективной работы микроорганизмов. Все протестированные нами штаммы показали высокие значения **снижения степени зараженности сибирским хермесом саженцев сосны сибирской даже в условиях дождливого лета 2015 года и могут быть рекомендованы для использования в борьбе с хитиносодержащими вредителями растений. Таким образом, в дальнейшем для создания биопрепарата и его использования в лесном хозяйстве для борьбы с хермесом сибирским, в условиях Северного региона, будут использованы штамм *Bacillus pumilis 215* или его ассоциация с *Pseudomonas stutzeri 3*.**

ЛИТЕРАТУРА

1. National Center for Biotechnology Information
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>(дата обращения: 22.02.2016).
2. Кривец С. А., Коровинская Е. Н. Опасные фитофаги в селекционных культурах кедров сибирского// Защита и карантин растений.2009. №5. С. 42-44.
3. Jong F. E., Spitsayzen J. The physiological and genetic factors that influence the transformation of *Bacillus subtilis*// J Bacteriol. 1961. №81. С. 823-829.
4. Определитель бактерий Берджи / Ред. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П., Стейли Дж., Уильямс С. М.: Мир. 1997. Т.1, 2.С.799.

5. Шустер А. Г., Максимова Н. П. Состав и активность хитинолитического комплекса бактерий рода *Bacillus* // Вестник БГУ. 2008. № 2. С. 69-73.
6. Акатов А. К., Зуева В. С. Стафилококки. М.: Медицина. 1983.
7. Howard M. B., Ekborg N.A., Weiner R. M., Hutcheson S. W. Detection and Characterization of Chitinases and other Chitin-modifying Enzymes// J Ind Microbiol Biotechnol. 2003. С.627-35.
8. Соколова М. В. Хитинолитическая и антигрибная активность трех штаммов бактерии рода *Serratia* // Современная биотехнология в решении проблем защиты растений. С-Пб: Изд-во РАСХН, ВИЗР. 1995. № .С. 214-224.
9. Гисметео. URL:<https://www.gismeteo.ru/diary/4003/2015/8> (дата обращения: 22.02.2016).