

соединениями, хитиназа обуславливает потенциальные возможности гриба в биоконтроле за патогенными для сельскохозяйственных культур организмами.

Полученные характеристики препарата хитиназы гриба *Trichoderma viride* F-1, позволят в дальнейшем разработать оптимальную схему его получения, очистки и проведения тестирований на фитопатогенах и вредителях растений.

1. Безбородов А.М., Решетилова Н.А., Тиунова Н.А. в-Глюканазы микроорганизмов// Прикладная биохимия и микробиология 1982.- Т.18. -В.6.- С.806-815.
2. Чигалейчик А.Г., Пириева Д.А. Внеклеточная хитиназа *Aeromonas liquefaciens* // Прикладная биохимия и микробиология. - 1976.- Т.12.- В.2. -С.238-242.
3. Бекмаханова Н.Е., Успанов А.К. Антибиотические свойства активных штаммов грибов, выделенных из ризосферы сахарной свеклы //Труды ИМиВ АН КазССР. – Алма-Ата. - 1986. - Т.30. - С. 61-68.
4. Успанов А.К., Тулемисова К.А., Бекмаханова Н.Е. Антагонизм и гиперпаразитизм триходермы к фитопатогенным грибам //Вестник АН КазССР. -1986. -№2. -С. 47-51.
5. Бекмаханова Н.Е., Шемшура О.Н. Скрининг высокоактивных штаммов-антагонистов, перспективных против возбудителей риса. Известия НАН РК, серия биологическая. - 1997. - № 1. - С. 7-10.
6. Бекмаханова Н.Е., Шемшура О.Н., Разживин А.А. Поиск и изучение перспективных штаммов грибов Триходерма, обладающих нематостатическими свойствами - Известия МН-АН РК, серия биологическая. - 1998. - № 4. - С. 41-44.
7. Шемшура О.Н., Бекмаханова Н.Е., Мазунина М.Н. Подбор питательных сред для усиления антагонистической активности микроскопических грибов // Биотехнологии – 2000. Тезисы докл.– Пушино. – 2000. – С.70
8. Бекмаханова Н.Е., Шемшура О.Н. Токсическое действие алкалоидов гриба *Aspergillus niger* 8 на паразитические нематоды. - Известия МН-АН РК, серия биологическая. - 1998. -№ 5-6. - С.34-40.
9. Bekmakhanova N.E., Shemshura O.N. Alkaloids of microscopic fungi for plant protection // thesis of poster declaration at the International conference “Bioactive Fungal Metabolites” – Impact and Exploitation” Wales Swansea (UK). - 2001. -P.49.
10. Шемшура О.Н., Бекмаханова Н.Е., Джакибаева Г.Т., Мазунина М.Н., Султанкулова К.Т. Синтез аминокислот и его взаимосвязь с антагонистической активностью микроскопических грибов // Известия МН-АН РК, серия биологическая. - 2002. - №1. - С.84-90.
11. Шемшура О.Н., Джакибаева Г.Т., Бекмаханова Н.Е. Сравнительное изучение ферментативной способности штаммов-антагонистов из рода *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*. - Известия МН-АН РК, серия биологическая. - 1998. -№ 1. - С. 73-77.
12. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., et al. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951.- V. 193. - №1. - P. 265-275.

Берілген жұмыстың зерттеу нәтижесінде хитинологиялық белсенділігі жоғары микроскопиялық саңырауқұлақ ол антагонистік белсенділік қасиетке ие.

This paper presents the results of the study chitinolytic activity of the most active strains of microscopic fungi having antagonistic activity

УДК 635.21:632.3

О.Н. Шемшура, Н.Е. Бекмаханова, М.Н. Мазунина
ИССЛЕДОВАНИЕ НЕМАТОСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ ГРИБА
ASPERGILLUS SP.

(Институт микробиологии и вирусологии РГП «ЦБИ» МОН РК)

*Установлена нематостатическая активность белок содержащих компонентов гриба *Aspergillus sp.*, проявляющаяся в зимний период культивирования гриба. Определено содержание белка в исследуемых образцах и его аминокислотный состав.*

Мировые потери сельскохозяйственной продукции от нематод составляют в среднем 7-10%. В нашей стране ощутимый ущерб сельскому хозяйству наносят овсяная, картофельная, свекловичная, галловые и другие нематоды. В теплицах галловые нематоды могут вызывать до 50% потерь продукции томатов.

Существующие в настоящее время подходы и методы защиты от нематод либо не обладают достаточной эффективностью, либо имеют ограничения, связанные с токсичностью применяемых химических нематоцидов.

В последние годы значительно возрос интерес к фундаментальным исследованиям в области экспериментальной микологии, а также использованию продуктов синтеза микроскопических грибов в сельском хозяйстве, медицине, пищевой промышленности и др. отраслях народного хозяйства.

В процессе эволюции растения, в том числе и микроскопические грибы, выработали механизмы, позволяющие им успешно противостоять неблагоприятным воздействиям, в том числе, различного

рода патогенным организмам. Важнейшими компонентами подавляющего большинства таких механизмов являются вещества белковой природы [1-5].

Целью данной работы явилось исследование нематостатических свойств белков содержащих компонентов, выделенных из мицелия микроскопического гриба *Aspergillus sp.*

Материалы и методы

В работе использовали микроскопический гриб *Aspergillus sp.* Культивирование гриба осуществляли в течение 5-ти суток на жидкой питательной среде глубинным способом в условиях качалки при температуре 28⁰С.

Состав питательной среды: (г/л): глюкоза – 50; пептон -10,0; соевая мука – 5,0; KNO₃ -2,0; MgSO₄·7H₂O –0,5; CaCl₂ – 0,1; вода дистиллированная pH –6,2.

Мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через бумажной фильтр.

Для фракционирования белковых компонентов из мицелия использовали 2 метода: Baker F.E. e.a. (1947) и Voivin A., Mesrobianu L. (1938) [6-7].

Содержание белка в белковых пробах определяли методом Bradford, 1976 [8]. Аминокислотный состав белковых проб проводили методом газохроматографии (ГХ). Для исследования нематостатической активности белковых компонентов, выделенных из мицелия гриба *Aspergillus sp.* использовали нематоды *Ditylenchus destrucnor*.

Компоненты, вызывающие гибель менее 50% нематод в течение 3-х суток, или действие их будет временным (нематоды после переноса в воду восстанавливают активность) отнесены к компонентам мягкого (нематистатического) действия.

Результаты и обсуждение

При фракционирование белковых компонентов различными методами получено 43 образца. Тестирование на нематодах *Ditylenchus destrucnor* белковых фракций показало, что большинство из них не оказывают никакого влияния на них.

Нематостатическое действие отмечено у 2-х белковых фракций: M₁ и M₂, полученных по методу Буавена-Месробяна. Данные фракции были исследованы в отношении нематод при различных концентрациях. Результаты исследований представлены в таблице 1. Для белковой фракции M₁ потеря активности нематод наблюдалась через 72 часа после обработки при всех концентрациях и составила от 12,8% до 56%, однако через 24 часа произошло частичное восстановление активности в варианте с концентрацией 50 мг/мл и полное восстановление активности при более низких концентрациях. Оставшиеся 47,6% неактивных нематод в варианте с концентрацией 50 мг/мл, после переноса в воду полностью восстановили свою активность. Для белковой фракции M₂ через 72 часа после обработки все нематоды были активны. Только через 96 часов после обработки при концентрации 50 мг/мл отмечена потеря активности у 44,7% нематод. Очень слабое действие на нематоды оказывали концентрации 25 мг/мл и 10 мг/мл, при которых потеря активности составила 9,1% и 8,3% соответственно. Концентрации 10 мг/мл, 5 мг/мл, 2,5 мг/мл и 1 мг/мл на активность нематод никакого влияния не оказывали. При переносе неактивных нематод в воду наблюдалось полное восстановление их активности. При исследовании белковых образцов была выявлена зависимость нематостатической активности от культивирования гриба в различные сезоны. Оба белковых образца M₁ и M₂ проявляют нематостатическую активность в период культивирования гриба в зимний период. В весенний период активность присутствовала только у образца M₁, которая полностью отсутствовала в летний период, в то время как образец M₂, проявлял незначительную активность. В осенний период нематостатическая активность образца M₁ была минимальной, а у образца M₂ она полностью отсутствовала. На рисунке 1 показано сравнительное нематостатическое действие белковых образцов при одинаковой концентрации 50 мг/мл, полученных из мицелия в различные сроки роста гриба.

На диаграмме видно, что образцы M₁ и M₂ влияют на активность нематод *Ditylenchus destrucnor* в большей степени в зимний период. Нематостатическое действие на *Ditylenchus destrucnor* полностью отсутствует у образца M₁ в летний период и у образца M₂ в весенний и осенний периоды роста гриба.

Было установлено, что исследуемые образцы M₁ и M₂ представляют собой протеин-полисахаридный комплекс, в котором содержание белка составило 12,5 мкг в 1 мг сухого вещества для M₁ и 37,5 мкг в 1 мг сухого вещества для M₂. Определён аминокислотный состав белковых компонентов M₁ и M₂ (Табл.1).

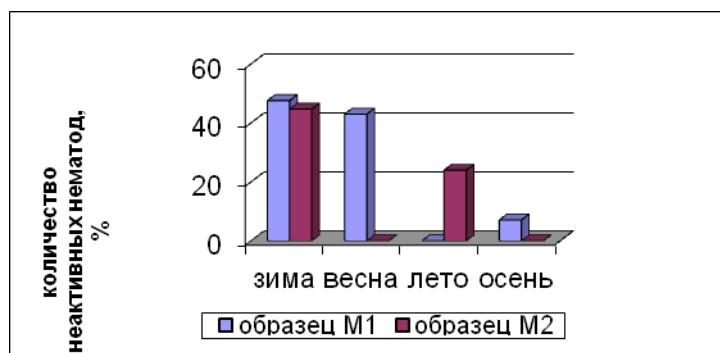


Рисунок 1. Изменение нематостатической активности белковых образцов гриба *Aspergillus sp.* в зависимости от сезонного роста гриба

Таблица – 1 Аминокислотный состав белковых компонентов гриба *Aspergillus sp.*

№ п/п	Наименование аминокислот	Формулы аминокислот*	Концентрация аминокислот, мг/100 г	
			M ₁	M ₂
1	Триптофан	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	42	60
2	Лизин	H ₂ N(CH ₂) ₄ CH(NH ₂)CO ₂ H	74	85
3	Аргинин	NH=C(NH ₂)NH(CH ₂) ₃ CH(NH ₂)CO ₂ H	80	76
1	2	3	4	5
4	Гистидин	C ₃ H ₃ N ₂ CH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	64	75
5	Тирозин	HOOC ₆ H ₄ CH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	35	44
6	Фенилаланин	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	72	69
7	Цистин	HOOCCH(NH ₂)CH ₂ SSCH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	12	20
8	Метионин	CH ₃ SCH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	32	62
9	Треонин	CH ₃ CH(OH)CH(NH ₂)CO ₂ H	60	90
10	Валин	(CH ₃)CHCH(NH ₂)CO ₂ H	55	98
11	Изолейцин	CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)CH(NH ₂)CO ₂ H	28	58
12	Лейцин	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	68	112
13	Аланин	C ₃ H ₇ NO ₂	следы	0
14	Глицин	(NH ₂)CH ₂ CO ₂ H	5	следы

Газохроматографический анализ белковых фракций M₁ и M₂ показал:

1. Качественный состав фракций M₁ и M₂ не различается;
2. Наблюдаются незначительные расхождения в количественном содержании лизина, аргинина, гистидина, тирозина и фенилаланина в составе фракций M₁ и M₂;
3. В составе фракции M₂ присутствуют примерно в 2 раза больше лейцина, валина, изолейцина, метионина, цистина по сравнению с фракцией M₁;
4. В составе фракции M₂ присутствуют примерно в 1,5 раза больше треонина и триптофана.
5. Фракция M₂ содержит более высокие концентрации аминокислот.

Таким образом, установлено, что нематостатическая активность обоих белок содержащих компонентов гриба *Aspergillus sp.* проявляется в зимний период культивирования гриба, при этом по содержанию белка, фракция M₂ более чем в 2 раза превосходит фракцию M₁ и содержит более высокие концентрации аминокислот.

1. Калунянц К.А., Дорохов В.В., Лосякова Л.С. и др. Направленный биосинтез ферментов микроорганизмами //Труды ВНИИ синтезбелок. М. 1974.- В.2. – С.220.

2. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: Высшая школа. – 1980. – С.272.

3. Караваева Н.Н., Садыходжаева Н.Г. Получение высоко устойчивого препарата протеолитического фермента гриба *Torula thermophila* при культивировании в ферментере //прикладная биохимия и микробиология. – 1985. – Т.21. -№1. – С.24-27.

4. Антипова Л.В., Насонова Л.В. Исследование возможности получения белкового концентрата из кератинсодержащего сырья методом микробной ферментации //Тез.докл. 2 науч.-практ. Конф. «Разработка и внедрение безотходных технологий, использование вторичных ресурсов». Киров. -1998. – С.80-81.

5. Валуева Т.А., Мосолов В.В. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений// Успехи биологической химии. – 2002. - Т. 42. - С. 78-90.
6. Baker F.E., Sommer H., Mayer K.F. e.a. Antigenic structure of P. Pestis and the isolation of a crystalline// Soc. exptl. boil. and med. – 1947. - Т. 64. - № 6. - P. 139-141.
7. Boivin A., Mesrobianu L. Recherches sur les antigenes soma-tigyes du bacolle typhigue // Compt. rev. soc. Boil. - 1938. - Т. 12. - № 1. - P. 9 - 11.
8. Bradford A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein during binding//Analytical Biochemistry. -1976.- Vol. 72. - P. 248-254

Немостатикалық ақуыздың белсенді компоненттері бар саңырауқұлақ бекітілген. *Aspergillus sp.* Осы қыс мезгілі саңырауқұлақ дамуында көрінеді. Зерттеу барысында зерттелетін үлгілерде ақуыз құрамы және оның аминқышқыл құрамы табылған.

Nematostatic activity of the protein containing components of the fungus *Aspergillus sp.* manifested in the winter cultivation was established. Protein content in the samples and its amino composition was determined.

Г.Н. Чуркина

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЮЖНЫХ ЧЕРНОЗЕМОВ В ПЛОДОСМЕННЫХ СЕВООБОРОТАХ

(Научно-производственный центр зернового хозяйства им. А.И. Бараева)

В статье приводятся результаты исследований по изучению влияния различных сельскохозяйственных культур на микробиоценоз почвы южных черноземов в плодосменных севооборотах. Моно возделывание пшеницы и пшеницы по различным предшественникам в плодосменах вызывают высокое содержание азотсодержащих бактерий в почве, что характеризует в посевах этих культур интенсивность процессов минерализации органического вещества на южных черноземах.

Наиболее интересными и до настоящего времени малоизученными являются проблемы, связанные с воздействием высших растений на микроорганизмы почвы. Поскольку растения не способны перемещаться в пространстве, то они должны обеспечить оптимальные условия для своего существования на одном месте: должны обладать способностью, защищаться, привлекать необходимых для их жизнедеятельности организмы, ликвидировать конкурентов, активизировать и регулировать некоторые процессы метаболизма с помощью других организмов, обитающих в почве. Микрофлора использует корневые выделения, как источники питания, поэтому их концентрация на поверхности корней снижается, что изменяет условия корневого питания растений. Метаболиты могут оказывать влияние на другие организмы, в том числе и на почвенную микрофлору, в виде ингибирования и токсического действия, в виде селекционирующего действия, в виде агентов, стимулирующих рост и развитие компонентов ризопланы и ризосферы, в виде индукторов морфогенеза у грибов и прокариот [1].

Плодосмен, в современном ресурсосберегающем земледелии предлагает не только строгое чередование зерновых культур, многолетних трав и пропашных культур с различными агрономическими, физиологическими свойствами, но и предусматривает обязательное наличие культур почвоулучшателей, размещение которых по наиболее благоприятным предшественникам способствуют высокой скорости разложения органических остатков, накоплению и использования питательных веществ [2,3].

Исходя из этого, целью проведенных исследований было определения влияния сельскохозяйственных культур по различным предшественникам в плодосменных севооборотах при ресурсосберегающих технологиях возделывания на формирование микробиоценоза почвы южного чернозема и в целом на плодородие почвы. Тренинги и микробиологические анализы проводили в почвенных пробах, отобранных со стационаров с плодосменами и в посевах пшеницы по разным предшественникам. Полученные результаты анализов за период 2009-2011гг, показали, что при сравнении различных плодосменных севооборотов, высокая численность бактерий, ассимилирующих минеральные и органические формы азота, наблюдается в бессменных посевах пшеницы с применением удобрений и гербицидов (табл. 1).

Таблица 1- Распространения почвенных микроорганизмов в посевах пшеницы по различным предшественникам в плодосменных севооборотах, млн./г почвы

Плодосменные севообороты	Бактерии, ассимилирующие различные формы азота		Почвенные микромицеты	Целлюлозоразрушающие микроорганизмы
	органический	минеральный		