



УТВЕРЖДАЮ
Директор Института
микробиологии НАН Беларуси
Э.И.Коломиец
2019 г.

ОТЧЕТ

о результатах микробиологического исследования грунта питательного универсального «Живая земля», предоставленного ООО «БиоБелГрупп» в рамках договора №5137 от 30.09.2019

Объект исследования: грунт питательный универсальный «Живая земля».

Материалы и методы

Для проведения микробиологических исследований было отобрано 5 образцов грунта питательного «Живая земля» массой 1,0 г каждый.

ПЦР-анализ образцов грунта питательного универсального на наличие фитопатогенных грибов проводили с использованием видоспецифичных праймеров к *Alternaria* sp. (Alt-sp1F / Alt-sp1R), *Botrytis cinerea* (BC-bot2-F / BC-bot2-R), *Cladosporium cladosporioides* (CClad4-F / CClad4-R), *Fusarium* sp. (FusF / FusR), *Plectosphaerella cucumerina* (PCuc1F / PCuc1R), *Sclerotinia sclerotiorum* (SSaspr-F / SSaspr-R), *Verticillium dahlia* (VD-lov-F / VD-lov-R). Суммарную ДНК из почвы для ПЦР-анализа выделяли с помощью коммерческого набора «PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit» (Invitrogen) согласно инструкции производителя. В качестве положительных контролей использовали ДНК коллекционных штаммов фитопатогенных грибов *Alternaria* sp. Пл-2, *B. cinerea* БИМ F-383, *C. cladosporioides* БИМ F-593, *F. culmorum* БИМ F-600, *S. sclerotiorum* БИМ F-559, *P. cucumerina* 18, *V. dahliae* БИМ F-449. Отрицательным контролем служил образец, не содержащий грибной ДНК. Реакцию амплификации проводили на термоциклере Bio-Rad T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) в объеме 20 мкл, используя оптимизированный температурно-временной режим. Реакционная смесь содержала: 2× премикс для ПЦР-РВ (Праймтех) – 10 мкл, праймеры (4 пмоль) – по 0,5 мкл каждого, ДНК матрицу – 1 мкл, воду для ПЦР – до 20 мкл. Продукты ПЦР анализировали электрофоретически в 1% агарозном геле с использованием 1× трис-ацетатного буфера при напряженности электрического поля 5 В/см. Для визуализации ДНК гель окрашивали раствором бромистого этидия (0,05 мкг/мл). В качестве стандарта для определения размера продуктов ПЦР применяли маркер молекулярной массы фрагментов ДНК GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). Анализ и расчет размера продуктов ПЦР осуществляли с помощью системы документирования гелей и программного обеспечения Bio-Rad ChemiDoc MP.

Выделение фитопатогенных бактерий и грибов из образцов грунта питательного универсального осуществляли, используя стандартные

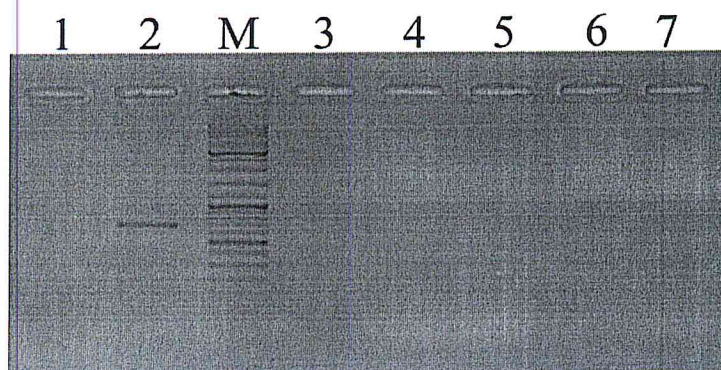
методики микробиологических исследований. Образец грунта в количестве 1,0 г добавляли к 9,0 мл стерильной дистиллированной воды, хорошо перемешивали на вортексе и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин. После этого делали ряд серийных разведений, по 100 мкл из 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} разведений высевали на картофельно-глюкозный агар – полуселективную питательную среду для выделения фитопатогенных микроорганизмов. Посевы инкубировали при 24°C в течение 96 ч (для выделения фитопатогенных грибов) и при 28-30°C в течение 48 ч (для выделения фитопатогенных бактерий). Сформировавшиеся колонии рассеивали до изолированного состояния. Изучение культурально-морфологических признаков выделенных культур микроорганизмов проводили с использованием общепринятых методов.

Все исследования делали в трехкратной повторности.

Результаты

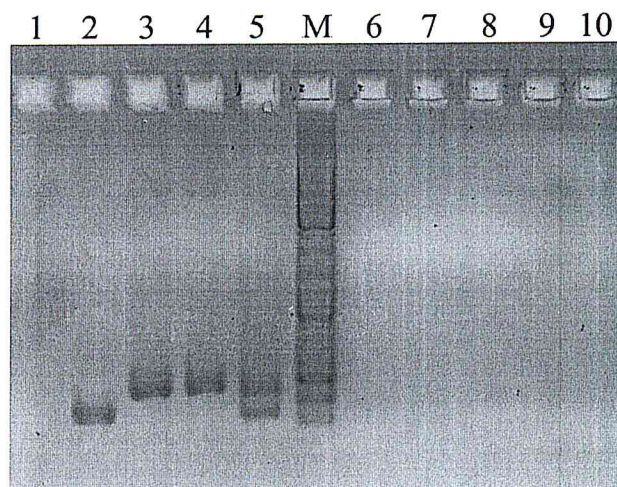
С целью выявления в образцах грунта питательного универсального фитопатогенных грибов *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium* sp., *Plectosphaerella cucumerina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahlia* – широко распространенных возбудителей болезней сельскохозяйственных культур, проводили ПЦР-анализ с праймерами, специфичными к данным видам.

Как видно из электрофореграмм, представленных на рисунках 1-3, ни для одного из исследуемых образцов грунта продукты ПЦР целевого размера (310 п.н. для *Alternaria* sp.; 600 п.н. для *B. cinerea*; 435 п.н. для *C. cladosporioides*; 380 п.н. для *Fusarium* sp.; 450 п.н. для *P. cucumerina*; 488 п.н. для *S. sclerotiorum*; 733 п.н. для *V. dahlia*) получены не были. Это свидетельствует об отсутствии в анализируемом грунте питательном универсальном «Живая земля» фитопатогенных грибов *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium* sp., *Plectosphaerella cucumerina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahlia*.

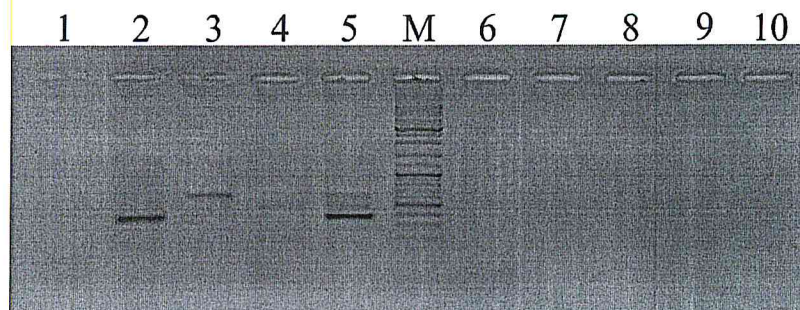


М – маркер молекулярной массы ДНК 100bp DNA Ladder; 1 – отрицательный контроль;
2 – *V. dahlia* СО-3 (положительный контроль); 3 – 7 образцы грунта питательного универсального

Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами VD-lov-F / VD-lov-R, специфичными к *V. dahliae*



М – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler DNA Ladder Mix;
 1 – отрицательный контроль; 2 – *Alternaria* sp. Пл-2 (положительный контроль);
 3 – *P. cucumerina* 18 (положительный контроль); 4 – *C. clasdosporioides* БИМ F-593
 (положительный контроль); 5 – мультиплекс *Alternaria* sp. Пл-2, *P. cucumerina* 18,
C. clasdosporioides БИМ F-593 (положительный контроль); 6 – 10 образцы грунта
 питательного универсального
 Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами Alt-sp1F / Alt-sp1R,
 специфичными к *Alternaria* sp., CClad4-F / CClad4-R, специфичными к *C. clasdosporioides*,
 PCuC1-F / PCuC1-R, специфичными к *P. cucumerina*



М – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler DNA Ladder Mix; 1 – отрицательный
 контроль; 2 – *F. culmorum* БИМ F-600 (положительный контроль); 3 – *B. cinerea* БИМ F-
 383 (положительный контроль); 4 – *S. sclerotiorum* БИМ F-559 (положительный контроль);
 5 – мультиплекс *F. culmorum* БИМ F-600, *B. cinerea* БИМ F-383, *S. sclerotiorum* БИМ F-559
 (положительный контроль), 6 – 10 образцы грунта питательного универсального
 Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами Fus-F / Fus-R,
 специфичными к *Fusarium* sp., Bc-bot2-F / Bc-bot2-R, специфичными к *B. cinerea*,
 SSasp1-F / SSasp1-R, специфичными к *S. sclerotiorum*

В результате высева на картофельно-глюкозный агар выделено более 10 видов бактерий, с различной морфологией клеток и колоний, и 1 вид грибов (рисунок 4). На основании изучения морфолого-культуральных признаков ни один из изолятов не отнесен к фитопатогенным видам бактерий и грибов. Таким образом, результаты культурального исследования подтверждают данные ПЦР-анализа об отсутствии в грунте питательном универсальном «Живая земля» фитопатогенных микроорганизмов.

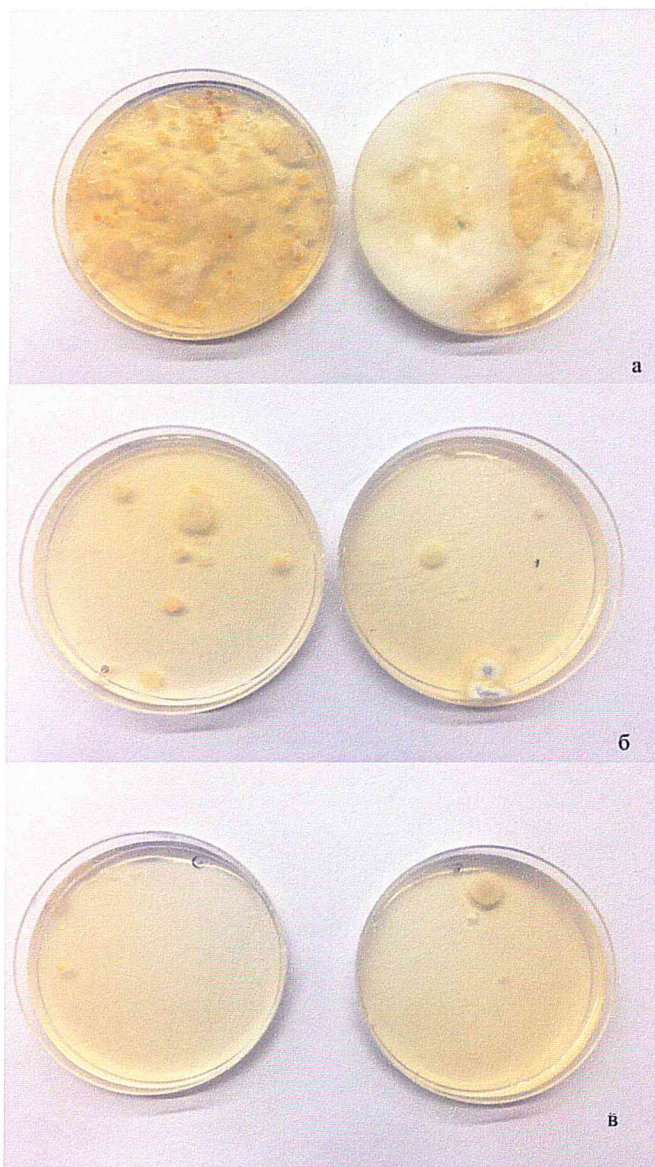


Рисунок 4 – Культуры бактерий и грибов, выделенные из грунта питательного универсального «Живая земля»

Заключение

По результатам ПЦР-анализа с видоспецифичными праймерами к фитопатогенным грибам *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium* sp., *Plectosphaerella cucumerina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahlia* и культурального микробиологического исследования фитопатогенные микроорганизмы в грунте питательном универсальном «Живая земля» не обнаружены.

Научный сотрудник, м.б.н.

А.А. Барейко

Ведущий научный сотрудник, к.б.н.

А.В. Сидоренко

Заведующий лабораторией, к.б.н.

М.Н. Мандрик-Литвинкович