

УДК 001.4:632.3

**ИССЛЕДОВАНИЕ
ЭФФЕКТИВНОСТИ
АНТИБИОТИКОВ
И СТЕРИЛИЗАТОРОВ НОВОГО
ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ
БАКТЕРИАЛЬНОЙ И ГРИБНОЙ
КОНТАМИНАЦИИ СРЕДЫ
И ЭКСПЛАНТОВ**

Бунцевич Леонид Леонтьевич
канд. биол. наук

Палецкая Екатерина Николаевна
Костюк Марина Александровна

*Государственное научное учреждение
Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт
садоводства и виноградарства
Россельхозакадемии, Краснодар,
Россия*

Медведева Нина Ивановна
канд. с.-х. наук

*Государственное научное учреждение
Крымская опытно-селекционная станция
Северо-Кавказского зонального научно-
исследовательского института
садоводства и виноградарства
Россельхозакадемии, Крымск-4,
Краснодарский край*

Приведены экспериментальные данные по оценке эффективности ряда антибиотиков нового поколения для подавления бактериальной и грибной инфекции среды и эксплантов подвоев серии СК при введении их в культуру *in vitro*. Представлены результаты экспериментальной проверки эффективности некоторых стерилизаторов при введении в культуру *in vitro* эксплантов земляники и ежевики.

Ключевые слова: ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, ЭКСПЛАНТЫ, МЕРИСТЕМЫ, КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ

UDC 001.4:632.3

**RESEARCH OF EFFICIENCY
OF NEW ANTIBIOTICS AND
STERILIZERS FOR SUPPRESSION
A BACTERIAL AND FUNGUS
CONTAMINATION
OF NUTRIENT MEDIUM
AND EXPLANTS**

Buntsevich Leonid
Cand. Biol. Sci.

Paletskaya Ekaterina
Kostyuk Marina

*State Scientific Organization North
Caucasian Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture of the
Russian Academy of Agricultural Sciences,
Krasnodar, Russia*

Medvedeva Nina
Cand. Agr. Sci.

*State Scientific organization Krymsk
Experimental Breeding Station of North
Caucasian Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture
of the Russian Academy of Agricultural
Sciences, Krymsk-4, Krasnodar Region*

The experimental data of estimation of efficiency of new generation of antibiotics for suppression of bacterial and fungus infection of nutrient mediums and rootstocks explants of series SK at their introduction in culture *in vitro* are presented. Experimental results of some sterilizers efficiency at introduction in culture *in vitro* of strawberry and blackberry explants are presented.

Keywords: NUTRIENT MEDIA, EXPLANTS, MERISTEMS, CLONAL MICRO-PROPAGATION

Введение. Основным методом оздоровления садовых культур от инфекций вирусной и фитоплазменной этиологии является метод апикальных меристем *in vitro*. Однако существующая эффективность метода недостаточно высока – большое количество эксплантов гибнет при вводе в культуру и в процессе культивирования из-за сильной инфицированности.

Эрлих насчитывал до 12 млн. микроорганизмов на кожице 200 г яблока (цит. по З.А. Метлицкий, 1956). В условиях тёплого и влажного климата юга России на плодовых культурах развиваются многочисленные грибные и бактериальные болезни. Действенной мерой по преодолению инфекций эксплантов и среды является применение антибиотиков и стерилизаторов для обработок контаминированных объектов.

Объекты и методы исследований. Работа выполнена в центре размножения плодовых, ягодных культур и винограда СКЗНИИСиВ и Крымской ОСС СКЗНИИСиВ. За основу приняты методики В.А. Высоцкого, Е.Н. Джигадло [1, 2].

Объекты исследований – подвои яблони СК 2, СК 2У, СК 3, СК 4, СК7; земляника сорта Мармолада; гибриды ежевики ВС-1, ВС-2 и ВС-3. Среды готовили по рецепту Мурасиге-Скуга, но при этом в среду добавлялись испытуемые антибиотики. Культивировали экспланты на свету при 8-часовом освещении и температуре +25°C.

Обсуждение результатов. *Исследование эффективности антибиотиков.* На этапе работы с антибиотиками, в целях совершенствования стратегии санации питательных сред и мериклонов *in vitro*, из контаминированных объектов (мериклоны вегетативно-размножаемых подвоев серии СК) при содействии сотрудников кафедры микробиологии и защиты растений Кубанского государственного аграрного университета Горьковенко В.С. и Коростелёвой Л.А. выделены чистые культуры микроорганизмов, определена их родовая и видовая принадлежность.

Установлено, что засоряют сосуды с питательными средами и контаминируют мериклоны колонии эпифитных дрожжей и грибов *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus album*, *Cryptococcus laurentii* (дрожжи), *Penicillium cyclosum* (рис.), а также ряд не идентифицированных объектов, занесённых туда из окружающей среды с нестерильными эксплантами или другим путём.

С целью борьбы с инфекцией испытаны антибиотики нового поколения: аугментин, ксенаквин, макропен, цефепим и нистатин.

Аугментин относится к группе комбинированных пенициллинов. Действующие вещества: амоксициллин (в виде амоксициллина тригидрата), клавулановая кислота (в виде калия клавуланата).

Амоксициллин – это полусинтетический антибиотик широкого спектра действия, активный против многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Следует отметить, что амоксициллин разрушается под действием микробных ферментов (беталактамаз) и не действует на микроорганизмы, которые продуцируют эти ферменты.

Клавулановая кислота – это бета-лактам, структурно родственный пенициллинам, который обладает способностью инактивировать беталактамазы [3].



Penicillium cyclosum



Cryptococcus album



Rhodotorula glutinis

Рис. Колонии эпифитных дрожжей и грибов, выделенные в контаминированных питательных средах и мериклонах

Ксенактивин относится к группе фторхинолонов. Фторхинолоны – интенсивно развивающаяся группа синтетических антимикробных препаратов, объединенных единым механизмом – ингибированием ключевого фермента микробной клетки – ДНК-гиразы.

Ломефлоксацин (действующее вещество препарата) предложен для асептики недавно и является новым препаратом этой группы, проявляет высокую активность в отношении грамположительных микробов, имеет хорошие фармакокинетические свойства [3].

Макропен относится к группе макролидных антибиотиков. По механизму действия на микробную клетку они относятся к ингибиторам синтеза белка. Действуют преимущественно на грамположительные микробы, проявляют активность в отношении некоторых грамотрицательных микробов, микоплазм [3].

Цефепим – антибиотик группы цефалоспоринов IV поколения. Цефалоспорины IV поколения появились в асептике в последние годы и характеризуются более широким спектром антимикробного действия, чем цефалоспорины III поколения. Они проявляют высокую активность в отношении грамотрицательных бактерий. Цефалоспорины IV поколения проявляют высокую стабильность в отношении хромосомных и плазмидных бета-лактамаз [3, 4].

Нистатин – высокоактивный в отношении дрожжеподобных грибов препарат. В структуре антибиотика имеются двойные связи, обладающие высокой тропностью к стероловым структурам цитоплазматической мембраны грибов, что способствует встраиванию молекулы препарата в мембрану клетки и образованию большого количества каналов, через которые осуществляется неконтролируемый транспорт электролитов; повышение осмолярности внутри клетки приводит к ее гибели. Толерантность развивается медленно [3].

Антибиотики применяли двумя способами: введением в среду во время ее приготовления (200 мг/л) и нанесением раствора антибиотика на поверхность инфицированной среды в культивационный сосуд (200 мг/л). После этого наблюдали за развитием растений и инфекции. Данные о результатах эксперимента приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Оздоровление мериклонов вегетативно-размножаемых подвоев серии СК от посадочной инфекции

Название антибиотика	Обработка введением в питательную среду (200 мг/л)		Поверхностная обработка среды (200 мг/л)	
	Число/% обработанных эксплантов	Число/% оздоровленных (санированных) эксплантов	Число/% обработанных эксплантов	Число/% оздоровленных (санированных) эксплантов
Аугментин	50/100	0	50/100	0
Ксенаквин	50/100	0	50/100	0
Макропен	60/100	0	50/100	0
Нистатин	90/100	60/67	50/100	0
Цефепим	60/100	0	50/100	0

Анализ данных табл. 1 показывает, что в оздоровлении контаминированных мериклонов от возбудителей, выделенных *in vitro*, эффективным препаратом является нистатин (200 мг/л), предварительно введённый в питательную среду. Выход санированных (оздоровленных) объектов составил 67% от числа обработанных. Поверхностная обработка инфицированных мериклонов положительного результата не дала.

Исследование эффективности стерилизаторов. На этапе ввода сортов в культуру *in vitro* проводится очистка и стерилизация эксплантов от поверхностного загрязнения – пыли, смол, клейких веществ и возбудителей различных болезней. Экспланты отмываются в детергентах и стерилизуются. На сегодняшний день наиболее известным и применяемым в

клональном микроразмножения стерилизующим препаратом является йодид ртути (HgJ_2). Его главный недостаток – высокая токсичность для человека (при нарушении техники безопасности). Поэтому подбор малотоксичного для человека и эффективного стерилизующего препарата является актуальным.

Объектами для подбора эффективных стерилизаторов послужили экспланты земляники садовой сорта Мармолада. За основу проведения эксперимента взята методика В.А. Высоцкого [1]. В качестве препарата, замещающего йодид ртути (HgJ_2) в стерилизации эксплантов земляники испытан 15% водный раствор гидропирита ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \times \text{H}_2\text{O}_2$) в различных экспозициях.

Схема опыта:

1. Обработка эксплантов водой (контроль).
2. Обработка эксплантов йодидом ртути (HgJ_2) 0,1% (стандарт) с экспозицией 3 минуты.
3. Обработка эксплантов 15% раствором гидропирита ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \times \text{H}_2\text{O}_2$) – время стерилизации 10, 20, 30 минут.

После поверхностной обработки эксплантов их поместили на питательную среду по Мурасиге и Скугу, состоящую из минеральных солей, витаминов, сахарозы, агара. В течение месяца проводились наблюдения за регенерацией микропобегов. Оценивалось действие стерилизующего агента на эксплант и проявление стерилизующей активности вещества, т.е. обеспечение максимального количества стерильных эксплантов.

Анализ данных табл. 2 показывает, что максимальный выход санированных здоровых эксплантов земляники сорта Мармолада (60%) обеспечивает стерилизация в водном растворе иодида ртути (HgJ_2) 0,1%. Значительную степень оздоровления (30%) обеспечивает стерилизация в водном 15%-м растворе гидропирита с экспозицией 30 минут. Снижение продолжительности стерилизации в растворе гидропирита приводит к уменьше-

нию выхода здоровых эксплантов до 10% при экспозиции 20 минут и полному отсутствию здоровых эксплантов при экспозиции 10 минут.

Следует отметить, что продолжительное нахождение эксплантов в стерилизующем растворе (30 мин.), необходимое для достижения максимального эффекта оздоровления в растворе гидропирита, неблагоприятно сказывается на жизнеспособности оздоровленных эксплантов при дальнейшем культивировании *in vitro*.

Таблица 2 – Анализ эффективности стерилизующих веществ при предпосадочной поверхностной обработке эксплантов земляники сорта Мармолада

Количество эксплантов	Стерилизующее вещество				
	Без обработки (контроль)	HgJ ₂ 0,1% (стандарт)	15% раствор гидропирита, экспозиция 10 мин.	15% раствор гидропирита, экспозиция 20 мин.	15% раствор гидропирита, экспозиция 30 мин.
Посажено, шт./%	200/100	200/100	200/100	200/100	200/100
Инфицировано, шт./%	200/100	80/40	200/100	180/90	140/70

В ходе исследований поставлен опыт по подбору наиболее эффективного стерилизующего средства для санации эксплантов ежевики. В качестве стерилизующих реагентов изучены 0,1% раствор йодида ртути (HgJ₂, контроль) и бытовой препарат «Белизна», содержащий гипохлорид натрия, разбавленный водой в соотношении 1 : 1; 1 : 2 и 1 : 4. Время экспозиции – 4 минуты.

В качестве опытных объектов использовали экспланты гибридов ежевики ВС-1, ВС-2 и ВС-3. Следует отметить, что в первой декаде опыта (через 10 дней после стерилизации и высадки на питательную среду) наблюдался высокий выход стерильных эксплантов (100%) в вариантах с использованием йодида ртути 0,1% и препарата «Белизна» в разведении во-

дой 1 : 4 и 1 : 2. Однако во второй декаде проведения опыта произошли резкие изменения: у некоторых эксплантов проявились некрозы, часть меристем почернела и к концу декады погибла (табл. 3).

Анализ полученных данных показывает, что наиболее сильнодействующим стерилизатором является бытовой препарат «Белизна» в разведении 1 : 1. Инфицированных эксплантов в этом варианте опыта не было. Однако действие реагента на меристемы было довольно жестким. При этом здесь четко прослеживается реакция испытуемых образцов.

Так, наиболее толерантным к стерилизующему агенту был образец ВС-3. Здесь отмечен самый высокий выход жизнеспособных эксплантов (80,7%) и наиболее низкий процент (19,3) погибших.

У образцов ВС-1 и ВС-2 выход живых меристем составил 64,2 и 57,2%, а погибших от токсичного действия стерилизатора – 35,8 и 42,8%, соответственно (см. табл. 3).

Таблица 3 – Результативность стерилизации при введении в культуру *in vitro* эксплантов гибридов ежевики

Стерилизующий реагент	Эффективность стерилизации, %	Сортообразец		
		ВС-1	ВС-2	ВС-3
HgI ₂ , 0,1%, контроль	жизнеспособные	58,8	84,3	72,2
	инфицированные	5,8	5,2	0,0
	погибшие	35,3	10,5	27,8
«Белизна» 1 : 1	жизнеспособные	64,2	57,2	80,7
	инфицированные	0,0	0,0	0,0
	погибшие	35,8	42,8	19,3
«Белизна» 1 : 2	жизнеспособные	77,6	69,3	79,6
	инфицированные	8,4	7,7	6,8
	погибшие	14,3	23,0	13,6
«Белизна» 1 : 4	жизнеспособные	52,0	51,3	54,0
	инфицированные	37,7	36,2	36,7
	погибшие	10,3	12,4	9,3

Действие препарата «Белизна» в разведении 1 : 2 было более мягким. Выход живых эксплантов был у образцов ВС-1 и ВС-2 выше и составил 77,6 и 69,3%, значительно ниже было количество погибших эксплантов – 14,3 и 23,0%. У образца ВС-3 эти показатели составили 79,6 и 13,6%.

Однако здесь отмечено наличие инфицированных эксплантов, составившее для образцов ВС-1, ВС-2 и ВС-3 – 8,1; 7,7 и 6,8%, соответственно. Самый низкий эффект стерилизации отмечен в варианте опыта с использованием препарата «Белизна» в разведении 1 : 4. Уровень инфекции здесь был самым высоким в опыте.

Так, количество инфицированных эксплантов у образцов ВС-1, ВС-2 и ВС-3 составило 37,7; 36,2; 36,7; а выход жизнеспособных эксплантов 52,0; 51,3 и 54,0%, соответственно. В то же время действие препарата на растительную ткань было наиболее мягким, так как количество погибших эксплантов было в пределах 9,3-12,4%.

В контрольном варианте с использованием 0,1% раствора йодида ртути также отмечен выпад эксплантов от токсичного действия препарата.

Следует отметить, что в этом варианте опыта также хорошо прослеживается различная реакция сортообразцов на действие реагента. Так, у образца ВС-2 отмечен наиболее высокий выход жизнеспособных меристем (84,3%) и низкий процент (10,5) погибших.

У образца ВС-3 выход живых меристем несколько ниже – 72,2%, а погибших – 27,8%, наиболее чувствительным к стерилизатору был образец ВС-1. Количество погибших меристем было самым высоким в этом варианте опыта и составило 35,3%.

Выводы. В оздоровлении контаминированных мериклонов вегетативно размножаемых подвоев яблони серии СК от возбудителей, выделенных *in vitro*, эффективным препаратом является нистатин в концентрации 200 мг/л среды, введённый в питательную среду предварительно.

Выход saniрованных объектов составил 67% от числа обработанных. Поверхностная обработка антибиотиками контаминированных мериклонов положительного результата не принесла.

Изучение эффективности новых стерилизаторов для поверхностной санации эксплантов земляники сорта Мармолада показало, что их обработка в водном 15%-м растворе гидропирита ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$) с экспозицией в 30 минут обеспечивает 30%-ю степень оздоровления эксплантов.

При этом максимальный выход saniрованных эксплантов земляники в объёме 60 % обеспечивает их стерилизация в водном растворе йодида ртути (HgJ_2) 0,1 %.

В исследовании, где в качестве стерилизующего средства был использован водный раствор бытового препарата «Белизна», содержащий гипохлорид натрия, максимальный эффект (57-81 %) при санации эксплантов (гибриды ежевики ВС-1, ВС-2 и ВС-3) был достигнут при разведении 1:1.

Литература

1. Высоцкий, В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук.– Москва, 1998. – 44 с.
2. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами: под ред. Е.Н. Джигадло. – Орёл: ГНУ ВНИИСПК, 2005. – 50 с.
3. Антибактериальные лекарственные средства. Методы стандартизации препаратов. – М.: Медицина, 2004. – 944 с.
4. Vostricova, T. Yu./In vitro activity of cefepime and other antimicrobials against gram-negative bacteria /Vostricova, T. Yu., Beloborodova N. V., Kurchanov V. A.. J Chemother. – 1999; 11: Suppi 2: 107.