

однако, не оказывает существенного влияния на результаты диагностики патогена.

Внесение экстракта картофеля к образцам после вакуумной сушки и без неё (контроль) привело к увеличению значений пороговых циклов при постановке ПЦР-РВ в обоих случаях, однако его влияние не значительно сказывалось на результаты диагностики исследуемого патогена данным методом.

Оценку влияния факторов содержания, температуры и времени хранения на чувствительность диагностики возбудителя бурой гнили картофеля методом ПЦР-РВ проводили с образцами после вакуумной сушки и без неё. Было выявлено, что данный метод позволял обнаружить ДНК *R. solanacearum* при концентрации от 10^6 до 10^2 клеток возбудителя в 100 мкл экстракта картофеля. Хранение образцов при температуре равной $+4^\circ\text{C}$ привело к тому, что метод ПЦР «в реальном времени» с исследуемыми образцами после вакуумной сушки позволял обнаружить ДНК возбудителя в концентрации не менее 10^3 КОЕ *R. solanacearum* в 100 мкл картофельного экстракта, у образцов без вакуумной сушки – в концентрации не менее 10^2 . По-видимому, вакуумная сушка влияет на количество целевой ДНК патогена в пробе, однако различия в пороговых циклах не выражено зависели от срока хранения и концентрации клеток патогена в суспензии.

Метод ПЦР «в реальном времени» образцов при температуре хранения $+28^\circ\text{C}$ позволял идентифицировать ДНК возбудителя *R. solanacearum* во всех исследуемых суспензиях с концентрациями клеток от 10^3 до 10^6 в картофельном экстракте спустя 28 дней. В отдельном эксперименте было показано, что при хранении контрольных образцов *Ralstonia solanacearum* для МСИ при температуре -20°C в течение 6 месяцев наблюдалось снижение чувствительности ПЦР-РВ на 2.0 цикла Ct.

Таким образом, контрольные образцы *Ralstonia solanacearum* для МСИ, предназначенные для транспортировки, должны представлять собой высушенный под вакуумом при 60°C картофельный экстракт с содержанием клеток данного фитопатогена в концентрации от 10^3 до 10^6 в 100 мкл экстракта, хранение которых осуществляют при температуре равной -20°C . Допускается хранение образцов при температуре $+28^\circ\text{C}$ не более 30 дней.

Литература

1. Диагностика бактериальной бурой гнили картофеля и меры борьбы с ней / Методические указания // ВНИИ фитопатологии РАСХН. – Москва, 1994. 39 с.
2. СТО ВНИИР 4.009–2011 «Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Методы выявления и идентификации».

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИБИОТИКОВ В СОЧЕТАНИИ С ПРЕПАРАТОМ СЕРЕБРА «ЗЕРОКС®» ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РЯДА БАКТЕРИОЗОВ РАСТЕНИЙ

М.В. Ходыкина^{3,5}, В.А. Политыко³, Е.И. Кырова⁵, Ю.А. Крутяков^{2,4},
П.М. Жеребин², А.Н. Игнатов^{1,3,5}

email: an.ignatov@gmail.com

¹ Центр «Биоинженерия» РАН, Москва; ² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва;

³ ГНУ ВНИИ фитопатологии ФАНО России; ⁴ Группа компаний «АгроХимПром», Барнаул;

⁵ Российский университет дружбы народов

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ANTIBIOTICS AND SILVER COMPAUND “ZEROKS®” AGAINST SOME PLANT PATHOGENIC BACTERIA

M.V. Khodykina^{3,5}, V.A. Polityko³, E.I. Kyrova⁵, Y. Krutyakov^{2,4}, P.M. Zherebin², A.N. Ignatov^{1,3,5}

¹ Centre “Bioengineering” Sciences, Moscow; ² Moscow State University, Moscow;

³ State Research Institute of Phytopathology Fano Russia;

⁴ Group “AgroChimProm”, Barnaul; ⁵ Russian University of Peoples’ Friendship

Summary

The synergy effects of antibiotics and “Zeroks®” against strains that are resistant to antibiotics was found. It is noted that the strain # 9 *Agrobacterium rhizogenes*, causing root mat disease of cucumber, was highly resistant to all antibiotics except highly toxic polymyxin, and chloramphenicol, and may carry genes for universal antibiotic resistance. This pathogen is released from fresh fruit cucumber grown on infected plants, and can serve as a donor of antibiotic resistance to human pathogens living in the digestive tract.

Появление устойчивости бактерий к антибиотикам является одной из важнейших проблем медицины и защиты растений. Специалистами Химического и Биологического факультетов МГУ имени М.В. Ломоносова при поддержке Группы Компаний «АгроХимПром» создаются и изучаются препараты на основе коллоидного серебра, поверхностно модифицированного различными биологически активными ПАВ и полимерами, пригодные для использования в сельском хозяйстве в эффективных контактных фунгицидов и бактерицидов. Одним из препаратов, разработанных коллективом МГУ имени М.В. Ломоносова при поддержке ГК «АгроХимПром» является контактный бактерицид и фунгицид «Зерокс®» (ВКР), действующим началом которого выступают частицы наноразмерного серебра, специальным образом модифицированные биоразлагаемым поверхностно-активным веществом. В соответствии с программой регистрационных испытаний пестицида «Зерокс®» (ВКР), утвержденной МСХ РФ, в 2014 г. проводятся регистрационные полевые испытания препарата на различных культурах. Целью работы была оценка взаимодействия «Зерокс®» с бактерицидными веществами широкого круга активности.

Оценку устойчивости бактерий к антибиотикам проводили методом дисков. Использовали питательную среду NBY следующего состава среды, г/л воды: питательный бульон – 8; дрожжевой экстракт – 2; калий фосфорнокислый двухзамещенный – 2; калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,5; агар – 17-20. После автоклавирования добавляли 50 мл 10% глюкозы и 1мл 1М сернокислого магния. Бактерии выращивали в течение 24 часов в жидкой среде LB, состав (г/л): дрожжевой экстракт – 5, триптон – 10, хлористый натрий – 5. Затем производили посев бактерий при помощи шпателя Дригальского. Чувствительность проверяли методом дисков, содержащих антибиотики. Наличие зон с отсутствием роста указывает на бактерицидный эффект. Результат регистрировали на 3-5 день. Опыт был поставлен в двух повторностях.

Штаммы, использованные в работе, были получены из коллекции ВНИИФ. Они включали:
 #1368 *Xanthomonas campestris* (капуста)
 #At-2 *Agrobacterium tumefaciens* (роза), 2001
 #Ca 5+ *Agrobacterium tumefaciens* (роза), 2013
 #1944 *Pectobacterium carotovorum* (картофель)
 #33 *Dickeya dianthicola* (картофель)
 #9 *Agrobacterium rhizogenes* (огурец)
 #S-38 *Pseudomonas syringae* (подсолнечник)
 1209 *Clavibacter michiganensis* (картофель)

Протестирован набор антибиотиков, представляющих разные классы активности: 1) пенициллин, 2) цефалоспорин, 3) ванкомицин, 4) никкомицин, 5) нистатин, 6) хлорамфеникол, 7) полимиксин,

8) стрептомицин, 9) эритромицин, 10) тетрациклин, 11) Фитолавин-300, 12) Фитоплазмин.

Пенициллин действует по типу нарушения синтеза клеточной стенки посредством ингибирования синтеза пептидогликана, ванкомицин стимулирует образования димеров и их переноса к растущим цепям пептидогликана, никкомицин нарушает синтез хитина и подобных веществ, нистатин вызывает нарушение функционирования мембран - нарушение целостности мембран, стимулирует образование ионных каналов, связывание ионов в комплексы, растворимые в липидах, и прерывает их транспортировку. Тетрациклин и стрептомицин нарушают синтез белка: ингибируют активацию и перенос аминокислот, нарушают функции рибосом. Хлорамфеникол угнетает синтез бактериальных белков, а в больших дозах вызывает бактерицидный эффект. Левомецетин обладает широким спектром действия. Нистатин – из группы химических веществ, способных разрушать мембрану клеток микроскопических грибов, вызывая их гибель.

Результаты

По возрастанию активности антибиотики были ранжированы в следующем порядке: Нистатин, Ванкомицин, Налидиксовая к-та, Эритромицин, Бензилпенициллин, Полимиксин, Канамицин, Ампицилин, Стрептомицин, Левомецетин, Гентамицин, Тетрациклин.

Наибольшую восприимчивость ко всем антибиотикам показал штамм 1209 *Clavibacter michiganensis*, наименьшую – штамм #9 *A. rhizogenes*. Все штаммы показали специфичную устойчивость хотя бы к одному антибиотику. Даже наиболее восприимчивый штамм 1209 *Clavibacter michiganensis* был устойчив к налидиксовой к-те. Все штаммы, кроме #S-38 *Pseudomonas syringae*, показали восприимчивость к «Зерокс®» в применявшейся дозе.

Выявлен эффект синергизма действия антибиотиков и препарата «Зерокс®» в отношении штаммов, устойчивых к действию антибиотиков. Вместе с тем, практически не отмечено усиления действия эффективных антибиотиков при добавлении препарата серебра.

Отмечено, что штамм #9 *Agrobacterium rhizogenes*, вызывающий бородачность огурца, был высокоустойчив ко всем антибиотикам, кроме высокотоксичных и малоспецифичных полимиксина и левомецетина, и может быть носителем генов универсальной устойчивости к антибиотикам. Данный патоген выделяется из свежих плодов огурца, выросших на пораженных растениях, и может послужить донором устойчивости к антибиотикам для патогенных для человека микроорганизмов, обитающих в желудочно-кишечном тракте.

Антибиотик, концентрация, мг на диск	1368 X. <i>campestris</i>		At-2 <i>A. tumefaciens</i>		Ca 5+ <i>A. tumefaciens</i>		1944 <i>P. carotovorum</i>		#33 <i>D. dianthicola</i>		#9 <i>A. rhizo-</i> <i>genes</i>		S-38 <i>P. syringae</i>		1209 <i>C. michigan-</i> <i>ensis</i>		
	Среднее	Контроль	диск+Ag 3мл/87мл.	Контроль	диск+Ag 3мл/87мл.	Контроль	диск+Ag 3мл/87мл.	Контроль	диск+Ag 3мл/87мл.	Контроль	диск+Ag 3мл/87мл.	Контроль	диск+Ag 3мл/87мл.	Контроль	диск+Ag 3мл/87мл.	Контроль	диск+Ag 3мл/87мл.
Налидиксовая к-та, 1	12,86	1	23,5	30	12,8	0	10	35	19	33	19	0	1	0	10	0	11,5
Полимиксин, 2	16,77	15	30	24	25	1	13,5	20	17,3	22	15	13	13	17	13	12,3	17,25
Ванкомицин, 3	12,55	23	13,3	1	13,5	1	12,5	1	20,75	21,5	12	0	8	0	13,3	25	35
Бензилпенициллин, 4	16,52	19,75	12,2	1	12,75	0	10	35	23,25	24	23,5	0	10,5	0	12,3	40	40
Левомецетин, 5	20,25	21,25	18,75	18,3	16	15,8	25	25	22,3	24,8	16,75	15	13	0	12	40	40
Эритромицин, 6	14,55	1	30	20	12,5	26	12	1	1	10,25	10	0	1	13	15	40	40
Ампицилин, 7	19,66	30	16	20	16,75	1	10	34,75	30	31	30,8	0	1	0	13,3	40	40
Канамицин, 8	19,50	0	28,5	28	15	1	12	19	22,5	25	19,7	0	10	26,3	35	40	30
Гентамицин, 9	21,98	9,75	36	20	24	23	18,5	17	20	21	20	0	12,5	25	35	40	30
Тетрациклин, 10	24,84	24,75	36	35	28,5	40	17,5	30	22,5	19,25	12	1	1	20	30	40	40
Стрептомицин, 11	19,69	1	30	18,7	16	15	19,75	17	21,75	20	23,3	0	10	33,5	35	40	14
Нистатин, 12	7,72	0	12	0	10,3	0	11	0	1	14	10,75	0	0	0	11	40	13,5
Фитолавин, 13	4,51	0	1	1	10	0	1	1	12,2	7,5	14	0	0	0	1	10	13,5
Фитоплазмин, 14	2,13	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	10	20
Контроль	8,26	0	5	0	10	0	5	0	1	0	1	0	8	0	0	0	13
Среднее	15,25	10,46	20,59	15,50	15,29	8,84	12,41	16,84	16,75	19,52	16,20	2,07	5,79	9,63	16,85	29,81	27,48
НСР95	-	1,35	1,77	2,43	2,95	2,98	3,54	4,02	3,35	2,97	3,46	1,08	1,57	2,40	1,98	3,03	1,90

0 – нет зоны свободной от бактерий вокруг диска

1 – бактериостатическое действие (зона до 5 мм есть, но в ней растут отдельные колонии)

7-40 – диаметр (мм) зоны свободной от бактерий.