

МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 579.64:632.95.024

БИОБЕЗОПАСНОСТЬ, ФИТОТОКСИЧНОСТЬ И АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ШТАММА *BACILLUS SP. С6* – АНТАГОНИСТА ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ

© 2015 г. А. Ю. Грабова, И. В. Драговоз, Л. В. Авдеева

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Исследованы биобезопасность, фитотоксичность и чувствительность к антибиотикам штамма *Bacillus sp. С6* – антагониста фитопатогенных бактерий и грибов. Установлено отсутствие вирулентности, токсичности и токсигенности исследуемого штамма. Показано, что штамм чувствителен к антибиотикам широкого спектра действия и не синтезирует экзометаболиты, токсичные для растений. Сделан вывод о возможности использования штамма *Bacillus sp. С6* как перспективного в качестве агента биоконтроля болезней растений.

Ключевые слова: *Bacillus sp. С6*, биобезопасность, фитотоксичность, антибиотикочувствительность

Современная стратегия защиты сельскохозяйственных растений, направленная на ограничение применения химических пестицидов, связана с разработкой и широким внедрением биологических, в том числе микробиологических методов борьбы с фитопатогенами различной природы.

Одним из наиболее перспективных направлений в борьбе с возбудителями заболеваний растений является использование биопрепаратов на основе бактерий из рода *Bacillus* (Сираева, 2012). Многие штаммы бацилл характеризуются высокой антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным микроорганизмам, а также выраженной способностью колонизировать ризосферу растений. Свойство бацилл образовывать споры обеспечивает им преимущества в почвенных микробиоценозах при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды (Romero et al., 2007).

Высокий уровень антагонизма бацилл по отношению к фитопатогенным бактериям и грибам связан с тем, что они синтезируют широкий спектр различных экзометаболитов, в том числе, с антибиотическими свойствами – циклолипопептиды: итурины, сурфактины, фенгицины и другие (Moynе et al., 2001). Однако некоторые из таких экзометаболитов могут в процессе онтогенеза угнетать рост и развитие растений. Поэтому при отборе штаммов бактерий, перспективных для создания препаратов для биоконтроля заболеваний сельскохозяйственных культур, учитывают не только антагонистическую активность конкретного штамма, а также его биобезопасность и отсутствие фитотоксического действия.

Многими исследователями высказывается предположение, что неконтролируемое попадание в окружающую среду штаммов бактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам создает угрозу распространения генов антибиотикорезистентности не только в пределах отдельных популяций микроорганизмов, но и на межпопуляционном уровне (WHO, 2007). Обмен генами устойчивости к антибиотикам может приводить к селекции резистентных штаммов не только сапробионтных бакте-

Адрес для корреспонденции: Грабова Анна Юльевна, Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП, 03680, Украина;
e-mail: gau.imv@ukr.net

рий, но и условно патогенных микроорганизмов – возбудителей оппортунистических инфекций, что, в свою очередь, может стать причиной серьезной экологической проблемы. Таким образом, в настоящее время антибиотикорезистентность микроорганизмов расценивается как проблема эпидемии генов устойчивости в глобальных сетях экосистем микроорганизмов, подвергающихся селекции. Однако признак устойчивости к антибиотикам не рассматривается как одна из общепринятых характеристик штаммов микроорганизмов, входящих в состав препаратов для защиты растений.

В связи с этим целью настоящей работы было определить возможность использования штамма *Bacillus* sp. С6 – антагониста фитопатогенных бактерий и грибов при создании биопрепарата для растениеводства.

МЕТОДИКА

Объектом исследования был штамм *Bacillus* sp. С6, выделенный из почвы и обладающий выраженной антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным бактериям и грибам (Грабова, 2014).

Биобезопасность штамма изучали в соответствии со стандартными методиками на белых мышках линии BALB/C массой 16-18 г (Градова и др., 2010). Опыты проводили в соответствии с биоэтическими нормами обращения с животными (Marie et al., 2005). Животные были разделены на восемь групп по 10 особей в каждой. Двум контрольным группам перорально (группа 1) и внутривентриально (группа 2) вводили 1 мл стерильной среды культивирования. При исследовании вирулентности каждой особи (группа 3 – перорально, группа 4 – внутривентриально) вводили суспензию суточной культуры бацилл, содержащей $5 \cdot 10^9$ колониеобразующих единиц (КОЕ), токсигенности (группы 5 и 6) – такую же суспензию, предварительно убитую прогревом при температуре 100°C 20 минут, токсичности (группы 7 и 8) – 1 мл бесклеточного фильтрата 10-суточной культуры. Срок наблюдения – семь дней (Смирнов и др., 1983). Контроль внешнего состояния животных проводили ежедневно, при наблюдении учитывали изменение активности животных, их выживаемость. По окончании срока наблюдения проводили эвтаназию и вскрытие, визуально оценивали форму, цвет, внешний вид внутренних органов. Для гистологического анализа у мышей отбирали образцы ткани кишечника и печени. Отобранные образцы фиксировали быстрым методом в 10% формалине, проводи-

ли через растворы спиртов, ксилола и расплавленный парафин. После обезживания и парафинизации тканей органы заливали жидким парафином и готовили микротомные срезы, высушивали их и окрашивали по стандартной методике растворами эозина и гематоксилина (Карпищенко, 2013). Гистологические исследования проводили в лаборатории гистологии ООО «Центр ветеринарной диагностики» (Киев).

Фитотоксическое действие бесклеточной культуральной жидкости исследовали методом рулонной культуры на проростках озимой пшеницы сорта Смуглянка (Василькова и др., 2008). По 100 семян замачивали в отстоянной водопроводной воде (контроль) и исследуемых разведениях культуральной жидкости бацилл. На полиэтиленовые полосы размером 75×15 см накладывали полосу увлажнённой фильтровальной бумаги шириной 5 см, и раскладывали на неё по 33-34 семени, отступая от верхнего края 2,5 см. Сверху на семена накладывали ещё одну полосу бумаги, скручивали в рулон и ставили в банки с отстоянной водопроводной водой. Морфометрические измерения проростков проводили на 7 сутки, учитывая прирост сырой надземной и корневой массы, которые выражали в процентах относительно контроля.

Чувствительность бацилл к антибиотикам определяли дискодиффузионным методом (Егоров, 2004) на среде Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия). Контроль качества дисков проводили на тестовых культурах: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Escherichia coli* ATCC 25922 (Зуева и др., 2004). Интерпретацию результатов проводили по диаметрам зон задержки роста (ЗЗР, мм) вокруг дисков с антибиотиком согласно рекомендациям CLSI для стафилококков (Brouillard et al., 2005; CLSI/NCCLS, 2005). Повторность опытов – трехкратная.

В таблицах и графиках представлены усреднённые значения полученных результатов. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Применение бактериального штамма при создании препарата для растениеводства предполагает, что помимо высокой биологической активности, он должен быть безопасным для человека и теплокровных животных. Поэтому мы изучили вирулентность, токсичность и токсигенность штамма *Bacillus* sp. С6. Установле-

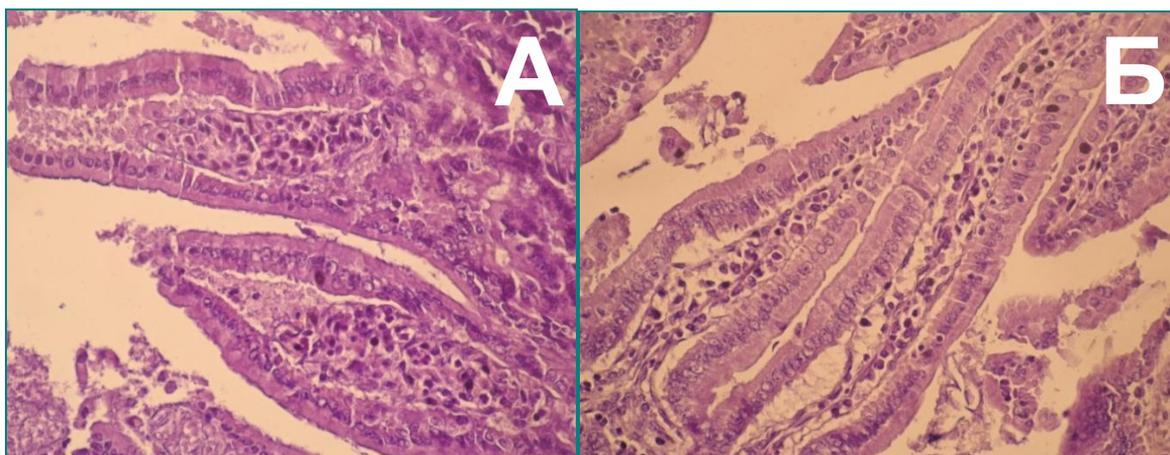


Рис. 1. Структура кишечника: А – группа 1, Б – группа 4 (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$).

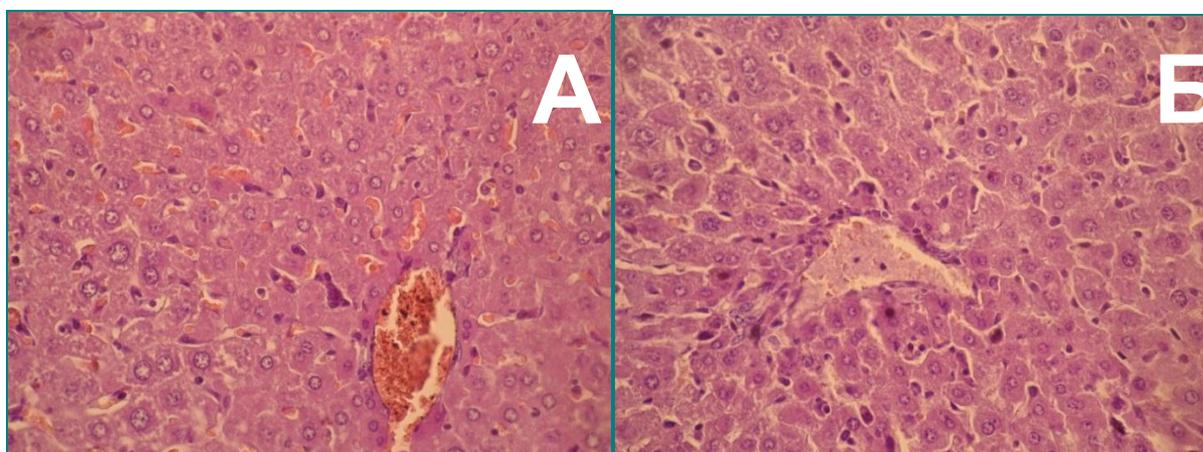


Рис. 2. Структура печени: А – группа 2, Б – группа 8 (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$).

но, что во всех контрольных и опытных группах не наблюдалось изменения поведения или гибели животных в течение всего срока наблюдения. При макроскопическом исследовании органов вскрытых животных не зафиксировано видимых патологоанатомических изменений в мозге, трахее, желудке, сердце, почках, кишечнике и селезенке. Полученные результаты свидетельствуют о том, что штамм не является вирулентным, не обладает токсичными и токсигенными свойствами, поскольку LD_{50} при введении его как перорально, так и внутрибрюшинно превышала $5 \cdot 10^9$ КОЕ. Подтверждением безопасности штамма *Bacillus* sp. С6 также являются данные гистологического исследования тканей органов животных. Установлено, что в кишечнике мышей всех опытных групп отмечается сохранение структуры и длины ресничек слизистого эпителия кишечника, а также отсутствие признаков воспалительного процесса – лимфоцитарно-макрофагальных инфильтраций

и кровоизлияний в подслизистой и в пластинке слизистой (рис. 1б), что соответствует физиологической норме (рис. 1а). Кроме того, показано сохранение структуры паренхимы печени мышей контрольных (рис 2а) и опытных (рис 2б) групп.

Полученные данные подтверждают авирулентность и биологическую безопасность исследуемого штамма бацилл, поскольку внутрибрюшинное и пероральное введение не вызывает патологических изменений у мышей.

Известно, что высокие концентрации экзогенных фитогормонов могут ингибировать рост растений (Дёрфлинг, 1985). Аналогично бактерии, синтезирующие фитогормональные соединения в больших количествах, могут угнетать рост и развитие растений. С другой стороны, в присутствии даже невысоких концентраций веществ, оказывающих гербицидное действие, подавляется наклевание и прорас-

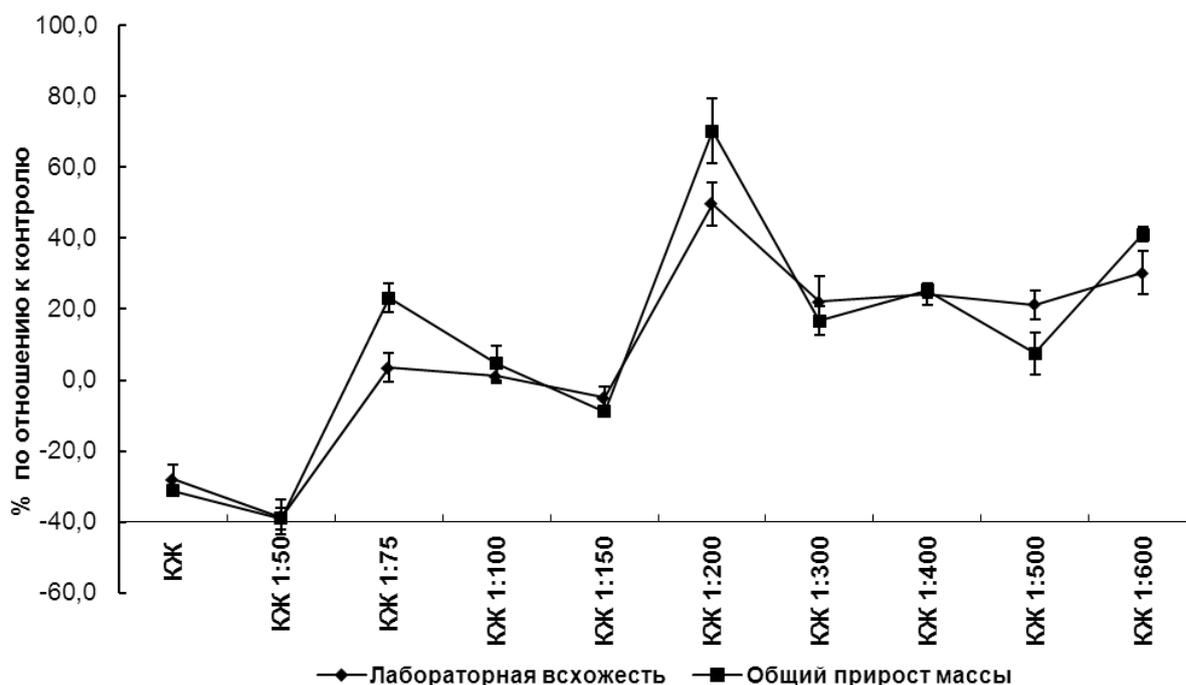


Рис. 3. Фитотоксичность культуральной жидкости *Bacillus* sp. С6.

тание семян. Так, антибиотик бацитрацин, который синтезируют различные штаммы *B. licheniformis*, оказывает негативное действие на семена томата, люцерны, пшеницы, хлопчатника и эспарцета в концентрации 750 ед./мл (Гаджиев, 2014). В связи с этим мы исследовали влияние культуральной жидкости *Bacillus* sp. С6 на всхожесть и накопление сырой массы проростков озимой пшеницы.

Показано, что нативная культуральная жидкость (КЖ) исследуемого штамма ингибирует прорастание семян озимой пшеницы и накопление биомассы примерно на 30% (рис. 3). При разведении в 50 раз, угнетение их роста и развития увеличивается до 40%.

В дальнейшем, при разведении культуральной жидкости в 75 раз фитотоксический эффект нивелировался, а при последующих разведениях наблюдалась стимуляция ростовых процессов растений. Наибольшая стимуляция показателей всхожести и накопления биомассы отмечалась при разведении культуральной жидкости в 200 раз. Тот факт, что ингибирующий эффект полностью снимается разбавлением КЖ в 75 раз, а при последующих разведениях наблюдается стимуляция накопления биомассы, может свидетельствовать о наличии в КЖ достаточно высоких концентраций гормональных и других регуляторов роста (вызывавших ингибирующий эффект неразведенной КЖ) негормональной природы (Кефели, 1981),

а также об отсутствии веществ, токсичных для растений. На основании полученных результатов можно сделать вывод о возможности использования штамма *Bacillus* sp. С6 при создании препарата для растениеводства.

По нашему мнению, важной характеристикой штамма микроорганизма, потенциального агента биопрепарата, предназначенного для биконтроля заболеваний сельскохозяйственных растений, является отсутствие в его геноме детерминант устойчивости к широко применяемым антибиотическим препаратам. В связи с этим нами была исследована чувствительность штамма *Bacillus* sp. С6 к широкому спектру антибиотиков.

Из представленных в таблице результатов видно, что штамм чувствителен к широкому спектру антибиотиков различных классов: беталактамным, аминогликозидным, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, а также к хлорамфениколу и имипенему. Чувствительность изучаемого штамма бацилл к тетрациклинам несколько отличалась: так, штамм был умеренно резистентным к тетрациклину, но чувствителен к доксициклину. Аналогичная закономерность была отмечена для некоторых видов бацилл (CLSI, 2005). Устойчивость бацилл к полимиксину, по-видимому, связана с тем, что исследуемый штамм синтезирует этот антибиотик, как и многие другие представители бактерий рода *Bacillus* (Щетинин, 2003).

Чувствительность *Bacillus* sp. С6 к антибиотикам

Название	Зона задержки роста, мм	Распределение по чувствительности
Бензилпенициллин	29,0±2,0	Ч
Ампициллин	29,0±4,0	Ч
Оксациллин	23,0±2,0	Ч
Цефазолин	21,0±3,0	Ч
Цефуросим	22,0±2,0	Ч
Цефотаксим	25,0±3,0	Ч
Цефтриаксон	25,0±5,0	Ч
Неомицин	25,0±4,0	Ч
Гентамицин	32,0±1,0	Ч
Нетилмицин	35,0±0,0	Ч
Тобрамицин	29,0±0,0	Ч
Стрептомицин	23,0±2,0	Ч
Эритромицин	29,0±1,0	Ч
Азитромицин	25,0±4,0	Ч
Линкомицин	40,0±6,0	Ч
Клиндамицин	24,0±2,0	Ч
Доксициклин	18,0±3,0	Ч
Тетрациклин	15,0±2,0	У
Офлоксацин	31,0±5,0	Ч
Ципрофлоксацин	31,0±0,0	Ч
Имипенем	30,0±2,0	Ч
Хлорамфеникол	31,0±3,0	Ч
Полимиксин	6,0±0,0	Р

Примечание: Ч – чувствительный, У – умеренно устойчивый, Р – резистентный.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что штамм *Bacillus* sp. С6 является непатогенным для человека и животных. Культуральная жидкость исследованного штамма не является фитотоксичной, а при разведении в 200 и более раз проявляет выраженный фитостимулирующий эффект. Исследование природы фитостимулирующих веществ, содержащихся в культуральной жидкости – предмет наших дальнейших исследований. Кроме того, штамм *Bacillus* sp. С6 является чувствительным к широкому спектру антибиотиков различных классов и поколений, что свидетельствует об отсутствии в его геноме детерминант устойчивости к этим антибиотикам. Полученные результаты, а также установленная нами ранее высокая антагонистическая активность изучаемого штамма по отношению к фитопатогенным бактериям и грибам (Грабова, 2014), позволяют рассматривать его, как перспективный при создании био-

препарата для защиты растений от заболеваний бактериальной и грибной этиологии.

ЛИТЕРАТУРА

Василькова М.В., Пылаева Г.И., Синцов К.Н., Злобин А.А. Оценка фитопатогенных свойств микроорганизмов-деструкторов фосфорорганических соединений // Мат-лы Междунар. конф. «Наука и образование для целей биобезопасности», Пущино, 6-9 октября 2008 г. – Пущино, 2008. – С. 23-25.

Гаджиев А.Р. Ингибирующая активность штамма *Bacillus licheniformis* ВКПМ В 7038 при прорастании семян *Trifolium pretense* L. // Перспективы науки. – 2014. – Т. 55, № 4. – С. 5-9.

Грабова А.Ю., Драгозов И.В., Зеленая Л.Б., Крючкова Л.А., Пасичник Л.А., Авдеева Л.В. Скрининг штаммов бацилл – антагонистов фитопатогенных микроорганизмов. // Ukr. Biochem. J. – 2014. – V. 86, № 5. – Suppl. 2. – P. 180. (Мат-ли XI Укр. біохім. конгр., Київ, 6-10 жовтня 2014 року).

- Градова Н. Б., Бабусенко Е. С., Панфилов В. И. Биологическая безопасность биотехнологических производств. – Москва, 2010. – 136 с.
- Дёрфлинг К. Гормоны растений. – Москва, 1985. – 304 с.
- Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – Москва, 2004. – 528 с.
- Зуева Л. П., Поляк М. С., Кафтырева Л. А., Колосовская Е. Н., Соусова Е. В., Козлова Н. С. Эпидемиологический мониторинг антибиотикорезистентности микроорганизмов с использованием компьютерной программы WHONET. – Санкт-Петербург, 2004. – 65 с.
- Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии: Руководство по клинической лабораторной диагностике. – Москва, 2013. – Т. 2. – 792 с.
- Кефели В.И. Витамины и некоторые другие представители негормональных регуляторов роста растений. // Прикл. биохимия и микробиология. – 1981. – Т. 18, № 1. – С. 5-24.
- Сираева З. Ю. Биопрепарат для стимуляции роста и защиты растений от болезней на основе *Bacillus atyloliquefaciens* ВКПМ В-11008: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 2012. – 24 с.
- Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий группы *Bacillus subtilis-terresentericus* из организма человека и животных. – Киев, 1983. – 49 с.
- Щетинин Е.В. Полимиксины – новый взгляд на известные антибиотики // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т. 2, № 3. – С. 68-73.
- Brouillard J. E., Terriff C. M., Tofan A., Garrison M. W. Antibiotic selection and resistance issues with fluoroquinolones and doxycycline against bioterrorism agents // Pharmacotherapy. – 2006. – V. 26, № 1. – P. 3-13.
- Clinical and Laboratory Standards Institute / NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement. // CLSI/NCCLS document M100-S15. – 2005. – P. 165.
- WHO Critically important antimicrobials for Human medicine: Categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-Human antimicrobial Use // Report of the Second WHO Expert Meeting Copenhagen, 29-31 May 2007.
- Romero D., Vicente A., de Rakotoaly R.H., Dufour S.E., Veening J.W., Arrebola E., Cazorla F.M., Kuipers O.P., Paquot M., Parez-Garcia A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospaera fusca* // MPMI. – 2007. – V. 20, № 4. – P. 430-440.
- Marie M., Edwards S., Gandini G., Reiss M., E. von Borell Animal bioethics: principles and teaching methods. – Wageningen, 2005. – 360 p.
- Moyné A.-L., Shelby R., Cleveland T.E., S. Tuzun Bacilomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus* // J. Appl. Microbiol. – 2001. – V. 90. – P. 622-629.

Поступила в редакцию
16.03.2015 г.

BIOSECURITY, PHYTOTOXICITY AND SENSITIVITY FOR ANTIBIOTICS OF THE *BACILLUS* SP. C6 STRAIN – ANTAGONIST OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA AND FUNGI

A. Yu. Grabova, I. V. Dragovoz, L. V. Avdeeva

*Institute of Microbiology and Virology of
National Academy of Sciences of Ukraine
e-mail: gau.imv@ukr.net*

Biosafety, phytotoxicity and antibiotic sensitivity of the *Bacillus* sp. C6 strain which is an antagonist of phytopathogenic bacteria and fungi were investigated. Absence of virulence, toxicity and toxigenicity of the test strain was found. It was shown that the strain is sensitive to broad-spectrum antibiotic and it does not synthesize exometabolites which are toxic to plants. It was concluded that it is possible to use the *Bacillus* sp. C6 strain as promising biocontrol agent of plant diseases.

Key words: *Bacillus* sp. C6, biosafety, phytotoxicity, antibiotic sensitivity

**БІОБЕЗПЕКА, ФІТОТОКСИЧНІСТЬ І АНТИБІОТИКОЧУТЛИВІСТЬ
ШТАМУ *VACILLUS SP. C6* – АНТАГОНІСТА
ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ І ГРИБІВ**

Г. Ю. Грабова, І. В. Драговоз, Л. В. Авдєєва

*Институт мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
Національної академії наук України
(Київ, Україна)
e-mail: gau.imv@ukr.net*

Досліджено біобезпеку, фітотоксичність і чутливість до антибіотиків штаму *Bacillus sp. C6* – антагоніста фітопатогенних бактерій і грибів. Встановлено авірулентність, нетоксичність та нетоксигенність досліджуваного штаму. Показано, що штам чутливий до антибіотиків широкого спектра дії; не синтезує екзометаболіти, токсичні для рослин. Зроблено висновок про можливість використання штаму *Bacillus sp. C6* як перспективного в якості агента біоконтролю хвороб рослин.

Ключові слова: *Bacillus sp. C6*, біобезпека, фітотоксичність, антибіотикочутливість