

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
«МЕТОДОЛОГИЯ ПО СКРИНИНГУ *IN VITRO* ШТАММОВ,
ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ
ПАЗИТАРНЫМИ И НЕМАТИЦИДНЫМИ СВОЙСТВАМИ»**

Конрат А. Н.¹,
младший научный сотрудник лаборатории фитопаразитологии

Лычагина С. В.¹,
кандидат биологических наук,
заведующая лабораторией фитопаразитологии

Шестеперов А. А.¹,
доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник лаборатории фитопаразитологии,
aleks.6perov@yandex.ru

Аннотация

Целью работы была разработка последовательности скрининга *in vitro* изолятов и штаммов бактерий с подобной активностью на нематодах различных экологических групп, соответственно различающихся по степени проницаемости кутикулы и имеющие разное строение стомы, что является принципиальным для проникновения спор и токсинов бактерий.

Объектами скрининга были сапробиотическая нематода *Caenorhabditis elegans*, уксусная угрица (*Turbatrix aceti*), микогельминты *Aphelenchus avenae*, *Aphelenchoides saprophilus*, *Paraphelenchus*, мигрирующие фитогельминты *Ditylenchus destructor*, личинки галловых нематод рода *Meloidogyne*.

Предлагаемая схема скрининга позволяет всесторонне оценить действие различных штаммов и изолятов на нематод различных экологических групп.

Штаммы, изоляты бактерий, вызывающие обездвиживание или гибель нематод, повторно оценивают *in vitro* на других видах нематод. В случае, когда в варианте с неразведенной суспензией изолята наблюдается максимальная смертность, и при разведении суспензии от минимальной к максимальной отмечается снижение смертности до минимальной или не отличается статис-

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (117218, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 28)

тически от контроля, то можно предположить нематцидный эффект продуктов метаболита испытанных бактерий.

При хорошо организованной микробиологической части данный алгоритм может обеспечить значительным материалом для выявления бактерий с искомыми свойствами, которые в будущем могли бы послужить основой при создании новых препаратов для защиты растений от нематод и других патогенных организмов.

Ключевые слова: скрининг, фитонематоды, бактерии-антагонисты, нематцидность, паразитарность.

**METHODOLOGICAL INSTRUCTIONS
“METHODOLOGY FOR *IN VITRO* SCREENING OF STRAINS,
ISOLATES OF BACTERIA WITH PARASITIC
AND NONMATICIDAL PROPERTIES”**

Konrat A. N.¹,

Junior Researcher of the Laboratory of Phytoparasitology

Lychagina S. V.¹,

Candidate of Biological Sciences,

Head of the Laboratory of Phytoparasitology

Shesteperv A. A.¹,

Doctor of Biological Sciences, Professor,

Chief Researcher of the Laboratory of Phytoparasitology,

aleks.6perov@yandex.ru

Abstract

The aim of this work was to develop a sequence for in vitro screening of isolates and strains of bacteria with similar activity on nematodes of various ecological groups, respectively, differing in the degree of cuticle permeability and having a different structure of the stoma, which is fundamental for the penetration of bacterial spores and toxins.

The objects of screening were the saprobic nematode *Caenorhabditis elegans*, vinegar eel (*Turbatrix aceti*), mycohelminths *Aphelenchus avenae*, *Aphelenchoides saprophilus*, *Paraphelenchus*, migrating phytohelminths *Ditylenchus destructor*, larvae of gall nematodes of the genus *Meloidyne*.

¹ All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia)

The proposed screening scheme makes it possible to comprehensively assess the effect of various strains and isolates on nematodes of various ecological groups.

Strains, bacterial isolates that cause immobilization or death of nematodes, are re-evaluated in vitro for other nematode species. In the case when the maximum mortality is observed in the variant with the undiluted isolate suspension, and when the suspension is diluted from minimum to maximum, there is a decrease in mortality to a minimum or does not differ statistically from the control, then a nematicidal effect of the metabolite products of the tested bacteria can be assumed.

With a well-organized microbiological part, this algorithm can provide significant material for identifying bacteria with the desired properties, which in the future could serve as the basis for creating new drugs for protecting plants from nematodes and other pathogenic organisms.

Keywords: screening, phytonematodes, bacteria - antagonists, nematicity, parasitism.

Введение. Фитопаразитические нематоды представляют серьёзную проблему мировому сельскохозяйственному производству. Ежегодные потери оцениваются в 125 млрд долларов США [1, 11]. Снижение ущерба, причиняемого этими фитопаразитами, может быть достигнуто разными методами: агротехническими, селекционными, химическими (нематотициды), биологическими и др. [9, 10]. Биологические методы борьбы с фитогельминтами давно привлекают внимание исследователей, поскольку они не загрязняют окружающую среду и не связаны с трансформацией генома растения-хозяина. В последние десятилетия активизировались исследования по изучению возможности применения бактерий в борьбе с фитогельминтами [2, 5, 7].

Перспективными биологическими агентами являются паразитические (бактерии рода *Pasteuria*) и антагонистические (родов *Bacillus* и *Pseudomonas* и др.) бактерии [10]. Бактериальный паразит нематод *Pasteuria penetrans*, поражает широкий спектр фитопаразитических нематод. Споры бактерий, находящиеся в почве прикрепляются к кутикуле нематод и прорастают сквозь неё. Попав в организм нематоды, бактерия быстро делится и полностью колонизирует нематоду, затем бактерии начинают производить споры, которые высвобождаются и заражают других нематод [1, 4]. На основе *P. penetrans* созданы биопрепараты для борьбы с разнообразными фитогельминтами, и в том числе с галловыми и цистообразующими нематодами [1, 14]. Среди почвенных и ризосферных бактерий имеются формы, которые угнетают развитие других микроорганизмов. Их принято называть антагонистами. Они действуют с помощью особых метаболитов и могут угнетать простейшие и многоклеточные, в том числе патогенные микроорганизмы. В литературе накопился большой материал об

ингибирующем действии бактерий-антагонистов на фитопатагенов, в том числе фитогельминтов [5, 7].

Из литературных источников известно, что бактерии родов *Bacillus* и *Pseudomonas* могут проявлять нематцидные свойства [1, 7]. При помещении личинок второго возраста *Meloidogyne incognita* и *Meloidogyne javanica* в культуральную жидкость бактерий *Bacillus thuringiensis* и *Pseudomonas fluorescens* наблюдалась их 100% гибель [12, 14]. Эти работы говорят о перспективности исследований в этой области, поскольку при скрининге можно обнаружить необходимые штаммы бактерий, которые в дальнейшем можно использовать для создания биологического препарата в борьбе с паразитическими нематодами.

Скрининг бактерий паразитов с нематцидной активностью является необходимым этапом, предшествующим созданию новых биопрепаратов [2, 4, 13].

Целью нашей работы была разработка последовательности скрининга *in vitro* изолятов и штаммов бактерий с подобной активностью на нематодах различных экологических групп [6], соответственно различающихся по степени проницаемости кутикулы и имеющие разное строение стомы, что является принципиальным для проникновения спор и токсинов бактерий.

Материалы и методы. Объектами скрининга были нематоды разных экологических групп. 1. Сапробиотическая нематода *Caenorhabditis elegans* семейства Rhabditidae является ценным модельным тест-объектом для изучения токсичности, так как ее легко культивировать в лабораторных условиях на твердых и жидких средах в чашках Петри, культуральных планшетах и в пробирках. Она является чувствительным организмом-анализатором различных токсических агентов. По сравнению с паразитическими нематодами её кутикула обладает большей проницаемостью для различных соединений. Эта нематода питается разнообразными бактериями, поэтому с её помощью можно выявить необходимый штамм бактерии, поскольку у этих нематод трубкообразная стома и крупный пищевод с большой площадью всасывания характерные для нематод бактериофагов [6], в ее рацион могут оказаться болезнетворные бактерии, метаболиты которых токсичны для неё. Выявленные паразитические или антагонистические изоляты бактерий проходят в следующий этап скрининга, где тест-объектом служит сапробиотическая нематода уксусная угрица, которая обитает в агрессивной среде и может противостоять влиянию токсинов и паразитов [1, 13].

2. Уксусная нематода или уксусная угрица (*Turbatrix aceti*) из семейства Panagrolaimidae имеет рототовую полость в виде короткой воронки, с помощью которой нематоды фильтруют содержимое забродивших жидкостей [6] и химически устойчивую кутикулу, что представляет препятствие для проникновения бактерий и их метаболитов.

Изоляты бактерий, которые подтвердили паразитарную или антагонистическую сущность при скрининге на уксусной угрице, переходят на следующий этап на микогельминтах.

3. Микогельминты *Aphelenchus avenae*, *Aphelenchoides saprophilus*, *Paraphelenchus pseudoparietinus* семейств Aphelenchidae, Aphelenchoididae. Типичные микофаги – живут за счёт здоровых, неповреждённых грибов. Для них характерно наличие стилета, через который микогельминты высасывают содержимое мицелия [1, 6]. Поэтому токсинам антагонистических бактерий сложно проникнуть в нематод. Прошедшие эту ступень скрининга штаммы и изоляты анализируются на следующем этапе.

4. Мигрирующие фитогельминты *Ditylenchus destructor* семейства Ditylenchidae. Эти фитогельминты живут в почве, ризосфере растений, корнях и клубнях. Данная нематода – полифаг, помимо растительной ткани питается содержимым грибов. В ее ротовой полости находится небольшой стилет со вздутиями [9], что затрудняет попадание крупных частиц и молекул в пищеварительную систему. Как у большинства фитогельминтов кутикула нематоды менее проницаема, в отличие от сапробиотических видов нематод. Изоляты бактерий, которые прошли четвертый этап скрининга, проходят оценку на последнем этапе – скрининг на седентарных фитогельминтах *Meloidogyne* spp.

5. Личинки галловых нематод рода *Meloidogyne* семейства Meloidogynidae. Этот род один из трёх наиболее экономически важных родов паразитических фитонематод, повреждающих культурные растения [1, 10].

Скрининг изолятов бактерий важно для будущих биопрепаратов. После 5 этапа скрининга выявленные изоляты бактерий с паразитарными или антагонистическими свойствами могут переходить к исследованиям *in vitro*.

Для перечисленных сапробиотических нематод, микогельминтов и фитогельминтов характерен переход ротового отверстия в виде трубки (*Caenorhabditis elegans*) и воронки (уксусная угрица), которые по-

звolyают бактериям проникать в организм нематод, к стилету, который позволяет проникнуть в организм нематод бактериям, находящемся только в мицелии гриба или в клетках растений при их прокалывании. Стилетные нематоды более устойчивы к проникновению в их тело химических нематотоксиков, токсинов, бактерий [6, 10], в том числе за счет слабой проницаемости кутикулы. Данный метод скрининга позволяет всесторонне изучить влияние штаммов и изолятов исследуемых бактерий на различных экологических группах нематод и исключить искажение результатов на последнем этапе. Этот этап определяется исследователем в зависимости от поставленных целей и задач.

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТЕСТ ОБЪЕКТОВ

1. Методы культивирования сапробиотических нематод *Caenorhabditis elegans*.

C. elegans поддерживают на агарозной среде для выращивания нематод (NGM), которую асептически разливают в чашки Петри (Brenner, 1974). Состав среды: NaCl, агар, пептон, 5 мг/мл холестерина в этаноле, 1 М буфер KPO_4 pH 6,0 (108,3 г KH_2PO_4 , 35,6 г K_2HPO_4 , H_2O до 1 литра), 1 М MgSO_4 .

Приготовление питательной среды.

1. Смешивают 3 г NaCl, 17 г агара и 2,5 г пептона в 2-литровой колбе Эрленмейера. Добавляют 975 мл H_2O . Закрывают горлышко колбы алюминиевой фольгой и помещают в автоклав на 50 мин.
2. Колбу охлаждают на водяной бане 55 °C в течение 15 мин.
3. Добавляют 1 мл 1 М CaCl_2 , 1 мл 5 мг/мл холестерина в этаноле, 1 мл 1 М MgSO_4 и 25 мл 1 М буфера KPO_4 и хорошо перемешивают.
4. Используя стерильные процедуры, распределяют раствор NGM в чашках Петри диаметром 60–100 мм, заполняют чашки на 2/3 агаром.
5. Перед использованием чашки Петри выдерживают при комнатной температуре 2–3 дня, для обнаружения загрязняющих веществ и испарения излишней влаги. Чашки, хранящиеся в герметичном контейнере при комнатной температуре, можно использовать в течение нескольких недель.

Перенос пластин NGM с культурой *Escherichia coli*.

Используя стерильную технику, наносят приблизительно 0,05 мл жидкой культуры *E. coli* OP50 на маленькие или средние чашки NGM или 0,1 мл на большие чашки с NGM с помощью пипетки. При желании каплю можно распределить с помощью наконечника пипетки или стеклянной палочки. При разбрасывании лужайка становится больше, что помогает визуализировать нематод. Необходимо, чтобы газон не разлился до краев пластины; лужайка должна находиться в центре. Нематоды, как правило, проводят большую часть времени возле источника питания, бактериях *E. coli* OP50. Если газон простирается до краев пластины, черви могут заползти по сторонам пластины, высохнуть и погибнуть. Газон из бактерий *E. coli* OP50 должен расти в течение ночи при комнатной температуре или 37 °С около 8 часов (перед добавлением нематод чашки охлаждают до комнатной температуры). Засеянные пластины хранят в герметичном контейнере и их можно использовать в течение 2–3 недель.

Перенос *C. elegans* на чашки Петри с *E. coli* OP50.

Для переноса *C. elegans* с одной чашки Петри на другую существует быстрый и удобный метод — это «измельчение», при котором стерильный скальпель или шпатель используют для перемещения кусочка агара со старой чашки на новую. Обычно в куске агара обитают сотни нематод. Нематоды выползают и распространяются на бактериальной лужайке новой чашки. Этот метод хорошо подходит для переноса нематод, которые зарылись в агар или их трудно собрать по отдельности (например, на голодной чашке).

Извлечение *C. elegans* с чашек Петри для приготовления суспензии нематод.

Для этих целей используют полоски стерильной фильтровальной бумаги, разрезанные шириной 1,5 и длиной 6 см. Простерилизованная (или стерильная) фильтровальная бумага аккуратно устанавливается в чашку Петри, где она собирает влагу с нематодами, затем её опускают в стерильную воду и смывают нематод. Для очистки суспензии нематод используют вороночный метод с использованием молочных фильтров или слоя гигроскопической ваты (1–2 см). Потери нематод при данном способе очистки составляют 15–20%.

2. Методы культивирования уксусной угрицы.

Культивировать угрицу можно в чистом пластиковом контейнере на овсяном толокне или белом хлебе. Она питается бактериями, образующимися во время брожения этих продуктов. В подкормку можно

добавлять тертую свежую морковь. Хлеб предварительно замачивают в воде и укладывают в контейнер слоем 2–3 см. Морковь ошпаривают кипятком и натирают на крупной терке, затем выкладывают хлеб 1 см, добавляют 50 мл воды и запускают нематод. Контейнер накрывают стеклом или крышкой для поддержания влажности. Пик активности размножения уксусной угрицы достигает приблизительно через неделю, это определяют по появлению червей на стенках контейнера и покровном стекле. Этот момент самый удобный для сбора нематод. Набирают чистую воду в лабораторный стакан, с помощью кисточки снимают нематод со стенок контейнера, а затем ополаскивают кисточку в воде. Для очистки суспензии нематод от культуральной среды используют вороночный метод с помощью молочных фильтров или слоя гигроскопической ваты (1–2 см).

3. Методы культивирования нематод-микогельминтов.

Первый способ

В качестве питательного субстрата для культивирования гриба *Alternaria tenuis* (Nees) используют картофельно-глюкозный агар (картофель очищенный – 200 г, агар – 20 г, глюкоза – 20 г на один литр воды). Для выращивания культуры гриба применяют биологические пробирки на 20 мл, в пробирки наливают по 10 мл среды, затем пробирки с горячей средой (после автоклавирования при 1 атм. в течение 45 минут) устанавливают с помощью специальных наклонных планшет таким образом, чтобы субстрат полностью покрывал поверхность ёмкостей. Гриб, посеянный на питательный субстрат уколом или суспензией, выращивают 5–10 дней в термостате при 26–27 °С. Нематод *Aphelenchus avenae*, *Aphelenchoides saprophilus*, *Paraphelenchus pseudoparietinus* в грибные культуры вносят после того, как разросшийся грибной мицелий покрыл всю поверхность питательного субстрата. В одну пробирку рекомендуется вносить 100 особей нематод. Пробирки хранят в термостате при 27 °С. Через 30–40 дней от 100 особей можно получить от 2 до 3 тысяч нематод. Очистка суспензии нематод от культуральной среды описана выше. Пробирки с нематодами хранят в холодильнике при 5–7 °С.

Второй способ

При размножении гриба *Alternaria tenuis* (Nees) можно использовать питательную среду Чапека. Среду наливают в колбы по 200 мл, закрывают плотной фольгой, затем автоклавируют при 0,5 атм. в течение 0,5 часа. После стерилизации среду разливают в чашки Петри 1/3 объема. Чашки помещают на ровную поверхность до остывания и за-

твердевания питательной среды. Гриб высевают на полностью остывший питательный субстрат и выращивают 3–10 дней в термостате при температуре 26–27 °С. Заселенные грибом чашки заражают водной суспензией нематод-микогельминтов и при комнатной температуре, через 30–40 дней количество нематод увеличивалось в 80–100 раз.

4. Методы культивирования клубневой нематоды *Ditylenchus destructor*.

Культивирование дитиленхов на клубнях картофеля

Наиболее целесообразным методом искусственного заражения клубней для получения инвазионного материала является метод их заражения суспензией дитиленхов. Предварительно нематод пипеткой извлекают из чашки Петри с кусочками заражённого картофеля в энтомологические пробирки. Нематод трижды промывают стерильной водой, т. е. после того как нематоды опустились на дно пробирки, верхний слой воды отсасывают пипеткой и добавляют стерильную воду и повторяют процедуру. Суспензию нематод (10–20 экз.) вносят в вырез визуальнo здорового клубня, предварительно промытого водой и продезинфицированного спиртом. Через два месяца при температуре +8 °С численность нематод достигает 300–400 особей.

Культивирование дитиленхов на кружочках моркови

Предназначенные для использования корнеплоды моркови тщательно промывают под струёй воды, погружают в 5%-ный раствор хлорамина на 45 минут, дважды промывают в стерильной воде, обрезают верхний слой, поврежденный хлорамином, нарезают кружочками и раскладывают по 8–10 кружочков в стерильные банки с пластмассовыми закручивающимися крышками. Дитиленхов, предназначенных для инокуляции, 3–5 раз промывают стерильной водой. В стерильную банку объемом 250 мл с кружочками моркови вносят 80–120 особей нематод. После 30 дней культивирования в термостате при 27 °С нематоды размножаются в большом количестве (16 000–17 000 экз.) и скапливаются на стенках банок и внутри корнеплодов. Используемая методика позволяет получить суспензию нематод, свободную от крахмальных зерен, кусочков субстрата, от мицелия грибов и спор.

5. Получение суспензии личинок галловых нематод *Meloidogyne* spp.

Культивирование галловых нематод на растениях в теплице или фитотроне

Выращивают несколько экземпляров растений-хозяев (огурец или томат) в вазонах объёмом не менее 1 л, при достижении трехнедельного возраста у огурцов и полутора месяца у томата, инокулируют су-

спензией галловой нематоды (от 5000 инвазионных личинок на 1 л грунта) не позднее, чем за три месяца до сбора оотек, или внесением сильно заражённых мелойдогинозом корней (50–150 г / 1 л земли). Для скорейшего развития нематод зараженное растение выращивают при температуре 25–28°C. За 3 месяца растение развивает обширную корневую систему, а нематоды вызывают образование множественных галлов и образуют достаточное количество инвазионного материала в виде оотек с яйцами. Корни с галлами отделяют и помещают в чашку Петри с небольшим количеством воды, а растение с неразрушенным корневым комом аккуратно возвращают в вазон.

Получение суспензии личинок галловых нематод

Под бинокулярной лупой препаровальными иглами отделяют яйцевые мешки (оотеки). Оотеки переносят в чашку Петри с водой, промывают (см п. 4) чашки хранят при комнатной температуре, регулярно аэрируя объем воды с помощью пипетки. Отродившихся из яиц личинок приблизительно через 3 суток собирают с помощью пипетки в пробирку.

Хранят суспензию личинок в открытых пробирках в холодильнике при температуре +6–8°C, каждые 4-5 дней добавляя воду и аэрируя.

Объектами скрининга являются:

- а) бактерии антагонисты из коллекции ВНИИБЗР, ВИЗР, ВНИИФ и других НИИ;
- б) бактерии из биопрепаратов (Баксис (ж), штамм 63-Z *Bacillus subtilis*);
- в) бактерии паразиты и антагонисты, выделенные с поверхности зараженных нематод, самок и яиц.

Основой для первичного скрининга могут служить ассоциации бактерий, выделенные из любых видов нематод. Зараженную нематоду помещают в лунку со стерильной водой, разрушают препаровальной иглой под бинокуляром, затем переносят на питательную среду Лаури Бертрони (LB) в чашки Петри. Через сутки вокруг нематоды появляются колонии бактерий. Пораженных бактериями самок и оотеки раскладывают на агаризированную среду LB. После появления колонии микроорганизмов вокруг самок и яиц путём многократных пересевов выделяют изоляты бактерий в чистые культуры.

Культуры испытуемых штаммов, изолятов, полученных из научных учреждений и выделенных из биопрепаратов и мертвых нематод, хра-

нут в холодильнике при температуре + 5 °С. Состав среды Лаури Бертрони: пептон – 10 (г/л), дрожжевой экстракт – 5, натрий хлористый – 10, агар – 20 (г/л), вода водопроводная – 1 л.

Чистая культура должна содержать бактерии только одного изолята или штамма. Культуры пересевают ежемесячно.

Получение бактериальной культуры и суспензии

Для дальнейшего исследования, наращивают рабочий объём бактериального материала. При скрининге удобно использовать жидкую бактериальную суспензию. Для выявления паразитических бактерий и с нематцидной активностью необходимо получить жидкую суспензию микроорганизмов плотностью не меньше 10^6 КОЕ/мл. Для выращивания подходит жидкая среда 925 (Langley, Kado, 1972) следующего состава, г/л: K_2HPO_4 – 3, NaH_2PO_4 – 1, NH_4Cl – 1, $MgSO_4$ – 0,3, сахара – 10, пептон – 2, вода – 1 л. Из пробирки культуру бактерий стерильной микробиологической иглой по два скребка переносят в колбы с остывшей питательной средой (150 мл). Колбы качают 72 часа (29 °С, 190 об./мин). Титр получаемых бактериальных штаммов может варьировать от 10^7 до 10^9 КОЕ/мл. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в жидкой культуре (ЖК) определяли методом Коха (Нетрусов и др., 2005).

Результаты исследований.

А) Первичный скрининг на наличие паразитических и антагонистических штаммов и изолятов бактерий.

Приготовленные культуры штаммов и изолятов бактерий используют для скрининга. Для этого, в лунку плашки или планшета вносят с помощью стерильной одноразовой пипетки хорошо размешанную взмученную суспензию нематод объемом 1 мл, в котором содержится от 40 до 60 экз., в среднем в одном мл 50 ± 10 экз. Повторность пяти вариантов в пяти повторностях опыта (1 контроль – 1 мл суспензии нематод и 1 мл стерильной воды, 2 стандарт – рекомендованный нематцид, 3–5 бактериальные суспензии без разведения 3 тестируемых штаммов бактерий (табл. 1)).

После внесения нематодной суспензии с помощью стерильной пипетки добавляем хорошо перемешанную бактериальную суспензию объемом 1 мл.

Луночный планшет накрывают крышкой и оставляют в термостате при температуре 25 °С. Через 24 часа совместного нахождения подсчитывают общее количество нематод и из них неподвижных нема-

тов в ячейках контроля и вариантов под бинокляром, через 48 и 72 часов при 25°C операцию подсчета нематод повторяли.

Таблица 1

Схема теста

№	Вариант	Состав	Число повторностей
1	Контроль	1 мл суспензии нематод и 1 мл стерильной воды	5
2	Стандарт	1 мл 0,06 г/л р-ра препарата Фитоверм 2% КЭ и суспензия нематод 1 мл	5
3	Штамм 1	1 мл суспензии нематод и 1 мл бактериальной суспензии	5
4	Штамм 2	1 мл суспензии нематод и 1 мл бактериальной суспензии	5
5	Штамм 3	1 мл суспензии нематод и 1 мл бактериальной суспензии	5

В конце эксперимента - через 72 часа тестируемых нематод помещают в стерильную воду на 24 часа для проверки возможного нематостатического эффекта. Операцию подсчета нематод повторяют. Результаты оценки испытуемых штаммов сравнивают с контрольным вариантом и определяют смертность по формуле **Смертность, % = {[Смертность в варианте, % – Смертность в контроле, %] / 100 – Смертность в контроле, %} × 100** (Шнайдера–Орелли) [3, 4].

Штаммы, изоляты бактерий, вызывающие обездвиживание или гибель нематод, повторно оценивают *in vitro* на других видах нематод.

Если после отмывания нематод водой во всех (или почти всех) вариантах наступает их гибель, значит есть вероятность выделения паразитической бактерии, которая размножилась внутри тела нематоды. Под микроскопом при увеличении 40×8 на поверхности тела и внутри нематод видны пустулы, разрушение кутикулы, следовательно, можно предполагать их заражение паразитическими или антагонистическими бактериями. Из этих нематод можно выделить изоляты паразитических или антагонистических бактерий.

Б) Скрининг бактерий с антагонистической активностью.

В лунку вносят с помощью стерильной одноразовой пипетки хорошо размешанную взмученную суспензию нематод объемом 1 мл, в котором содержится от 40 до 60 нематод, в среднем в одном мл 50 ± 10

экз. Затем добавляем хорошо перемешанную нематодную суспензию в последующие лунки (табл. 2).

Таблица 2

Схема тестирования различных концентраций

Вариант	Состав	Число повторностей
Контроль	1 мл суспензии нематод и 1 мл стерильной воды	6
Маточная суспензия	1 мл суспензии нематод и 1 мл бактериальной суспензии плотностью не менее 10 ⁶ КОЕ/мл	6
Разведение 1:5	1 мл суспензии нематод и 1 мл разведения	6
Разведение 1:10	1 мл суспензии нематод и 1 мл разведения	6
Разведение 1:100	1 мл суспензии нематод и 1 мл разведения	6
Разведение 1:1000	1 мл суспензии нематод и 1 мл разведения	6

Бактериальную суспензию разводим согласно вариантам. Процедура скрининга аналогична первичному, описанному выше.

Штаммы, изоляты бактерий которые вызвали неподвижность или гибель нематод, повторно оценивают при скрининге *in vitro* на других видах нематод.

В случае, когда в варианте с неразведенной суспензией изолята наблюдается максимальная смертность, и при разведении суспензии от минимальной к максимальной отмечается снижение смертности до минимальной или не отличается статистически от контроля, то можно предположить нематотоксичный эффект продуктов метаболита испытанных бактерий.

При изучении влияния бионематицида штамма *Bacillus* sp. BZR86 на жизнеспособность личинок галловых нематод *Meloidogyne incognita* установлено, что через 24, 48, 72 часа проведения эксперимента процент смертности нематод от суспензии бактерий при разведении в 5 и 10 раз практически не изменился, в варианте с добавлением маточной суспензии бактерии (культуральная неразведенная суспензия плотностью 10⁷ КОЕ/мл) смертность личинок галловых нематод составила 97,5%. Данный штамм показал высокую нематотоксичную активность. В контроле – все личинки живые (табл. 3).

Таблица 3

Влияние концентрации суспензии штамма *Bacillus* sp. BZR86 на жизнеспособность личинок галловых нематод через 72 часа

Вариант	Смертность, %
Контроль стерильная вода	0
<i>Bacillus</i> sp. BZR86, 10 ⁷ КОЕ/мл, разведение 1:1000	0
<i>Bacillus</i> sp. BZR86, 10 ⁷ КОЕ/мл, разведение 1:100	0
<i>Bacillus</i> sp. BZR86, 10 ⁷ КОЕ/мл, разведение 1:10	64
<i>Bacillus</i> sp. BZR86, разведение 1:5	89
<i>Bacillus</i> sp. BZR86 суспензия без разведения	97,1

После 48 часов экспозиции в суспензии и промывки в стерильной воде через 24 часа в варианте с неразведенной суспензией бактерий смертность личинок галловых нематод составила 97,1%. При разведении суспензии штамма *Bacillus* sp. BZR86 нематотическая активность снижалась.

При концентрации 10⁷ КОЕ/мл в маточной культуре смертность достигала 97,1%, при разведении суспензии в 5 и 10 раз смертность нематод снижалась до 89%, 64%, соответственно. При разведении в 100 и 1000 раз гибель личинок нематод не отмечена.

Воздействие суспензии бактерии на личинок галловых нематод по своему действию идентично воздействию на нематод химических нематотических [2, 8]. Снижение концентрации суспензии бактерии уменьшала эффективность воздействия на личинок галловых нематод. В результате проведенного эксперимента было установлено, что нематотическая активность исследуемого штамма *Bacillus* sp. BZR86 высокая и достигает 64–97,5%, можно заключить, что *Bacillus* sp. BZR86, может являться основой для создания биологического препарата для снижения численности галловых нематод (*Meloidogyne* spp.)

Заключение. Предлагаемая схема скрининга позволяет всесторонне оценить действие различных штаммов и изолятов на нематод различных экологических групп. При хорошо организованной микробиологической части данный алгоритм может обеспечить значительным материалом для выявления бактерий с искомыми свойствами, которые в будущем могли бы послужить основой при создании новых препаратов для защиты растений от нематод и других патогенных организмов.

Литература

1. *Вайшер Б., Браун Д.Дж.Ф.* Знакомство с нематодами: Общая нематология. София-Москва: Пенсофт, 2001. 206 с.
2. *Захаренко В.А.* и др. Теоретические основы разработки биологических средств защиты растений, новые отселектированные формы полезных организмов, технологии изготовления биологических средств защиты растений и их применение. М.: РАСХН, 2004. 68 с.
3. *Конрат А.Н.* Влияние бактериального бионематицида на жизнеспособность личинок мелойдогин // Сб. науч. ст. по матер. докл. научн. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». 2020. Выпуск 21. С. 142-146.
4. *Мигунова В.Д., Конрат А.Н., Лычагина С.В., Асатурова А.М., Sasanelli N.* Первичный скрининг нематицидной активности бактерий по отношению к галловым нематодам // Сб. науч. ст. по матер. докл. научн. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». 2015. Вып. 16. С. 259-260.
5. *Мигунова В.Д., Шестеперов А.А.* Природные враги фитогельминтов и основы разработки биологических средств защиты растений от фитогельминтов // Российский паразитологический журнал. 2007. № 1. С. 78-87.
6. *Парамонов А.А.* Основы фитогельминтологии. Том I. Москва: изд-во АН СССР, 1962. 479 с.
7. *Романенко Н.Д., Попов И.О., Таболин С.Б., Бугаева Е.Н., Заец В.Г.* Перспективы использования бактерий антагонистов против наиболее фитопатогенных видов нематод, вирусов и грибов // Агро XXI. 2008. № 1-3. С. 23-25.
8. *Твердюков А.П., Никонов П.В., Ющенко Н.П.* Биологический метод борьбы с вредителями и болезнями в защищенном грунте: Справочник. М.: Колос, 1993. 159 с.
9. *Шестеперов А.А., Лычагина С.В., Колесова Е.А., Конрат А.Н.* Мелойдогизм овощных культур защищенного грунта и меры борьбы с ним: уч. пособие. М.: изд-во ФГБОУ ВПО РГАЗУ, 2015. 192 с.
10. *Шестеперов А.А., Савотиков Ю.Ф.* Карантинные фитогельминтозы. Кн. 1. М.: Колос, 1995. 463 с.
11. *Шестеперов А.А., Бутенко К.О., Колесова Е.А.* Дитиленхозы сельскохозяйственных культур и декоративных растений и меры борьбы с ними: учебное пособие. М.: изд-во ФГБОУ ВПО РГАЗУ, 2014. 178 с.
12. *Ashoub A.H., Amara M.T.* Biocontrol Activity of Some Bacterial Genera against Root-Knot nematode, *Meloidogyne incognita* // Journal of American Science. 2010, 6(10): 321-328.
13. *Southey J.F.* Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. Ref. Book 402. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Commercial Colour Press, London, 1986. 202 p.
14. *Stirling G.R.* Biological control of plant parasitic nematodes. 2014. 536 p.

References

1. Weischer B., Brown D.J.F. Acquaintance with nematodes: General nematology. Sofia-Moscow, Pensoft, 2001. 206 p. (In Russ.)
2. Zakharenko V.A. et al. Theoretical foundations for the development of biological plant protection products, new selected forms of useful organisms, technologies for the manufacture of biological plant protection products and their application. Moscow, RAAS, 2004. 68 p. (In Russ.)
3. Konrat A.N. Influence of bacterial bionematicide on the viability of meloidogyne larvae. *Materials of the Scientific Conference "Theory and practice of parasitic disease control"*. 2020; 21: 142-146. (In Russ.)
4. Migunova V.D., Konrat A.N., Lychagina S.V., Asaturova A.M., Sasanelli N. Primary screening of nematicidal activity of bacteria in relation to root-knot nematodes. *Materials of the Scientific Conference "Theory and practice of parasitic disease control"*. 2015; 16: 259-260. (In Russ.)
5. Migunova V.D., Shesteperv A.A. Natural enemies of phytohelminths and the basis for the development of biological agents for plant protection against phytohelminths. *Russian Journal of Parasitology*. 2007; 1: 78-87. (In Russ.)
6. Paramonov A.A. Fundamentals of phytohelminthology. Volume I. Moscow, 1962. 479 p. (In Russ.)
7. Romanenko N.D., Popov I.O., Tabolin S.B., Bugaeva E.N., Zayets V.G. Prospects for the use of antagonist bacteria against the most phytopathogenic species of nematodes, viruses and fungi. *Agro XXI*. 2008; 1-3: 23-25. (In Russ.)
8. Tverdyukov A.P., Nikonov P.V., Yushchenko N.P. Biological method of pest and disease control in greenhouses: Handbook. Moscow, Kolos, 1993. 159 p. (In Russ.)
9. Shesteperv A.A., Lychagina S.V., Kolesova E.A., Konrat A.N. Meloidogynosis of vegetable crops of protected ground and measures for its control. Moscow, Publishing house of FGBOU VPO RGAZU, 2015. 192 p. (In Russ.)
10. Shesteperv A.A., Savotikov Yu.F. Quarantine phytohelminthiasis. Book 1. Moscow, Kolos, 1995. 463 p. (In Russ.)
11. Shesteperv A.A., Butenko K.O., Kolesova E.A. Ditylenchoses of agricultural crops and ornamental plants, and measures to control them. Textbook. Moscow, FGBOU VPO RGAZU, 2014. 178 p. (In Russ.)
12. Ashoub A.H., Amara M.T. Biocontrol Activity of Some Bacterial Genera against Root-Knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Journal of American Science*. 2010; 6(10): 321-328.
13. Southey J.F. Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. Ref. Book 402. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Commercial Colour Press, London, 1986. 202 p.
14. Stirling G.R. Biological control of plant parasitic nematodes. 2014. 536 p.