

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

УДК 579.64:632.937.15

А. А. Шейн, Д. В. Войтка

РУП «Институт защиты растений», аг. Прилуки, Минский р-н

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ И АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СИМБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ РОДА *XENORHABDUS*

Дата поступления статьи в редакцию: 25.06.2025

Рецензент: канд. с.-х. наук Бречко Е. В.

Аннотация. Представлены результаты исследований по изоляции и изучению антагонистической активности симбиотических бактерий энтомопатогенных нематод. Получено 6 изолятов бактерий, принадлежащих к роду *Xenorhabdus*. Выявлено, что полученные изоляты проявляют высокий уровень антибактериальной и антифунгальной активности. Показан угнетающий эффект на рост фитопатогенных бактерий родов *Clavibacter*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* и фитопатогенных микромицетов родов *Alternaria*, *Rhizoctonia* и *Phytophthora*.

Ключевые слова: энтомопатогенные нематоды, *Steinernema*, симбиотические бактерии, *Xenorhabdus*, фитопатогены, антагонизм, антибактериальная активность, антифунгальная активность.

Введение. Для защиты растений от вредителей и болезней широко используются химические препараты, обладающие рядом нежелательных последствий. Их применение отрицательно сказывается на чистоте почвы и грунтовых вод, а также качестве сельскохозяйственной продукции [1]. В силу неспецифичности химические препараты негативно влияют на экологическую обстановку: к ним чувствительны не только вредители, но и полезные нецелевые объекты.

Недостатки химических препаратов для защиты растений заставляют искать альтернативы, среди которых ведущее положение занимает биологический метод. В мировой сельскохозяйственной практике для контроля насекомых-вредителей широко используются препараты на основе энтомопатогенных нематод рода *Steinernema* [2, 3, 4]. Нематоды *Steinernema* находятся в активном поиске своих хозяев. Инфекционные

личинки проникают в тело насекомого через естественные отверстия (дыхальца, ротовое, анальное). Оказавшись в полости тела, штейнерматиды выпускают в гемолимфу хозяина симбиотических бактерий *Xenorhabdus* spp. Рост и размножение бактерий приводит к гибели и перевариванию насекомого [4, 5].

Xenorhabdus spp. используют энтомопатогенных нематод рода *Steinernema* как переносчиков. В свою очередь, для нематод бактерии играют роль факторов вирулентности. Внутри штейнерматид ксенорабдусы располагаются в специальной структуре переднего кишечника – рецептакуле. *Xenorhabdus* spp. легко культивируются в лабораторных условиях. Несмотря на возможность сапротрофного образа жизни, вне ассоциации с нематодами ксенорабдусы не обнаруживаются [6].

Бактерии рода *Xenorhabdus* – это подвижные грамотрицательные палочки, факультативные анаэробы. На средах с концентрацией агара 0,6–1,2 % наблюдается рост. Отличаются отсутствием ряда активностей, типичных для энтеробактерий, таких как каталазная и нитратредуктазная. Спектр сбраживаемых углеводов также узкий для Enterobacterales. Характерной чертой *Xenorhabdus* является наличие двух чётко различимых физиологических состояний (форм). Первичные формы более вирулентны, метаболически активны и поглощают ряд красителей из питательных сред. Последнее используется при выделении этих бактерий. В зависимости от красителя, колонии первичных форм образуют синие (бромтимоловый синий) или тёмно-красные (нейтральный красный) колонии. При культивировании в лабораторных условиях наблюдается диссоциация с образованием вторичных форм. Вторичные формы обычно не способны к синтезу пигментов, захвату красителей и менее вирулентны. Обратный переход возможен, но происходит с меньшей частотой. Причины и возможная биологическая роль этого явления неизвестны [5, 6].

Бактерии *Xenorhabdus* синтезируют широкий спектр биологически активных соединений. Около 6 % генома приходится на синтез вторичных метаболитов. Среди них известны вещества, которые подавляют рост бактерий, грибов и простейших [6, 7]. Пептиды фабклавины активны против грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, простейших *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* и *Trypanosoma cruzi*. Бикорнитуны – группа соединений, богатых остатками аргинина. Была показана их цитотоксичность для патогена табака *Phytophthora nicotianae*, наличие чувствительности к ним у *Erwinia amylovora* и *Bacillus subtilis* [7, 8]. Индол-содержащие вещества регулируют метаболизм самих ксенорабдусов, но также эффективны против грибов, бактерий и ингибируют фосфолипазу A2 (элемент иммунного ответа насекомых). Схожими свойствами обладает

бензилацетон. Собственно антагонистическую функцию выполняют РАХ-пептиды, проявляющие как антибактериальную, так и антифунгальную активность. Производные дитиопирролона включают в себя ксенорксиды и ксенорабдитины. Они обладают широким спектром действия, включающим антибактериальную, антифунгальную и инсектицидную активности [7].

Таким образом, среди бактерий р. *Xenorhabdus* обнаруживаются штаммы, способные синтезировать не только факторы вирулентности, но и антимикробные вещества. На основе таких штаммов возможно создание биопрепаратов, эффективных как против вредителей, так и против болезней растений. Создание препаратов комплексного действия является перспективным направлением биотехнологии.

Целью данной работы являлась оценка антибактериальной и антифунгальной активности бактерий рода *Xenorhabdus* – симбионтов энтомопатогенных нематод рода *Steinernema*.

Материалы и методы исследований. Объектами исследований являлись 4 штамма энтомопатогенных нематод рода *Steinernema* и 6 изолятов бактерий. Изоляты получали из лабораторно заражённых нематодами личинок большой восковой моли *Galleria mellonella*. Как контроли при постановке физиолого-биохимических тестов использовали *Agrobacterium tumefaciens* 2592, *Bacillus thuringiensis* C-11 и *Pseudomonas corrugata* 9069. Для оценки антибактериальной активности использовали 6 штаммов фитопатогенных бактерий (рода *Clavibacter*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*). Для оценки антифунгальной активности использовали 2 штамма грибов (*Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*) и 1 штамм оомицета (*Phytophthora alni*).

Гусениц старших и средних возрастов *G. mellonella* заражали одним из следующих штаммов нематод: *Steinernema feltiae* №8, *Steinernema feltiae* №31, *Steinernema* sp. SBG-99, *Steinernema* sp. SBM3-96. Заражение проводили в пластиковых чашках диаметром до 4 см с фильтровальной бумагой. В чашку с 4 гусеницами вносили 0,2 мл водной суспензии нематод. Титр подбирали так, чтобы на одно насекомое приходилось не менее 5 инфекционных личинок нематод (в данном случае, не менее 100 ос./мл). Каждые сутки чашки проверяли на наличие погибших гусениц. Трупы с характерными симптомами (ровная поверхность, серый, коричневый или красный оттенок, вязкое содержимое) отбирали для выделения из них бактерий [9].

Суточные трупы гомогенизировали в 5 мл стерильного физиологического раствора (NaCl 8,5 г/л). 0,1 мл гомогената сеяли на дифференциально-диагностические среды методом Дригальского. Гомогенаты насекомых, заражённых штаммами *S. feltiae*, сеяли на NBTA (ГРМ) и NBTA (ПДА). Для штаммов, вид которых не уточнён, также

использовали среду МакКонки. В обоих случаях высевы далее инкубировали при 27,0 °С. На NBTA ксенорабдусы образуют тёмно-синие колонии. Колонии *Xenorhabdus poinarii* на среде МакКонки имеют тёмно-красный цвет [5]. Составы сред следующие:

1. NBTA (ГРМ), г/л: панкреатический гидролизат рыбной муки – 12,0; пептон ферментативный – 12,0; NaCl – 6,0; трифенилтетразолия хлорид (ТТХ) – 0,04; бромтимоловый синий – 0,025; агар – 10,0±2,0; дистиллированная вода – до 1 л, pH 7,3±0,2.

2. NBTA (ПДА), г/л: пептон ферментативный – 15,0; дрожжевой экстракт – 5,0; NaCl – 8,0; трифенилтетразолия хлорид (ТТХ) – 0,04; бромтимоловый синий – 0,025; агар – 15,0; дистиллированная вода – до 1 л, pH 7,3±0,1.

3. Среда МакКонки, г/л: панкреатический гидролизат желатина – 17,0; лактоза одноводная – 10,0; NaCl – 5,0; пептон ферментативный – 3,0; соли желчных кислот – 1,5; нейтральный красный – 0,03; кристаллический фиолетовый – 0,001; агар – 13,5; дистиллированная вода – до 1 л, pH 7,1±0,2.

Первичная характеристика изолятов включала оценку следующих параметров: морфология колоний, пигментация, способность к поглощению бромтимолового синего, грампринадлежность, подвижность, наличие каталазы и способность сбраживать глюкозу, лактозу и маннит [5, 10]. На основании полученных результатов отбирали изоляты, относящиеся к роду *Xenorhabdus* [5].

Культуральные признаки оценивали на ПДА и среде Гисса с лактозой и 1,2 % агара при 27,0 °С. На ПДА оценивали характер роста в отсутствии бромтимолового синего, на среде Гисса – при 0,04 г/л бромтимолового синего. Учёты проводили на 3-и и 5-е сутки соответственно.

Грампринадлежность определяли с помощью КОН-теста, каталазную активность – внесением биомассы в каплю 3 %-ной перекиси водорода. Подвижность и способность к сбраживанию углеводов определяли посевом в соответствующие полужидкие среды Гисса.

Антагонизм по отношению к бактериям определяли методом перпендикулярных штрихов, по отношению к микромицетам – методом агаровых блоков [11]. Опыты проводили при температуре 27,0 °С. Штаммы-антагонисты и бактериальные тест-культуры растили на ПДА, микромицетов – на сусло-агаре. Результаты учитывали на 3-и сутки, в опытах с *R. solani* – на 7-е сутки.

Статистическую обработку результатов проводили в программном пакете MS Excel 2019.

Результаты исследований. На NBTA были получены колонии нетипичных цветов. Окраска колоний варьировала от красной, коричневой

и почти чёрной до фиолетовой и серо-синей. Отчётливо синяя окраска наблюдалась лишь у тонкого слоя биомассы во время отбора изолятов. На среде МакКонки были получены только бесцветные колонии, края которых лишь через неделю приобретали красно-оранжевый оттенок.

Отсутствие тёмно-синих колоний на NBTA может быть вызвано рядом причин. Прежде всего, это сама питательная среда. В литературе указано содержание бромтимолового синего и ТТХ [5]. Состав питательной основы сред может существенно различаться у отдельных авторов, что сказывается на характере роста бактерий. Кроме того, сам бромтимоловый синий является кислотно-основным индикатором. В зависимости от pH, он имеет жёлтый, зелёный или синий цвет. Так, Котова Э.П. (2024) отмечает выделение не типично синих, а зелёных колоний ксенорабдусов [12].

Для бактерий *Xenorhabdus* характерно наличие двух морфологически и физиологически различных состояний (форм). Из нематод и заражённых насекомых выделяют так называемые первичные формы. Для них характерен активный захват бромтимолового синего, а значит формирование тёмно-синих колоний на NBTA. Первичные формы также способны синтезировать пигменты жёлтых и коричневых цветов, что может затруднить их выделение. Вторичные формы, как правило, появляются в результате диссоциации в лабораторных условиях. Они обладают ограниченными метаболическими возможностями и в тех же условиях формируют красные колонии [5]. Выделение вторичных форм из заражённого насекомого, по меньшей мере, необычно.

Были отобраны изоляты, чья окраска была наиболее близкой к упоминаемой в литературе. Часть изолятов показывала скудный рост и теряла окраску при пересевах. Для дальнейшего изучения было оставлено 6 наиболее морфологически стабильных изолятов (таблица 1). Изоляты были названы по штаммам нематод, от которых получены. Приписка «Н» добавлена к названиям изолятам, полученным на среде NBTA (ПДА).

Таблица 1 – Окраска колоний изолятов при выделении

Среда для изоляции	Изоляты	Окраска колоний при изоляции
NBTA (ГРМ)	№8, №31, SMB3-96	Бордово-коричневые
NBTA (ПДА)	№31Н	Бирюзовые
	SBD-99Н	Красный низ, синий верх
	SMB3-96Н	Сизые

При культивировании полученных бактерий на средах ПДА и плотном варианте среды Гисса с лактозой отчётливо прослеживалось 2 морфотипа (таблица 2).

Таблица 2 – Морфологические признаки изолятов на различных питательных средах

Группа	Изоляты	ПДА	Плотная среда Гисса с лактозой
1	№8	Белые S-колонии с диффундирующим в среду жёлтым пигментом	Полупрозрачные бесцветные колонии. Среда синяя.
	SBD-99H	Белые S-колонии	
	SMB3-96	Белые полупрозрачные S-колонии	
2	№31, №31H	Жёлто-оранжевые полупрозрачные S-колонии с диффундирующим в среду жёлтым пигментом	Сине-зелёные колонии. Непосредственно рядом с колониями среда тёмно-синяя, дальше от колоний – сине-зелёная.
	SMB3-96H	Оранжевые S-колонии с диффундирующим в среду жёлтым пигментом	

Изоляты группы 2 формировали насыщенные сине-зелёные колонии на среде Гисса, характерные для *Xenorhabdus* spp. Скорее всего, это вызвано более высокой концентрацией бромтимолового синего, чем в NBTA (0,04 и 0,025 г/л соответственно). На данном этапе изоляты группы 1 не исключались из исследования ввиду возможности получения вторичных форм.

Для дальнейшей идентификации изоляты проверяли на грампринадлежность, подвижность, каталазную активность и способность сбраживать ряд углеводов. Бактерии рода *Xenorhabdus* отличаются отсутствием каталазы [5], что справедливо для 4 изолятов из 6 (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты определения грампринадлежности и физиолого-биохимических параметров изолятов

Изоляты	Ката-лаза	Образование кислоты из углеводов:			Подвижность	Грам-при-надлеж-ность
		глюкоза	маннит	лактоза		
№8	+	+, газ	+, газ	—	+	—
SBD-99H	+	—	—			
SBM3-96	—	—				
№31, №31H, SBM3-96H	—	+				

Примечания: «+» – положительный результат или грамположительность, «–» – отрицательный результат или граммотрицательность, «газ» – образование пузырьков газа в столбике агара.

Исходя из полученных результатов, 3 изолята (№31, №31Н, SBM3-96Н) представляют собой группу морфологически и физиологически сходных бактерий. Данные изоляты грамотрицательные, подвижные, на ПДА формируют жёлто-оранжевые или оранжевые колонии с диффундирующим в среду жёлтым пигментом. При добавлении в среду 0,04 г/л бромтимолового синего они образуют колонии насыщенного сине-зелёного цвета, обесцвечивая среду вокруг них. Изоляты не обладают каталазной активностью, сбраживают глюкозу и не сбраживают лактозу и маннит. По совокупности этих признаков изоляты №31, №31Н, SBM3-96Н могут быть отнесены к роду *Xenorhabdus*. Исходя из видовой принадлежности нематод-хозяев и синтеза жёлтых пигментов, изоляты №31 и №31Н могут быть представителями вида *Xenorhabdus bovienii* [5]. Точная идентификация до вида требует дальнейших исследований. Далее по тексту все 3 изолята будут указаны как *Xenorhabdus* sp.

В таблице 4 представлены результаты оценки антибактериальной активности.

Таблица 4 – Результаты определения грампринадлежности и физиолого-биохимических параметров изолятов

Штаммы-антагонисты	Тест-культуры					
	<i>Clavibacter</i> sp. Могилёв	<i>P. versatile</i> ju 42	<i>P. corrugata</i> 9069	<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> УМБ 7595	<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> УМБ 9109	<i>P. syringae</i> pv. <i>tonato</i> Pst5
№31	20,33±1,25	8,67±1,25	10,33±0,47	6,00±1,63	19,33±1,25	26,00±3,27
№31Н	19,33±0,94	4,00±0,82	7,33±1,25	3,67±0,47	15,67±1,7	21,00±1,41
SBM3-96Н	29,67±1,25	21,33±0,47	9,00±0,82	11,33±0,47	24,67±2,62	25,33±0,47

Для всех 6 тест-культур было показано значительное угнетение роста. Широкий спектр активности согласуется с литературными данными [7] и говорит о перспективности штаммов *Xenorhabdus* sp. как продуцентов антибактериальных веществ.

Антифунгальную активность наблюдали у 2 штаммов *Xenorhabdus* sp., и, в целом, она была гораздо ниже антибактериальной (таблица 5).

Таблица 5 – Размер зон задержки роста фитопатогенных грибов, мм

Штаммы-антагонисты	Тест-культуры		
	<i>A. solani</i>	<i>R. solani</i>	<i>Ph. alni</i>
№31	1,67±0,94	4,67±0,94	2,0±0,82
№31Н	2,00±0,82	0±0	3,67±0,94
SBM3-96Н	0±0	0±0	0±0

Штамм №31 оказался наиболее активен против *R. solani*, штамм №31Н – в отношении *Ph. alni*. Примечательно, что SBM3-96Н, показавший самые высокие значения антибактериальной активности, рост микромицетов не угнетал.

Заключение. В результате исследования из заражёнными нематодами рода *Steinernema* гусениц было получено 6 морфологически стабильных изолятов. 3 изолята (№31, №31Н и SBM3-96Н) являются представителями рода *Xenorhabdus*. Штаммы №31 и №31Н могут относиться к виду *X. bovienii*.

Установлен ингибирующий эффект 3 штаммов *Xenorhabdus* sp. по отношению к 9 штаммам фитопатогенных микроорганизмов (6 бактерий, 2 грибов, 1 оомицетов): размер зон задержки роста варьировал от $3,67 \pm 0,47$ мм до $29,67 \pm 1,25$ мм для бактерий и от $1,67 \pm 0,94$ мм до $4,67 \pm 0,94$ мм для микромицетов.

Широкий спектр и высокий уровень активности свидетельствует о перспективности использования полученных штаммов *Xenorhabdus* sp. в качестве продуцентов антимикробных веществ.

Работа выполнена в рамках совместного белорусско-китайского научно-технического проекта Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь «Оценка эффективности биологически активных компонентов при культивировании и применении энтомопатогенных нематод» (договор №Б24КИТГ-020).

Список литературы

1. Ярчаковская, С. И. Регулирование численности фитофагов биопрепаратами в насаждениях плодовых и ягодных культур в Беларуси / С. И. Ярчаковская, Н. Е. Колтун, Р. Л. Михневич // Защита растений : сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр НАН Беларуси по земледелию, Ин-т защиты растений ; редкол.: Л. И. Трепашко (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2017. – Вып. 41. – С. 263–264.
2. Оберемок, В. В. Современные инсектициды: их преимущества, недостатки и предпосылки к созданию ДНК-инсектицидов (обзорная статья) / В. В. Оберемок, А. С. Зайцев // Ученые записки Таврического нац. ун-та имени В. И. Вернадского. Сер. Биология, химия. – 2014. – Т. 27, № 1. – С. 112–126.
3. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application / ed.: J. F. Charles, A. Delécluse, C. Nielsen-Le Roux. – Dordrecht : Springer Science & Business Media, 2013. – 523 p.
4. Successes and failures in use of parasitic nematodes for pest control / R. Georgis, A. M. Koppenhofer, L. A. Lacey [et al.] // Biological Control. – 2006. – Vol. 38, iss. 1. – P. 103–123.
5. Bergey's manual of systematic bacteriology : 5 V. / ed: Don J. Brenner [et al.]. – Second publisher. – New York : Springer, 2005. – Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria / ed. board: G. M. Garrity [et al.]. – 1106 p.
6. Sajnaga, E. Evolution and taxonomy of nematode-associated entomopathogenic bacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: an overview / E. Sajnaga, W. Kazmierczak // Symbiosis. – 2020. – Vol. 80, № 1. – P. 1–13.
7. Dreyer, J. Bacteria of the genus *Xenorhabdus*, a novel source of bioactive compounds / J. Dreyer, A. P. Malan, L. M. T. Dicks // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol. 9. – P. 1–14.

8. Fabclavine diversity in *Xenorhabdus* bacteria / S. L. Wenski, H. Cimen, N. Berghaus [et al.] // Beilsyein j. of organic chemistry. – 2020. – Vol. 16, № 1. – P. 956–965.
9. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты : монография / М. В. Штерншис, И. В. Исси, Э. Г. Воронина [и др.] ; под ред. В. В. Глупова. – М. : Круглый стол, 2001. – 736 с.
10. Желдакова, Р. А. Фитопатогенные микроорганизмы : учеб.-метод. комплекс для студентов биол. фак. спец. 1-31 01 01 «Биология» / Р. А. Желдакова, В. Е. Мямин. – Минск : БГУ, 2006. – 116 с.
11. Лысак, В. В. Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям и контроль самостоятельной работы студентов / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова. – Минск : БГУ, 2002. – 100 с.
12. Перспективы применения различных видов и штаммов симбиотических бактерий (*Xenorhabdus* sp.) в биологической защите картофеля от болезней в условиях Европейского Севера России / Э. П. Котова, Т. А. Данилова, Л. Г. Данилов, М. В. Архипов // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2024. – Т. 25, № 3. – С. 395–406.

A. A. Shein, D. V. Voitka

RUE «Institute of plant protection», Priluki, Minsk region

ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SYMBIOTIC BACTERIA OF THE GENUS *XENORHABDUS*

Annotation. The results of studies on isolation and antagonistic activity of symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes are presented. 6 isolates of bacteria belonging to the genus *Xenorhabdus* were obtained. It was revealed that the obtained isolates exhibit a high level of antibacterial and antifungal activity. It has been shown to inhibit the growth of phytopathogenic bacteria of the genera *Clavibacter*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* and phytopathogenic micromycetes of the genera *Alternaria*, *Rhizoctonia* and *Phytophthora*.

Key words: entomopathogenic nematodes, *Steinernema*, symbiotic bacteria, *Xenorhabdus*, phytopathogens, antagonism, antibacterial activity, antifungal activity.