

АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (Ph.D.)
по специальности «6D070100 – Биотехнология»

Молжигитовой Асель Ермаковны

**на тему: «Разработка способа применения микроорганизмов против
возбудителя бактериального ожога в яблоневых садах Казахстана»**

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена скринингу и изучению ингибирующей активности коллекционных и новых штаммов микроорганизмов, выделенных из растений-хозяев и разработки способа их применения против возбудителя бактериального ожога (*Erwinia amylovora*) плодовых культур Казахстана.

Актуальность темы исследования. В последние годы в плодоводстве Казахстана сложилась серьезная проблема, вызванная такой болезнью, как бактериальный ожог, который считается одним из наиболее опасных заболеваний, имеющих карантинный статус. По степени вредоносности с ним не может сравниться ни одна из известных болезней плодовых деревьев. В результате поражения этим заболеванием молодые саженцы плодовых деревьев могут погибнуть за один сезон, старые сады – за 2-3 года. Экономический ущерб выражается в снижении или полной потери урожая, затратах на выкорчевку погибших деревьев и закладку нового сада. В основном подвержены этому заболеванию груши, но болезнь может поражать также яблони, боярышник, айву, рябину. К сожалению, масштабы заболевания с каждым годом расширяются. Может повредить все плодовые деревья и кустарники семейства *Rosaceae*.

На данный момент эффективных мероприятий против возбудителя бактериального ожога *E. amylovora* не существует. Химические методы борьбы используются для только снижения развития инфекции и профилактики новых заражений. Современные фунгициды, кроме медьсодержащих, не действуют на возбудителя бактериального ожога. В литературе, касающейся мер борьбы с бактериальным ожогом, предложено опрыскивание деревьев 0,5-1% бордосской жидкостью или 0,3% хлорокисью меди в начале распускания почек, перед цветением и сразу после него, а также после сбора урожая. Эффективно опрыскивание во время цветения, при этом отмечено, что регулярное опрыскивание медьсодержащими препаратами в садах привело к мутациям бактерии *E. amylovora*, в результате которых появились ее разновидности, устойчивые к этому методу защиты. Альтернативным и наиболее эффективным способом снижения популяции возбудителя является использование биопрепаратов. Основное преимущество этого метода в том, что он не оказывает вредного воздействия на окружающую среду и ее биоту. Это связано с тем, что активные антагонистические штаммы изолированы из этой же эпифитной среды. Поэтому в последние годы во всем мире, в том числе и в нашей стране, большое внимание уделяется поиску и разработке технологии получения

биопрепаратов на основе активных микроорганизмов, способных ингибировать рост возбудителя бактериального ожога.

В связи с этим разработана система применения микроорганизмов, обладающих ингибирующей активностью против возбудителя бактериального ожога в яблоневых садах Казахстана является весьма актуальной.

Цель работы: Определение эффективности микроорганизмов с ингибирующей активностью против возбудителя бактериального ожога плодовых культур и разработка способа их применения.

Задачи исследования:

- Проведение фитосанитарного мониторинга плодовых (яблоня) садов в различных эколого-географических регионах Казахстана и выделение новых штаммов микроорганизмов.

- Скрининг и отбор коллекционных штаммов микроорганизмов и вновь выделенных изолятов, обладающих антагонистической активностью против *E. amylovora*.

- Исследование влияния УФ-лучей на ингибирующую активность отобранных штаммов в отношении возбудителя бактериального ожога плодовых культур.

- Выявление основных метаболитов в культуральной жидкости отобранных штаммов и определение их ингибирующей активности против *E. amylovora*.

- Разработка способа применения отобранных штаммов и определение их биологической эффективности против возбудителя бактериального ожога.

Объекты исследования. В работе использовали коллекционные культуры микроорганизмов ТОО «Научно-производственного центра микробиологии и вирусологии», а также новые изоляты, выделенные из образцов (плоды, листья, ветки) филлосферы яблони и груши, собранные в ходе маршрутных обследований в зонах промышленного садоводства Жамбылской, Туркестанской и Алматинской областей Казахстана. В исследованиях также был использован польский изолят 48М, выделенный из листьев яблони на базе Национального научно-исследовательского института садоводства, отдел фитопатологии (г. Скерневице, Польша).

Методы исследования. В ходе работы были использованы общепринятые фитопатологические, микробиологические, биохимические, молекулярно-генетические и химические методы исследований.

Научная новизна исследования.

Сущность новизны результатов исследования заключается в выделении новых и проведении отбора активных штаммов эпифитных микроорганизмов, проявляющих антагонистическую активность в отношении возбудителя бактериального ожога, распространенного в плодовых садах Казахстана.

Впервые в Казахстане были отобраны и предложены для борьбы с бактериальным ожогом плодовых культур микроорганизмы с антагонистической активностью.

Впервые выделены и изучены бактерии *Bacillus amyloliquefaciens*, *Lactobacillus plantarum* и коллекционный штамм актиномицета *Streptomyces canofumeus*, обладающие высокой ингибирующей активностью в отношении возбудителя бактериального ожога *E. amylovora*.

Определены основные метаболиты у штаммов, которые проявили антагонистическую активность в отношении *E. amylovora*.

В результате облучения бактерии *B. amyloliquefaciens* ультрафиолетовыми лучами получен мутантный штамм MB40 с высокими продуктивными свойствами.

Разработан способ применения штаммов *B. amyloliquefaciens* MB40 и *L. plantarum* 17М против возбудителя бактериального ожога плодово-семечковых культур и дана оценка их эффективности.

Теоритическая значимость и практическая ценность исследования.

В результате проведенного скрининга отобраны высокоактивные штаммы микроорганизмов, выявлены основные метаболиты, обуславливающие их антагонистическую активность и разработаны способы применения отобранных штаммов против возбудителя бактериального ожога плодовых культур Казахстана.

Полученные результаты позволят использовать выделенные активные штаммы микроорганизмов с антагонистической активностью для создания отечественных биопрепаратов против возбудителя бактериального ожога (*E. amylovora*) плодовых культур. Результаты исследовательской работы внесут вклад в снижение или отказ от применения химических препаратов, а также биологическую защиту плодовых деревьев от бактериального ожога, что приведет к повышению качества и улучшения жизни населения за счет обеспечения его экологически чистой продукцией.

Следует отметить, что препараты на основе бактериальных культур будут более рентабельны, гораздо дешевле, так как не требуют дополнительных затрат на выделение антибиотиков, препаративной формой их будет культуральная жидкость, содержащая споры, клетки бактерий и биологически активные метаболиты.

Таким образом, данная диссертационная работа по разработке способа применения микроорганизмов с антагонистической активностью против возбудителя бактериального ожога плодовых культур имеет большую теоритическую значимость и практическую ценность.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Скрининг коллекционных и новых штаммов микроорганизмов позволяет выявить высокоактивные штаммы, подавляющие рост возбудителя бактериального ожога плодовых культур *E. amylovora*.

2. Облучение ультрафиолетовыми лучами позволяет получить мутантный штамм *B. amyloliquefaciens* MB40, превышающий в 2,8 раза активность исходного родительского штамма.

3. Исследование состава культуральной жидкости перспективных штаммов позволило выявить основные метаболиты и определить их ингибирующую активность в отношении возбудителя бактериального ожога.

4. Разработанный способ применения опытных образцов биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов (*B. amyloliquefaciens* MB40 и *L. plantarum* 17M) позволяет эффективно защищать плодовые деревья от бактериального ожога.

Основные результаты исследования и выводы:

1. При проведении фитосанитарного мониторинга садовых ценозов Жамбылской, Туркестанской и Алматинской областей Казахстана из собранных 47 образцов (плоды, листья, ветки) филлосферы яблони и груши выделено 216 изолятов, из которых бактерий – 142, грибов - 37 и дрожжей - 37 изолятов.

2. Проведенный скрининг коллекционных и новых штаммов микроорганизмов показал, что наибольшую антагонистическую активность против возбудителя бактериального ожога *E. amylovora* проявили *L. casei* 139, *L. casei* 173, *St. canofumeus* K20/1, *B. amyloliquefaciens* MB40, *L. plantarum* 17M, *P. agglomerans* 48M.

3. В результате облучения ультрафиолетовыми лучами получен мутантный штамм *B. amyloliquefaciens* MB40, превышающий в 2,8 раза активность исходного родительского штамма.

4. Выявлены основные метаболиты в культуральной жидкости у отобранных штаммов, обуславливающие ингибирующую активность в отношении *E. amylovora*. У штамма *B. amyloliquefaciens* MB40 - это ацетоин и 2,3-бутандион, у штамма *L. plantarum* 17M – 2,3- бутандион, уксусная и молочная кислоты.

5. Разработан способ применения опытных образцов препаратов на основе штаммов *B. amyloliquefaciens* MB40 и *L. plantarum* 17M против бактериального ожога плодовых культур, заключающийся в двукратной обработке садовых деревьев культуральной жидкостью с нормой расхода 4 л/га, что позволяет эффективно защищать плодовые деревья от бактериального ожога. На восприимчивом сорте яблони «Апорт» биологическая эффективность опытных образцов препаратов на основе штаммов *B. amyloliquefaciens* MB40 и *L. plantarum* 17M составила - $70 \pm 0,2\%$ и $83,4 \pm 0,4\%$ соответственно, на устойчивом сорте «Star Crimson» - $75,3 \pm 0,5\%$ и $89 \pm 0,1\%$ соответственно.

6. **Личный вклад автора.** Автор самостоятельно провел анализ литературных данных по теме исследования, экспериментальные работы, статистическую обработку, анализ результатов исследования и оформление рукописи диссертации.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа выполнена в рамках научно-исследовательского проекта и программы грантового финансирования: AP05131543 «Разработка биопрепарата против возбудителя бактериального ожога плодовых культур» и BR18574022 «Микробные препараты для борьбы с бактериальным ожогом плодовых культур». Научный руководитель д.б.н., профессор А.К. Саданов.

Апробация работы.

Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на Международных конференциях в их числе:

- Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби элемі» в рамках V Международных Фарабиевских чтений (Алматы, 2018 г.);
- Международный Симпозиум: «Астана Биотех 2018» (г. Астана, 2018 г.);
- Международная конференция Сохранение Азии: «Актуализация сохранения в меняющейся Азии» (г. Бишкек, 2018 г.);
- 20-я Международная конференция по биоразнообразию и экосистемам (г. Токио, 2018 г.);
- 4-й Международный Симпозиум по биологическому контролю бактериальных болезней растений (г. Витербо, 2019 г.);
- 2-й Международный симпозиум по бактериальному ожогу розоцветных растений (г. Мичиган, 2019 г.);
- XX Анализ ЕВРО (г. Стамбул, 2019 г.);
- Международная научно-практическая конференция Инновации в сельском хозяйстве и экологии (г. Рязань, 2020 г.);
- 12-й Международный конгресс по патологии растений (г. Лион, С.63, С.67, 2023 г.);
- Международная научно-практическая конференция, посвященной 65-летию Научно-Исследовательского Института Проблем биологической безопасности МЗ РК (г. Алматы, С.268-269, 2023 г.).

Публикации.

В открытой печати по материалам диссертации опубликовано 28 работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых зарубежных научных изданиях, индексируемых в базах данных *Web of Science* или *Scopus* с ненулевым импакт-фактором (European journal of plant pathology 2020- 70% (Q2), Journal of plant pathology 2020 – 41% (Q3), World journal of microbiology and biotechnology 2023 – 73% (Q2); Journal of plant pathology 2024 – 56% (Q2)); 5 статей в республиканских научных журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки РК; 4 статьи в отечественных рейтинговых изданиях, 1 статья и 11 тезисов в материалах международных конференции. По результатам проделанной работы получено 2 патента Республики Казахстан на изобретение и 1 заявка, с решением о выдаче патента на изобретение: 1) №34036, регистрационный № 2018/0536.1 от 29.11.2019 года; 2) №35238, регистрационный № 2020/0149.1 от 03.09.2021 года; 3) регистрационный № 2023/0167.1 от 07.03.2023 года.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 120 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: нормативные ссылки, определения, обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, список использованных источников из 245 наименований. Работа включает 18 таблиц, 41 рисунок и 3 приложения.