

өндегенде жоғары тиімділік бақыланды. Streptomyces sp. 450 биомассасының кобальтті биосорбциялау қабілеті 26%, ал Streptomyces sp.15 - 34 % көтерілді, Ni 17 және 24% бақылаумен салыстырғанда жоғарылады.

Summary

The biosorption of Co and Ni by actinomycetes Streptomyces sp. 450 and Streptomyces sp.15 have been studied. It is shown that pretreatment of biomass with various substances led to various degrees of metal sorption by actinomycetes.

Sorption of cobalt from the solution by biomass killed by heating at 80 °C decreased for Streptomyces sp. 450 to 36%, for Streptomyces sp.15 to 42%. Biosorption of nickel by Streptomyces sp. 450 and Streptomyces sp.15 also decreased and was 37 and 28% respectively. Significant decrease in biosorption of cobalt and nickel was observed for the biomass of both actinomycetes treated with hydrochloric acid. Processing of microbial biomass by sodium dodecyl sulfate (SDS) and by the solution of methanol-chloroform also led to decrease in sorption capacity of actinomycetes. The best effect was observed after processing of the biomass of Streptomyces by ethanol. In this case, cobalt biosorption by biomass of Streptomyces sp. 450 increased up to 26%, Streptomyces sp.15 up to 34%, and Ni up to 17 and 24%, respectively, comparing with control.

УДК:635.21:631.147.002.2 (574.24)

Хасанов В.Т., Киян В.С., Швидченко В.К.

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКИ НАИБОЛЕЕ ПАТОГЕННЫХ ВИРУСОВ КАРТОФЕЛЯ

АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина», г. Астана, Казахстан,
E.mail: vadim_kazgatu@mail.ru

Вирусные заболевания картофеля являются одной из основных причин ухудшения семенных качеств клубней [1, 2].

Для высокочувствительной и серийной диагностики вирусных заболеваний картофеля как в странах СНГ, так и за рубежом до сих пор остается широко востребованным метод иммуноферментного анализа, особенно «метод двойных антител» («сэндвич-метод») [3, 4].

В настоящее время коммерческие иммуноферментные диагностические наборы для тестирования растений выпускают научно-исследовательские учреждения Германии, Украины, Беларуси, Узбекистана, Российской Федерации. В республике Казахстан в Институте молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина (г. Алматы) организовано производство глобулинов и конъюгатов к вирусам PVX, PVY, PVS, PVM [5, 6]. Однако работа по производству готовых к применению тест-систем, не проводится и не поставлена на коммерческую основу.

Существующие сегодня тест-системы, позволяют проводить диагностику растений картофеля строго на отдельные вирусы. При этом, согласно общепринятым методикам тестирования картофеля на наличие вирусной инфекции методом ИФА [2-5], растительные образцы картофеля, сенсibilизированные на лунках планшет, инкубируют в течение ночи (14-15 часов) при температуре +4⁰С. Длительная инкубация антигенов затягивает и без того рутинную работу по проведению ИФА.

Целью наших исследований являлась разработка и создание комплексной диагностической тест-системы экспресс-диагностики вирусных болезней картофеля, характеризующейся упрощенной схемой тестирования и низкой себестоимостью.

Задачи:

- конструирование и создание диагностической тест-системы для комплексной детекции вирусов картофеля с целью упрощения методики тестирования;
- контрольное испытание тест-системы комплексной диагностики растений картофеля в картофелеводческом хозяйстве (Акмолинская область, Целиноградский район);
- отработка оптимальных параметров постановки отдельных этапов иммуноферментного анализа.

Материалы и методы

Исходным материалом для проведения исследований послужили вирусы картофеля PVX, PVS, PVY, PVM, PLRV, PVA (очищенные вирусные препараты из коммерческих наборов) [7]. В проводимых исследованиях использовался «Сэндвич»-вариант иммуноферментного анализа [2, 4, 5]. Иммуноферментные диагностические наборы для определения вирусов картофеля (PVX, PVY, PVM, PLRV, PVS, PVA), были приобретены в Государственном научном учреждении Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (Московская область, п/о Коренево) [7].

Результаты

С целью упрощения и удешевления иммунологической диагностики растений на вирусносительство в нашей работе были предприняты попытки по конструированию комплексной диагностической тест-системы для обнаружения наиболее патогенных вирусов картофеля.

На первом этапе проводили сенсibilизацию полистирольных плат комплексом смешанных полученных ранее нами иммуноглобулинов специфических к X-, S-, M-, Y-, A-, L- вирусам, инкубацию в течение 2-х часов при 37°C и отмывание их избытка. На втором этапе осуществляли нанесение вирусосодержащего раствора или тестируемого образца (антигена) в лунки плат и инкубацию его в течение 10-14 часов при 4°C. После этого проводили удаление не связавшегося антигена промыванием лунок. На заключительном этапе вносили комплексный раствор смешанных конъюгатов специфических к X-, S-, M-, Y-, A-, L- вирусам и инкубировали их в течение 1 часа при 37°C, после чего конъюгаты удаляли промыванием лунок. При внесении субстрата фермента, происходило образование окрашенного продукта при наличии одного или нескольких вирусов в исследуемом образце.

Эксперимент по тестированию растений картофеля на наличие каждого из 6 вирусов, а также комплекса вирусов был заложен в 2-х повторностях и трех вариантах:

1) положительный контроль – антитело-антиген-антитело к определенному вирусу (прототип);

2) опытный вариант - комплексный диагностикум (КД): комплекс глобулинов (антител) X, S, M, Y, L, A + антиген к вирусу(ам) + комплекс конъюгатов (антител, меченных ферментами) X, S, M, Y, L, A;

3) отрицательный контроль - антитело-«антиген» (растительный материал безвирусного растения) - антитело (прототип).

Результаты тестирования с использованием поликлональной сыворотки по каждому вирусу в отдельности и в комплексе по 6 вирусам показали, что испытуемый комплексный диагностикум был способен выявлять вирусы -X,-S,-M,-Y,-L,-A как в отдельности, так и в случае смешанной вирусной инфекции. Согласно полученным данным чувствительность созданного комплексного диагностикума не уступала коммерческому аналогу.

С целью контрольного испытания созданной комплексной диагностической тест-системы использовали образцы, отобранные на производственных посадках картофеля Крестьянского хозяйства «Нива» (таблица 1).

Согласно данным таблицы 1, созданная комплексная диагностическая тест-система в обоих вариантах опыта (прямой и «сэндвич») была способна улавливать большинство изучаемых вирусов картофеля. Однако в ходе эксперимента было установлено, что прямой вариант ИФА дополнительно показывал положительную реакцию в образцах №69, 72, 83 не выявляемыми сэндвич-вариантом и наборами препаратов ИФА коммерческого варианта. Следует отметить, что указанные образцы картофеля, тестируемые на отдельные вирусы: PVM, PVA и PLRV коммерческими диагностикумами имели сравнительно высокую оптическую плотность.

Таблица 1 – Оценка тестирования растений картофеля сорта Латона комплексной диагностической тест-системой (в «сэндвич» и прямом вариантах ИФА) в сравнении коммерческими наборами препаратов ИФА

№ образца картофеля	Реакция ИФА, (+,-)							
	X	S	M	Y	A	L	X,S,M,Y,L,A прямой	X,S,M,Y,L,A «сэндвич»
1	-	-	-*	-	-	-	-	+
21	-	-	-+*	-	-	-	-	+
32	+*	-	-	-	-	+	+	-
38	-	-	+	-	-	-	+	-
43	-	-	-	-	+	+	-	+
48	+	-	-	+	+	+	+	+
54	-	-	-	-	+	+	+	+
69	-	-	-+	-	-	-	+	-
72	-	-	-	-	-+	-+	+	-
83	-	-	-	-	-	-	+	-

*Примечание: «-» - отрицательная реакция, «+» - положительная реакция, «+» - спорный результат.

С целью повышения чувствительности комплексной диагностической тест-системы было проведено изучение концентраций вирусодержащего материала в разведении 1:1,25; 1:2,5; 1:5; 1:10 (0,1 г/мл - контроль); 1:20; 1:40; 1:80; 1:160 (таблица 3).

Таблица 2 – Чувствительность реакции ИФА в зависимости от разведения зараженных вирусами растительных образцов картофеля в пробно-конъюгатном буфере

Концентрация образца, г/мл	Среднее значение оптической плотности ИФА, ед.		
	PVM	PVS	PVY
1:1,25	1,972	1,860	0,277
1:2,5	2,046	1,969	0,476
1:5	2,137	2,213	0,502
1:10(контроль)	2,208	2,589	0,594
1:20	2,346	2,772	0,786
1:40	2,433	2,813	1,104
1:80	1,941	2,663	0,854
1:160	0,554	0,679	0,274

Результаты проведенных исследований показали, что при тестировании растений картофеля на вирусы PVM, PVS, PVY оптимальной концентрацией растительных образцов является 0,0125 г/мл, т.е. разведение растительного образца в пробно-конъюгатном буфере в соотношении 1:40. Дальнейшее разведение образцов приводило к снижению оптической плотности в реакции ИФА.

Согласно общепринятым методикам тестирования картофеля на наличие вирусной инфекции [1, 3, 7, 9] растительные образцы картофеля, сенсibilизированные на лунках планшет инкубируют в течение ночи (14-15 часов) при температуре +4⁰С. Длительная инкубация антигенов затягивает и без того рутинную работу по проведению ИФА. В этой связи на завершающем этапе исследований нами были выполнены работы по оптимизации постановки ИФА в направлении сокращения времени инкубации вирусодержащего материала картофеля (таблица 3).

В ходе проводимых исследований было установлено, что созданный комплексный диагностикум улавливал вирусы во всех вариантах опыта.

Таблица 3 - Оптимизация времени инкубации вирусных антигенов картофеля в «сэндвич» и прямом вариантах ИФА

Вариант опыта	Количество зараженных образцов вирусами, шт.						
	PVX	PVY	PVS	PVM	PLRV	PVA	КД*
«Сэндвич» St, 15ч.+4 ⁰ С	1	3	5	4	3	1	7
«Прямой», 15 ч. +4 ⁰ С	1	2	3	2	2	1	7
«Сэндвич», 2 ч.,+37 ⁰ С	1	3	5	5	4	1	7
«Прямой», 2 ч., +37 ⁰ С	1	2	3	2	2	1	7

*КД - комплексный диагностикум

Согласно приведенным данным таблицы 3, наибольшее количество зараженных образцов было выявлено с применением «сэндвич» варианта ИФА при 2-х часовой инкубации антигенов и температуре +37⁰С. Данный вариант не уступал, а в случае вирусов PVM и PLRV превышал по чувствительности контрольный вариант.

Обсуждение

К общим недостаткам известных технологий тестирования растений следует отнести весьма трудоемкую работу по многочисленному нанесению растительных образцов, рабочих растворов иммуноглобулинов, конъюгатов и субстратного буфера в лунки нескольких полистирольных плат, каждая из которых предназначена для тестирования растений лишь на один вирус, а также большой расход органических материалов (полистирол) и химических реактивов, и, вследствие этого, их дороговизны для проведения анализа. Следовательно, выпускаемые диагностикумы рассчитаны на тестирование растений картофеля строго на отдельные вирусы, что осложняет рутинную работу при диагностике растений картофеля на вирусоносительство. Кроме того, длительная инкубация антигенов затягивает получение результатов ИФА.

В проводимых исследованиях создана комплексная диагностическая тест-система, способная выявлять вирусы -X,-S,-M,-Y,-L,-A как в отдельности, так и в случае смешанной вирусной инфекции. Результаты тестирования образцов картофеля, отобранных на производственных посадках Крестьянского хозяйства «Нива», показали, что наиболее приемлемым для применения созданной тест-системы в диагностической практике является прямой вариант ИФА.

Однако при отработке оптимальных параметров постановки ИФА нами установлено, что инкубация растительных образцов картофеля при температуре +37⁰С в течение 2-х часов вместо 15 часов, +4⁰С по общепринятой методике [2-5], в проводимом эксперименте наиболее предпочтительна в «сэндвич» варианте ИФА.

При изучении концентраций вируссодержащего материала на этапе пробоподготовки, установлено, что максимальная чувствительность реакции ИФА проявлялась при разведении вирусных антигенов в соотношении 1:40. Данное разведение требует меньшего количества растительного образца для анализа по сравнению с рекомендуемым в настоящее время литературе разведением [5].

В целом, созданная диагностическая тест-система упрощает методику тестирования растений картофеля на вирусоносительство снижает трудоемкость иммуноферментного анализа. Её преимуществом является повышение чувствительности иммуноферментного анализа и получение результатов диагностики в течение одного дня. Тест-система может быть успешно использована при получении безвирусного семенного материала картофеля как в первичных звеньях семеноводческого процесса, так и на уровне серийных полевых испытаний при выявлении общей пораженности растений.

Заклучение

В результате проведенных исследований на основе прямого варианта ИФА с помощью полученных иммуноглобулинов и коммерческих конъюгатов сконструирована комплексная диагностическая тест-система, способная улавливать большинство изучаемых вирусов картофеля.

Подобраны оптимальные параметры постановки ИФА. Оптимизировано разведение антигенов вирусов картофеля М, S, Y в пробно-конъюгатном буфере в соотношении 1:40, повышающее чувствительность ИФА. При тестировании образцов картофеля на отдельные вирусы: PVX, PVY, PVS, PVM, PLRV, PVA, а также на их комплекс оптимальными условиями являются: инкубация вирусных антигенов при температуре +37⁰С в течение 2-х часов в «сэндвич» варианте ИФА.

Настоящая публикация выполнена в рамках подпроекта, финансируемого в рамках СКГ, поддерживаемого Всемирным Банком и Правительством Республики Казахстан, а также в рамках проекта Общественного Фонда «Фонд Первого Президента Республики Казахстан».

Литература

- 1 Сельское, лесное и рыбное хозяйство Казахстана // статистический сборник под ред. А. Смаилова - Алматы, 2001. - С. 32-34.
- 2 Швидченко В.К., Созинова Л.Ф. Оздоровление, размножение и диагностика в картофелеводстве. - Астана, 2000. - 163 с.
- 3 Куликова В.И. и др. Диагностика вирусных и бактериальных болезней картофеля в оригинальном семеноводстве: Методические рекомендации / Сиб. отделение РАСХН, ГНУ «Кемеровский НИИСХ», Кемерово: «Кузбассвузиздат», 2004. - 24 с.
- 4 Бобкова А.Ф., Чирков С.Н. Применение иммуноферментного анализа для диагностики вирусных заболеваний растений (обзор) // Сельскохозяйственная биология. - М.: Колос, 1983. - №5. - С. 32-35.
- 5 Инструкция по применению иммуноферментного диагностического набора для определения вирусов картофеля. - Коренево, 2010 - 8 с.
- 6 Манадилова А.М., Садвокасова Г.Г., Бекельман Е., Лобенштейн Г. Диагностика Y-вируса картофеля методом иммуноферментного анализа // Биотехнология. Теория и практика, 1998, №3 (7), С. 50-54.
- 7 Созинова Л.Ф., Манадилова А.М. Вирусная инфекция картофеля и методы диагностики вирусных заболеваний. Обзорная информация. Акмолинский ЦНТИ, Астана, 2003, 37 с.

Түйін

Дайындалған иммуноглобулиндер мен конъюгаттардың негізінде картоптың PVX, PVY, PVS, PVM, PLRV, PVA вирустарын бір мезетте жинақтауға қабілетті диагностикалық тест-жүйесі құрылды. ИФТ-ды қоюдың оңтайлы параметрлері жасалды. 1:40 қатысуда сынақ-конъюгаттарының ерітіндісінде картоптың PVM, PVS, PVY вирус антигендердің көбейту оңтайлы параметрлері жасалды. Зерттеулерде вирусты антигендердің оңтайлы инкубациясы ИФТ «сэндвич» нұсқасында +37⁰С температурада 2 сағат жүргізілді.

Summary

On the basis of the received immune globulin and conjugations an integrated diagnostic test-system was created which is able to detect PVX, PVY, PVS, PVM, PLRV, PVA viruses of potato at the same time. Optimal characteristics of IFA arrangement were developed and chosen. Optimal characteristics of antigens potato viruses PVM, PVS, PVY dissolving in sampling conjugation buffer in correlation 1:40 were established. Optimal incubation of virus antigens during the experiment was at the temperature +37⁰С for 2 hours in “sandwich” IFA version.

УДК 635.21:632.3

Шемшура О.Н., Бекмаханова Н.Е., Мазунина М.Н.
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОМИЦЕТОВ ДЛЯ БОРЬБЫ С
ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИМИ НЕМАТОДАМИ

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы, Казахстан
e-mail: olgashemshura@mail.ru

Сельскохозяйственное производство является основным способом решения производственных проблем во всех странах мира. Важнейшим элементом производства сельскохозяйственной продукции является защита растений от болезней и вредителей, т.к. она позволяет не только увеличить объем урожая, но и улучшить его качество, обычно