

На правах рукописи



БАТАЕВА
Юлия Викторовна

**ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНЫХ КОМПЛЕКСОВ АРИДНОЙ
ЗОНЫ В УСЛОВИЯХ АГРО- И ТЕХНОГЕНЕЗА И ИХ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**

1.5.11. – Микробиология

1.5.6. – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Астрахань – 2022

Работа выполнена в научной лаборатории биотехнологий и на кафедре биотехнологии, зоологии и аквакультуры Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Астрахань

Научный консультант:

Держинская Ирина Станиславовна, доктор биологических наук, профессор, [1.5.16. - Гидробиология], Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный технический университет» Федерального агентства по рыболовству, г. Астрахань, почетный профессор.

Официальные оппоненты:

Домрачева Людмила Ивановна, доктор биологических наук, [1.5.19. – Почвоведение, 1.5.11. – Микробиология], профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Вятский государственный агротехнологический университет» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, г. Киров, кафедра биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии, профессор кафедры.

Манучарова Наталия Александровна, доктор биологических наук, [1.5.11. – Микробиология], профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва, кафедра биологии почв факультета почвоведения, профессор кафедры.

Садыкова Вера Сергеевна, доктор биологических наук, доцент [1.5.18. - Микология, 1.5.6. - Биотехнология], Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Москва, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Москва.

Защита диссертации состоится « » г. в ч на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека Российской Федерации по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, р.п. Оболенск, г. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека Российской Федерации по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, р.п. Оболенск, г. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ.

Автореферат разослан « » 2022г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 64.1.002.01
кандидат биологических наук



Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Жизнедеятельность на планете обеспечивается и поддерживается комплексом микробных сообществ, принимающих участие в круговоротах веществ, формирующих минеральное и органическое вещество водоемов и почв, трансформирующих любые соединения природного происхождения, сохраняющих метаболическое равновесие в природе, способствующих устойчивому функционированию экосистем, в том числе и в экстремальных условиях. Нижняя Волга (Астраханская область) находится в самой засушливой части России с чертами резкой континентальности в пустынной природноклиматической зоне, где все природные процессы протекают в экстремальных условиях, заключающихся в значительных колебаниях температуры, присутствии высокоминерализованных грунтовых вод, соляных куполов, подпирающих верхние горизонты почвенного покрова, подвижных песках и засухе (Глазер, 1986).

На микробные комплексы, формируемые на данной территории, накладывается нагрузка за счет аридности климата, техногенеза - добычи газа, гипса, соли, и агрогенеза – освоения сельскохозяйственных угодий, что приводит к образованию техногенных и деградированных территорий. Аридный климат, природные ландшафты, техногенно и агрогенно преобразованные территории определяют экологические и физико-химические условия существования организмов, которые характеризуются высокой активностью (Гаель, Штина, 1974; Новичкова-Иванова, 1980; Зенова и др., 2011; Каширская и др., 2015).

Наиболее адаптированными к таким условиям являются цианобактерии и актиномицеты, которые заселяют все известные экологические ниши, в том числе и экстремальные (Заварзин, 1983, 1993, 2003; Герасименко, 1986, 1996, 2003; Андреюк и др., 1990; Жилина, 1991). Их адаптация связана с эволюционными процессами, так как бактериальные комплексы болотных и пустынных экосистем можно рассматривать в качестве ступеней эволюции микробного мира при переходе от водного к наземному образу жизни (Роль почвы., 2011). «Зеленые автотрофные организмы образуют главную основу единого монолита жизни. Они не только дают возможность существования всем другим организмам и человечеству, но они определяют химию земной коры» (Вернадский, 1940). Актиномицеты доминируют в почвах пустынь, характеризуются мицелиальным строением хотя бы на одной из стадий развития, как приспособления к обитанию в твердофазном субстрате, являются устойчивыми к высушиванию и повышенной инсоляции (Роль почвы., 2011).

Изучение функциональной активности цианобактерий и актиномицетов является перспективным направлением для фундаментальных и прикладных исследований при использовании штаммов или их вторичных метаболитов, направленных на развитие органического земледелия, устойчивости природных и техногенных экосистем. Развиваясь на аридных территориях, цианобактерии и актиномицеты продуцируют комплекс метаболитов различного состава с алифатическими, карбоциклическими и гетероциклическими, азотистыми, кислород- и серусодержащими соединениями (Дембицкий и др., 2001; Кирпенко и др., 2010; Гольдин, Гольдина, 2011; Батаева и др., 2014; Широких, 2017; Amaresan, 2018). Цианобактерии с фитостимулирующими, деструкционными свойствами используют как биоудобрения для стимуляции роста растений, повышения урожайности и плодородия почв; как биоагенты для очистки сточных вод и биоремедиации техногенных территорий (Дзержинская, 1993; Батаева, 2005; Домрачева и др., 2019; Kaushik, 2014). Актиномицеты с противомикробными свойствами применяют в виде биоконтролирующих агентов, средств защиты растений от инфекций и насекомых, являющихся основой современных биопрепаратов Фитоверм, Вертимек, Мекар, Биокилл, Оберон Рапид (Долженко, 2009; Castillo et al., 2006; El-Tarabily et al., 2006; Amaresan et al., 2018).

Таким образом, изучение цианобактерий и актиномицетов в экосистемах аридной зоны является крайне востребованным, как с точки зрения получения представлений о структуре, составе и свойствах комплекса микроорганизмов и их метаболитов, что позволяет охарактеризовать их роль и участие в функционировании аридных территорий, так и создания на их основе биоудобрений и биопрепаратов для эффективности и оздоровления агроэкосистем, биоремедиации техногенных экосистем, что имеет важное практическое значение.

Степень разработанности темы. К настоящему времени накоплен материал по изучению микробных комплексов экосистем с аридным климатом (Дембицкий, 2002; Халилова и др., 2017). Изучены свойства микроорганизмов, позволяющих использовать их в качестве биопрепаратов – биоудобрений, средств защиты растений, деструкторов микробиологического происхождения (Батаева, 2005; Панкратова и др., 2008; Долженко, 2009; Домрачева и др., 2020, 2021; Патент №2764304; El-Tarabily et al., 2006; Amaresan et al., 2018). Исследованы гены, кодирующие и регулирующие синтез биологически активных веществ актиномицетов и цианобактерий (Манучарова, 2012; Asano, 2006; Кокшарова, 2008; Grünwald, 2006; Efimenko et al., 2016; Manucharova et al., 2017, 2020, 2021). Однако мало изучены микроорганизмы, с полезными свойствами, синтезирующие биологически активные вторичные метаболиты, развивающиеся в экстремальных аридных зонах. Аридные природно-климатические условия Астраханской области отличаются специфичностью, что объясняет необходимость исследования свойств микроорганизмов, которые можно применять на таких территориях для повышения биоразнообразия, стимуляции роста и защиты растений, деструкции загрязняющих органических веществ.

Целью исследования являлось исследование видового состава и структуры комплексов цианобактерий и актиномицетов водных и наземных экосистем, обоснование их биотехнологической роли в аридной зоне как микроорганизмов с аллелопатическими, противовирусными, фитостимулирующими, фунгицидными, антиоксидантными, деструкционными и другими свойствами, являющихся источниками ценных экзометаболитов, а также разработка технологий получения и применения экспериментальных образцов биопрепаратов на их основе.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ видового и группового состава цианобактериальных сообществ природных и техногенно преобразованных экосистем на территории Астраханского региона;
2. Выделить цианобактерии из техногенных и природных водных и почвенных экосистем региона исследований с фитостимулирующими, фунгицидными, колонизирующими, антиоксидантными, деструкционными свойствами, идентифицировать наиболее активные изоляты и определить их таксономическое положение;
3. Исследовать взаимосвязь физико-химических факторов среды и видового состава цианобактерий в накопительных культурах, выявить особенности организации сообществ в различных экосистемах;
4. Исследовать в динамике состав и трансформацию экзогенных метаболитов водного альго-цианобактериального комплекса;
5. Обосновать роль цианобактерий в стимуляции роста растений, защите от фитопатогенов, биодegradации загрязняющих веществ, и определить состав синтезируемых метаболитов;
6. Выделить из засоленных почв региона исследований актиномицеты, с фитостимулирующей, противовирусной и фунгицидной активностью, определить таксономическое положение, описать морфологические, физиолого-биохимические и молекулярно-генетические особенности наиболее активных изолятов;

7. Выявить и охарактеризовать основной состав биологически активных метаболитов штаммов актиномицетов;

8. Разработать экспериментальные образцы препаратов полифункционального действия – средств защиты растений и биоудобрений на основе отобранных безопасных штаммов актиномицетов и культуры цианобактерий;

9. Установить возможность применения и эффективность использования цианобактерий и актиномицетов для повышения урожайности и защиты растений от фитопатогенов в лабораторных и полевых экспериментах.

Научная новизна. Впервые обобщены многолетние исследования распространения различных видов цианобактерий и состава циано-бактериальных комплексов в разнотипных природных и техногенных водных и почвенных экосистемах Астраханского региона. Показано, что наибольшее разнообразие видов цианобактерий присуще озерным экосистемам Волго-Ахтубинской поймы и аллювиально-луговым почвам. Основой фототрофных комплексов почв является род *Phormidium*, водных экосистем – *Oscillatoria*.

В накопительных культурах на основе разнотипных почв установлено, что представители отдела Cyanobacteria составляют 71 % от общего числа изученных почвенных фототрофов. Анализ всех почвенных образцов позволил выявить 95 видовых и внутривидовых таксонов цианобактерий, относящихся к 2 классам (Chroococcophyceae, Normoniphyceae), 4 порядкам (Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales, Pleurocapsales), 11 семействам, 12 родам. Анализ экологических особенностей показал доминирование Р – жизненной формы.

Наибольшее многообразие и распространение почвенных комплексов актиномицетов встречалось в образцах почв с повышенной степенью засоления (содержанием плотного (сухого) остатка от 0,3% до 2,9%).

Впервые изучены техногенные водоёмы на территории Астраханского газоконденсатного и Баскунчакского гипсового месторождений на присутствие цианобактерий, где идентифицированы представители родов: *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Gloeocapsa*, *Synechococcus*, *Synechocystis*.

В накопительных культурах, из техногенных водоёмов с экстремальными гидрохимическими условиями, впервые получены циано-бактериальные сообщества резистентные по отношению к высокому содержанию неорганических фосфатов (K_2HPO_4) от 0,04 г/л до 10 г/л, и общему содержанию солей от 10 г/л до 400 г/л, при этом под влиянием концентраций фосфора происходит изменение морфологии сообществ. Под влиянием реакции среды, температуры и общего содержания солей структура циано-бактериальных сообществ не изменяется.

Впервые идентифицированы экзогенные метаболиты альго-цианобактериального сообщества, выделенного из природного водоема реки Ахтубы Астраханского региона, включающие насыщенные, ненасыщенные и ароматические углеводороды, карбоновые кислоты, фенольные и терпеновые соединения и их производные. Показано, что с развитием сообщества происходят изменения не только состава и количества водорослей и бактерий, но и вторичных метаболитов, проявляющееся в увеличении концентрации и разнообразия алкановых углеводородов.

Впервые исследован фитостимулирующий, фунгицидный, колонизирующий и антиоксидантный эффекты циано-бактериальных сообществ и культуры *Anabaena constricta* IPPASB-2020, выделенных из почв региона исследований. Определена оптимальная концентрация экспериментального образца биоудобрения для обработки семян и развивающихся растений томата, перца, хлопчатника. Разработан способ повышения урожайности растений и защиты от фитопатогенов на основе цианобактерий. Изучены вторичные метаболиты цианобактерий, представленные терпеноидами,

флавоноидами (пеонидин 3,5-диглюкозид; кверцетин), алкалоидами (резерпин, бупренорфин, йохимбин), пептидом (цикло (L-глутаминил-L-триптофил-L-фенилаланилглицил-L-лейцил-L-метионил), а также органические кислоты: аспарагиновая, муравьиная, пропионовая, фумаровая, изолимонная, молочная, уксусная, пировиноградная.

Впервые при внесении в засоленные экспериментальные сточные воды пищевого производства циано-бактериальных сообществ и культуры *Phormidium ramosum* IPPASB-2022 происходит деградация органических веществ, обеспечиваемая совместным участием цианобактерий и бактерий-спутников. Циано-бактериальные сообщества и их спутники проявляли липолитическую и протеолитическую активности.

Впервые из почвенных экосистем с различной степенью солености выделены штаммы бактерий *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 (редкий вид), *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883, оказывающие ингибирующее действие на вирусы растений YBK, XBK, ВСЛК, ВМТо, ВОМ, ВБТ, а также обладающие высокими фитостимулирующими, фунгицидными и антиоксидантными свойствами, что делает их перспективными продуцентами для создания биопрепаратов. Данные штаммы способны синтезировать соединения, компонентный состав которых определен впервые: флавоноиды, алкалоиды, гликозиды, органические кислоты (изолимонная, уксусная, фумаровая, молочная, яблочная, лимонная, пировиноградная), антибиотики (нарбомицин, тилозин, форомацидин С, эритромицин), фенол – протокатеховый альдегид. В составе вторичных метаболитов штамма *S. carpaticus* RCAM04697 обнаружены спирты, альдегиды, углеводороды, эфиры, сульфаты и другие функциональные группы, представляющие собой полезные соединения для разработки методов защиты агроэкосистем.

С помощью молекулярно-генетических методов идентифицированы две культуры цианобактерий (*Anabaena constricta* IPPASB-2020, *Phormidium ramosum* IPPASB-2022) и три штамма актиномицетов (*S. carpaticus* RCAM04697 (редкий вид), *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883).

Выполнено полногеномное секвенирование штамма *S. carpaticus* RCAM04697. Впервые в базе данных NCBI GenBank задепонирована полногеномная последовательность штамма *S. carpaticus* под номером CP104005.1.

Изучена патогенность (вирулентность, токсичность, токсигенность, диссеминация) штамма *S. carpaticus* RCAM04697 для теплокровных животных.

Технологическая схема получения и инструкция по применению экспериментальных образцов средств защиты растений на основе штаммов *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 и *S. carpaticus* RCAM04697 утверждены на Научно-техническом Совете ФГБОУ ВО «АГУ им. В.Н. Татищева» (Протокол №1 от 25.03.2021г.; уровень внедрения - учрежденческий).

Результаты независимых полевых испытаний экспериментальных образцов биопрепаратов на основе цианобактерий и актиномицетов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 в качестве стимуляторов роста и биологических средств защиты растений на базе филиала ФГБУ «Россельхозцентр» по Астраханской области и ГНУ «ВНИИОБ» оформлены актами производственных испытаний, утвержденными руководителем и сотрудниками указанной организации (уровень внедрения - межучрежденческий).

Новизна подтверждена 3 патентами РФ: «Способ стимуляции роста и развития растений, повышения урожайности и защиты от фитопатогенных грибов в Аридной зоне» (№2634387); «Штамм *Streptomyces carpaticus* для защиты от насекомых-вредителей, грибных, вирусных болезней и стимуляции роста томатов» (№ 2695157); «Альгицид для подавления развития цианобактерий и зеленых водорослей на основе метаболитов –

аллелохемиков водных растений» (№2709308). Получены: патент на полезную модель РФ «Устройство для доочистки сточных вод пищевой промышленности» (№ 189062); свидетельства на базы данных РФ: «Цианобактерии техногенных водоемов Каспийского Бассейна» (№ 2013620692); «Влияние штаммов актиномицетов на вирусные болезни овощебахчевых культур и картофеля в аридной зоне Северного Прикаспия» (№ 2020620186); «Компонентный состав метаболитов бактерий рода *Streptomyces* с полифункциональными свойствами, выделенных из почв Астраханской области» (№ 2022620218) (уровень внедрения – федеральный).

Теоретическая значимость. Полученные данные об уникальных свойствах микроорганизмов расширяют фундаментальные знания о природе взаимоотношений микроорганизмов друг с другом и растениями в природных агро- и техногенных условиях и задают ориентир исследований на значительно более широкий круг объектов.

В работе использован комплексный подход к описанию микробных сообществ, сочетающий традиционные и современные методики. Полученные данные позволили выявить общие популяции цианобактерий, характерные для определенных почв и водоемов, а также обнаружить особенности распространения доминирующих и минорных популяций в зависимости от типа почв и техногенных и природных водоемов.

Полученная в ходе секвенирования полногеномная последовательность штамма *S. carpaticus* RCAM04697 может быть использована для аннотации геномов бактерий рода *Streptomyces*.

Представленные в работе данные являются теоретической основой для дальнейших исследований в направлении расширения границ полифункциональности биопрепаратов, применения антимикробных метаболитов, синтезируемых цианобактериями и актиномицетами, для агро и эковиотехнологий. Результаты работы имеют важное значение для фундаментальных исследований в различных областях науки: экология, микробиология, генетика, биотехнология. Материалы диссертации внедрены в научную деятельность и в учебный процесс при преподавании дисциплин: Экология микроорганизмов, Сельскохозяйственная биотехнология, Промышленные микроорганизмы, Экологическая микробиология, Микробиология почв, Водная микробиология, Биология почв, Экологическая биотехнология по направлению «Биология» в ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева» (Справка о внедрении результатов диссертации в учебный процесс от 08.09.2022 г.; уровень внедрения - учрежденческий).

Практическая значимость. Настоящее исследование имеет выраженное прикладное значение и направлено на решение таких важных биологических и сельскохозяйственных задач, как экологизация сельского хозяйства и применение экологически безопасных и эффективных микробиологических удобрений, и средств защиты растений; разработка биодеструкторов органических соединений для очистки сточных вод; разработка препаратов для биоремедиации техногенных территорий. Исследование важно в научных целях при изучении и мониторинге микроорганизмов аридных зон; при создании баз данных по цианобактериям и актиномицетам; изучении и использовании микроорганизмов, как источников ценных в практическом отношении биологически активных соединений. На основе выделенных в ходе работы штаммов актиномицетов разработаны схема получения и инструкция по применению экспериментальных образцов, которая апробирована в полевых условиях аридной зоны на томате и картофеле (Протокол №1 от 25.03.2021г.; уровень внедрения - учрежденческий); внедрена технология получения экспериментальных образцов препаратов (акт внедрения ООО «ФБГ»); внедрена технология применения экспериментальных образцов препаратов на томатах и картофеле (акт внедрения от 08.09.2022 ФГБУ «Россельхозцентр» по Астрах. обл.). Разработан способ стимуляции роста и развития растений, повышения урожайности

и защиты от фитопатогенных грибов в аридной зоне с помощью цианобактерий (патент РФ №2634387).

Выделенные штаммы микроорганизмов помещены в коллекцию культур цианобактерий и актиномицетов кафедры биотехнологии, зоологии и аквакультуры, научной лаборатории биотехнологий ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева» и используются в научно-исследовательских и учебных целях.

Культуры цианобактерий *Anabaena constricta* и *Phormidium ramosum* В.-Peters депонированы в коллекции культур микроводорослей (IPPAS) ФГБУН Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН под номерами IPPASB-2020 и IPPASB-2022, соответственно. Последовательность 16S рРНК штамма цианобактерий IPPAS B-2020 депонирована в базе данных GenBank NCBI под номером ID ОК041021, штамма цианобактерий IPPAS B-2022 – под номером ID ОК041022. Штаммы актиномицетов депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», г. Пушкин): *S. carpaticus* (справка №469/12 от 15.12.2017), *N. umidischolae* (справка №263/05 от 28.05.2018г.), *N. umidischolae* (справка №264/05 от 28.05.2018г.) (уровень внедрения – федеральный). Штамм *S. carpaticus* депонирован в государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии») под номером SCPM-O-B-9993, полногеномная последовательность - в NCBI GenBank под номером CP104005.1.

Методология и методы исследований. Методология исследований выстроена исходя из цели и задач диссертационной работы. Предметом изучения являлись природные штаммы бактерий и их свойства, необходимые для обоснования их роли в аридной зоне и применения в сельскохозяйственной и экологической биотехнологии; возможность использования исследованных микроорганизмов для повышения урожайности и защиты растений от болезней, очистки сточных вод; технологии получения и применения экспериментальных образцов на основе этих микроорганизмов. В работе использованы микробиологические, молекулярно-генетические, биотехнологические, физико-химические, биохимические, токсикологические, биологические и статистические методы исследования, а также методы биотестирования.

Объектами исследований служили цианобактерии, выделенные из исследуемых водных, почвенных, ризосферных экосистем; актиномицеты, выделенные из засоленных почв; 146 лабораторных циано-бактериальных сообществ и альгологически чистые культуры цианобактерий (*Anabaena constricta* IPPASB-2020; *Phormidium ramosum* В.-Peters IPPASB-2022) и их ассоцианты и водные и водно-спиртовые экстракты; 21 изолят и штаммы актиномицетов (*S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883) и экстракты их суспензий: водно-спиртовой в трех модификациях: 80:20; 50:50; 20:80, метанольный и гексановый; сельскохозяйственные растения – представители семейства мальвовые Malvaceae (хлопчатник сорта AC1), злаковые Gramíneae (пырей безкорневищный сорта Озерненский), капустные Brassicácae (кресс-салат сорта Дукаг; редис сорта Хелро), Пасленовые Solanaseae (картофель сорта Ред Скарлетт; томаты - Новый принц, томаты – Новичок, томаты - Дар Заволжья, томаты - Ажур F1; перец сорта Калифорнийское чудо), изоляты грибов родов *Fusarium*, *Phythium*, *Alternaria*; изоляты бактерий *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* из коллекции научной лаборатории биотехнологий ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева».

Микробиологические методы. В водоемах цианобактерии исследовали в составе фитопланктона (Садчиков, 2003). Для изучения водных и почвенных цианобактерий и образуемых ими сообществ также применяли метод накопительных культур (Гайсина и др., 2008). В качестве питательных сред использовали BG_N-11, BG-11, Громова 6 (Дзержинская, 2008). Для выявления актиномицетов использовали питательные среды: Гаузе №2, крахмально-казеиновую среду, агар крахмально-аммиачный, агар глицерин-аргининовый, агар глицерин-нитратный (Теппер и др., 1993; Нетрусов и др., 2005).

Идентификацию цианобактерий в составе фитопланктона и в накопительных культурах, проводили, используя определитель Голлербаха и др., (1953), Топачевского, Масюка (1984), Берджи (1997), Bergey's Manual..., (2001). Фотографии цианобактерий и актиномицетов получали с помощью микроскопа Amplival (Zeiss) и люминесцентного микроскопа ЕС ЛЮМАМ – РПО11 с фотонасадками.

Молекулярно-генетические методы. Для молекулярно-генетической идентификации цианобактерий использовали последовательность гена 16S рРНК. ДНК выделяли фенол-хлороформным методом. Амплификацию фрагментов гена 16S рРНК проводили, используя специфические цианобактериальные праймеры CYA106F, CYA781R (Nübel et al., 1997). Для идентификации выделенных активных изолятов актиномицетов выделяли геномную ДНК, используя набор реактивов AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit («Corning», USA). Для амплификации участка гена 16S рРНК (около 1500 пн) применяли праймеры fD1 и rD1 (Weisburg et al., 1991). Определение нуклеотидной последовательности ПЦР-продукта проводили на генетическом анализаторе ABI 3500xl («Applied Biosystems», США). Поиск гомологичных последовательностей проводили с помощью базы данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для конструирования филогенетических деревьев использовали программу MEGA 6.0 и метод Neighbor-Joining (Tamura et al., 2011).

Полногеномное секвенирование штамма *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 выполняли на базе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» на платформе Illumina MiSeq, с использованием наборов Nextera DNA Library Preparation Kit и MiSeq Reagent Kits v3. Мономолекулярное нанопоровое секвенирование ДНК осуществляли на платформе MinION. Гибридную сборку генома без предварительного треммирования прочтений осуществили с помощью программы Unicycler v0.4.7.

Для идентификации вирусной инфекции проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием микрочипового амплификатора нуклеиновых кислот «АриаДНА» (Инструкция..., 2015).

Биотехнологические методы. Водно-спиртовые и метанольные экстракты готовили из высушенной биомассы циано-бактериальных сообществ, культур цианобактерий *Anabaena constricta* (Szaf.) Geitl.IPPASB-2020, *Phormidium ramosum* B.-Peters. IPPASB-2022 и штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 (Grigoryan et al., 2020). Сухую биомассу микроорганизмов смешивали в разных соотношениях дистиллированной воды и этанола (Бойкова и др., 2007). Цианобактериальные экстракты после фильтрации использовали в опытах. Водный экстракт цианобактерий получали путем смешивания сухой биомассы с водой. Суспензию клеток штаммов актиномицетов с метанолом или водно-спиртовым раствором центрифугировали, удаляли осадок, высушивали в ротационном испарителе (IKA RV 10 digital), досушивали в сушильном шкафу (ШС-80-01 СПУ) и получали сухой экстракт.

Для приготовления гексановых экстрактов 250 мл суспензии (накопительная культура цианобактерий и суспензия с титром клеток 10⁹ КОЕ/мл штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883) экстрагировали 5

мл гексана в течение 3 минут в делительной воронке.

Физико-химические методы. Отбор образцов для химического анализа воды и почвы проводили в соответствии с требованиями общепринятых методик и Госстандарта (Унифицированные методы исследования качества вод, 1973; ГОСТ 17.4.4.02-2017). Физические и химические показатели сточной воды определяли классическими методами (Шаов и др., 2003; Шалбуев, 2006).

Изучение компонентного состава метаболитов исследуемых культур микроорганизмов проводили методами определения оптической плотности, качественных реакций, методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газовой хроматографии и масс-спектрометрии ((ГХ/МС) (Кирхнер, 1981). Определение органических кислот в водно-спиртовых экстрактах микроорганизмов проводили методом ВЭЖХ в НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика с использованием анионообменных колонок и супрессионной системы с кондуктометрическим детектированием на жидкостном хроматографе Waters – Alliance 2695. Низкомолекулярные органические соединения (НОС) в составе экзогенных метаболитов цианобактерий и штамма *S. carpaticus* RCAM04697 исследовали на газовом хромато-масс-спектрометре SHIMADZU GCMS-QP2010 Ultra в лаборатории гидробиологии ФГБУН Института озероведения РАН.

Биохимические методы. Для определения антиоксидантной активности использовали реакцию со стабильным свободным радикалом ДФПГ (Molyneux, 2004). Диагностику вирусов проводили методом иммунохроматографического анализа (ИХА) с помощью иммунострипов ImmunoStrip Test Kit Flashkits (США) (Гиббс и др., 1978). Фунгицидную активность цианобактерий исследовали на грибах родов *Fusarium*, *Phythium*, *Alternaria* методом диффузии в агар (Нетрусов и др., 2005).

Токсикологические методы. Фитотоксичность цианобактерий и актиномицетов определяли в лабораторных опытах на семенах растений (ГОСТ 12038-84). Безвредность штаммов проверяли в экспериментах *in vivo* на дафниях (*Daphnia magna* Straus) (Селивановская и др., 2011). Патогенность (вирулентность, токсичность, токсигенность, диссеминация) штамма *S. carpaticus* RCAM04697 для теплокровных животных выполняли в НИЦ ТБП – филиале ФГБУ «ГНЦ Института иммунологии» ФМБА России.

Биологические методы. Для идентификации вирусной инфекции использовали тестирующий набор растений-индикаторов (Проценко, 1966). Полевые опыты проводили на культурах хлопчатника (*Gossypium*), перца (*Сápsicum ánnuum*), томата (*Solanum lycopersicum*) и картофеля (*Solanum tuberosum*) на территории ФГБНУ «ВНИИОБ», филиала ФГБУ «Российский сельскохозяйственный центр» по Астраханской области и опытного участка технопарка ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университетим. В.Н. Татищева».

Статистические методы. Результаты экспериментов обрабатывали общепринятыми методами математической статистики, выражали в виде графиков и таблиц с помощью программы Microsoft Excel, BioStat.

Положения, выносимые на защиту.

1. Основой функционирования в экстремальных природных и техногенных экосистемах аридной зоны, отягощенных в Астраханской области высокой засоленностью почвы со средним содержанием плотного (сухого) остатка от 0,3% до 2,9%, является жизнедеятельность микробных комплексов, среди которых наибольшая численность принадлежит цианобактериям, доля которых в почвах составляет 71% от общего числа изученных водорослей, и актиномицетов, с численностью $2,2 \cdot 10^7$ КОЕ/г почвы, которая на порядок превышает численность других микроорганизмов.

2. Цианобактерии являются структурообразователями за счет нитчатых форм и способствуют развитию природных и техногенных экосистем. По сравнению с

природными экстремальными обитаниями, в техногенных водоемах не выявлено четко стратифицированных матов, цианобактерии в них образуют хлопья, пленки и обрастания. Род *Oscillatoria* развивается в самом широком диапазоне гидрохимических факторов с концентрацией сероводорода от 0,0003 г/л до 0,04 г/л, высокой минерализацией от 2,0 г/л до 383,7 г/л, рН от 5,5 до 9,0. Наиболее устойчивыми к изменяющимся факторам среды (рН, температура, соленость, фосфаты) являются также представители рода *Phormidium*, особенно культура *Phormidium ramosum* В.-Peters. IPPASB-2022.

3. Цианобактерии и их сообщества синтезируют комплекс соединений, среди которых обнаружены терпеноиды, флавоноиды, алкалоиды, органические кислоты и другие. С развитием водного альго-цианобактериального комплекса на основе рода *Gloeocapsa* происходят изменения не только состава и количества водорослей и бактерий, но и вторичных метаболитов, проявляющиеся в разнообразии компонентного состава, увеличении доли терпенов, насыщенных углеводов, спиртов, жирных кислот, альдегидов, кетонов, например, бензойной кислоты, фталатов, камфоры, маноола и других. Штаммы *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 синтезируют: флавоноиды, алкалоиды, гликозиды, производные пиридина, аминокислоты, антибиотики, альдегиды, органические кислоты. Распределение по группам НОС суспензии и экстрактов штамма *S. carpaticus* RCAM04697 показало присутствие эфиров, спиртов, углеводов, альдегидов, сульфатов.

4. В экосистемах аридной зоны исследованные почвенные циано-бактериальные сообщества на основе цианобактерий родов *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Nostoc* и культура цианобактерий *Anabaena constricta* (Szaf.) Geitl. IPPASB-2020 обладают фитостимулирующими, колонизирующими, фунгицидными, антиоксидантными свойствами. Выделенные штаммы актиномицетов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 обладают фитостимулирующими, антиоксидантными свойствами и способны к подавлению широкого спектра вирусных (ВОМ, ВМТо, ВБТ, УВК, ХВК, ВСЛК) и грибных (относящихся к родам *Fusarium*, *Alternaria*, *Pythium*) возбудителей болезней растений.

5. Разработанная технология получения экспериментальных образцов на основе штаммов актиномицетов дает возможность получать жидкую форму биопрепаратов, на основе цианобактерий – сухую. Технологии применения экспериментальных образцов на основе цианобактерий и актиномицетов позволяют повышать урожайность и защищать от грибных, вирусных болезней и оздоравливать агроэкосистемы в условиях аридного климата.

Степень достоверности. О достоверности результатов работы свидетельствует как достаточный объем проведенных исследований по идентификации и изучению свойств выделенных микроорганизмов, так и то, что для этого были использованы современные молекулярно-генетические, микробиологические, биотехнологические, биохимические, физико-химические, токсикологические методы, а также применена статистическая обработка данных. Разработанные экспериментальные образцы успешно прошли лабораторные и полевые испытания. Диссертационная работа выполнялась в рамках темы АГУ им. В. Н. Татищева (Минобрнауки РФ) «Биологические методы защиты экосистем» стратегического проекта №4 Природоохранные технологии в Каспийском макрорегионе» №122080500038-9, а также других проектов Минобрнауки РФ № 4.2222.2011; РФФИ № 11-04-90765-моб_ст, №13-04-90744, Фонда содействия инновациям №9832p/14266, № 121032300355-9, № 0047042.

Апробация работы. Основные результаты исследований представлены на научной конференции «Водные экосистемы и организмы-3» (Москва, 2001); международной конференции «Новые технологии в защите биоразнообразия в водных экосистемах» (Москва, 2002); второй международной конференции «Биотехнология – охране

окружающей среды» (Москва, 2004); международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы реабилитации техногенных экосистем» (Астрахань, 2005); всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2009, 2014); всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах» (Киров, 2010, 2015, 2020); V международной конференции молодых ученых «Биология: от молекулы до биосферы» (Харьков, Украина, 2010); всероссийском симпозиуме с международным участием «Автотрофные микроорганизмы» (Москва, 2005, 2010, 2015); VI всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2012, 2016); V съезде микробиологов Узбекистана (Ташкент, Узбекистан, 2012); VI, VII и VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011, 2013, 2015); III International Scientific Conference on Innovation Problems of Modern Biology for Young Scientists (Баку, 2013); III и IV Международной научной конференции «Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге» (Ярославль, 2014; Санкт-Петербург, 2018); II Международной научной школы – конференции Цианопрокариоты / цианобактерии: систематика, экология, распространение (Апатиты, 2016; Уфа, 2022); XXII Московском международном салоне инноваций и инновационных технологий «Архимед» (Санкт-Петербург, 2018); Каспий XXI века - пути устойчивого развития: международный форум (Астрахань, 2021, 2022).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 172 научные работы, из них 22 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 8 - статей в журналах, рецензируемых в Scopus и WoS, 94 - тезиса, 3 – патента на изобретение, 1 – патент на полезную модель, 5 – свидетельств о государственной регистрации базы данных, 1 - свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ, 12 учебно-методических работ, в том числе учебное пособие с грифом УМО по классическому университетскому образованию.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 12 глав, заключения, выводов, списка литературы и 23 приложений. Работа изложена на 556 страницах текста, основной текст диссертации содержит 91 таблицу и 95 рисунков. Список литературы включает 776 источников из них 321 на иностранных языках.

Личный вклад автора. Тема, цель, задачи, объекты, методы и план исследования определены автором. Автор принимал непосредственное участие на всех этапах выполнения диссертационной работы: сбор полевых материалов, микробиологический, молекулярный, химический, биотехнологический анализы с использованием методов накопительных культур, посевов, микроскопии, идентификации, изучения биологической активности, определения химического состава, обработка и обобщение полученных данных, написание и оформление диссертационной работы.

Благодарности: Автор выражает глубокую благодарность и признательность научному консультанту и своему учителю д.б.н., профессору И.С. Держинской за помощь в определении направления жизненного научного и профессионального пути и в осмыслении результатов моей работы. Автор выражает особую благодарность д.б.н. А.И. Нетрусову, д.б.н. Л.М. Герасименко, к.б.н. В.К. Орлеанскому, д.б.н. Е.И. Кондратенко. С большим теплом и сердечностью автор искренне признательна за дружбу, всестороннюю поддержку в научных исследованиях д.б.н. профессору Е.А. Курашову и к.г.н. доценту Ю.В. Крыловой. Автор благодарит д.б.н. Л.В. Яковлеву за помощь в химическом анализе почвенных образцов, д.с-х.н. В.А. Шляхова и д.б.н. Пучкова М.Ю. за предоставление площадок для проведения полевых экспериментов, М.А. Синетову за помощь в идентификации цианобактерий, С.В. Антонову за помощь в проведении анализов ВЭЖХ и ВЭТСХ, А.Г. Богуна и А.А. Кисличкину за проведение полногеномного анализа, А.Г.

Федоренко за помощь в проведении ультраструктурного анализа клеток. Автор благодарит всех, кто прямо или косвенно участвовал и помогал в создании и работе над этим научным исследованием на всех этапах: соавторам и коллегам, а также сотрудникам, студентам биологического факультета, кафедры биотехнологии, зоологии и аквакультуры и научной лаборатории биотехнологий «АГУ им. В.Н. Татищева».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ (Глава 1)

В первой главе приведен обзор литературных данных по изучению комплексов микроорганизмов аридной зоны. Обсуждаются вопросы, касающиеся информации об особенностях природных и техногенно преобразованных территорий. Основное внимание уделено роли цианобактерий и актиномицетов в водных и почвенных экосистемах, положительном и антагонистическом влиянии на растения и микроорганизмы за счет продуцирования вторичных метаболитов. Проанализированы результаты исследований, связанных с биотехнологическим использованием цианобактерий и актиномицетов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ (Глава 2)

В разделе подробно описываются методы выделения, идентификации и изучения свойств и метаболитов микроорганизмов, методика проведения лабораторных и полевых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3 посвящена изучению экстремальных факторов среды, формирующих условия для развития микроорганизмов со специфичными свойствами.

Аридность и агро- и техногенез как факторы образования адаптированных к экстремальным условиям сообществ микроорганизмов на водных и почвенных территориях

Исследованные техногенные водоёмы (на территории Астраханского газоконденсатного месторождения (АГКМ): окситенк, ЕСР, ЗПО, озера Северное и Южное; на территории АЦКК: пруд-отстойник со сточными водами; на территории гипсового месторождения: озеро Мраморное), можно считать экстремальными местообитаниями, которые имеют важное значение для пустынной территории, так как они частично компенсируют недостаток влаги, которая необходима для жизни микроорганизмов в условиях сухости аридного климата. Общим для всех водоёмов является присутствие сероводорода, что свидетельствует о токсичности среды. Максимальное содержание сероводорода обнаружено в окситенке до 3,000 г/л, минимальное – в озере Южное 0,0009 г/л. Во всех водоемах обнаружены цианобактерии.

Почвы региона исследований представляют собой экстремальные экосистемы с высокой концентрацией солей и низкой влажностью с повышенной степенью засоления (величина сухого остатка водной вытяжки от 0,3% до 2,9%). В микробном комплексе почв одними из наиболее адаптированных и распространенных почвенных микроорганизмов являются цианобактерии и актиномицеты (Норовсурэн и др., 2007; Зенова и др., 2009; Батаева и др., 2017; Григорян и др., 2018). Кроме того, в гликокаликсе цианобактерий развивается гетеротрофная микрофлора, включающая актиномицеты, в том числе и стрептомицеты (Омарова, 2007; Зенова и др., 2009).

Глава 4 посвящена результатам изучения комплекса цианобактерий и актиномицетов техногенных и природных территорий.

Видовой состав цианобактерий природных водоемов аридной зоны

В природных водоемах северной части Волго-Ахтубинской поймы обнаружили доминирование нитчатых цианобактерий рода *Oscillatoria* и колониальных форм рода *Microcystis* (таблица 1). Проточный гидрологический режим реки Волга влияет на состав фитопланктона, в котором доминировали не только вышеуказанные формы, но и гетероцистные представители рода *Anabaenopsis arnoldii* Apt.

Таблица 1 - Видовой состав цианобактерий природных водоемов и накопительных культур

Водоемы	Доминирующие виды цианобактерий в воде водоема	Эдификаторы сообществ накопительных культур
р. Волга	<i>Anabaenopsis arnoldii</i> Apt., <i>Microcystis pulverea</i> (Wood) Elenk., <i>Oscillatoria</i> sp., <i>Oscillatoria subtilissima</i> Kutzing, <i>Microcystis ichtioblaube</i> , <i>Gloeocapsa</i> sp.	<i>Oscillatoria</i> sp., <i>Microcystis pulverea</i> (Wood) Elenk., <i>Gloeocapsa</i> sp.
оз. Гнилое	<i>Microcystis pulverea</i> (Wood) Elenk., <i>Gloeocapsa</i> sp., <i>Merismopedia tenuissima</i> Lemmermann, <i>Phormidium</i> sp., <i>Spirulina</i> sp.	<i>Phormidium</i> sp., <i>Gloeocapsa</i> sp., <i>Microcystis pulverea</i> (Wood) Elenk., <i>Spirulina</i> sp.
оз. Лапоть	<i>Oscillatoria</i> sp., <i>Phormidium</i> sp.	<i>Phormidium</i> sp., <i>Oscillatoria</i> sp.
ер. Сазаний	<i>Oscillatoria</i> sp., <i>Microcystis pulverea</i> (Wood) Elenk., <i>Oscillatoria subtilissima</i> Kutzing, <i>Oscillatoria agardhii</i> Gomont, <i>Gloeocapsa</i> sp.	<i>Oscillatoria tenuis</i> Ag., <i>Oscillatoria subtilissima</i> Kutzing, <i>Oscillatoria</i> sp., <i>Phormidium</i> sp., <i>Microcystis</i> sp.
ер. Рачий	<i>Microcystis pulverea</i> (Wood) Elenk., <i>Gloeocapsa</i> sp., <i>Oscillatoria</i> sp., <i>Phormidium</i> sp.	<i>Oscillatoria</i> sp., <i>Gloeocapsa</i> sp.

Во всех накопительных культурах доминировали цианобактерии в присутствии зеленых и диатомовых водорослей. Наиболее встречаемыми в накопительных культурах явились нитчатые цианобактерии родов *Oscillatoria* и *Phormidium*.

Исследования показали, что цианобактерии в накопительных культурах в замкнутых системах на основе воды естественных водоемов наращивали биомассу в виде хлопьев, плёнок, налётов, и в течение длительного времени - матов.

Видовой состав цианобактерий техногенных водоемов аридной зоны

Микробиологические исследования показали присутствие в исследуемых водоемах родов цианобактерий: *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Spirulina*, *Gloeocapsa* (таблица 2). Анализ видового состава цианобактерий исследуемых водоёмов показал, что род *Oscillatoria* развивается в самом широком диапазоне гидрохимических факторов при концентрации сероводорода от 0,0003 г/л до 0,04 г/л, минерализации от 2,0 г/л до 383,7 г/л, рН от 5,5 до 9,0.

Таблица 2 - Видовой состав цианобактерий техногенных водоёмов и накопительных культур

Водоемы	Доминирующие виды цианобактерий в воде водоема	Эдификаторы сообществ накопительных культур
Озеро Мраморное	<i>Phormidium solitare</i> (Kutz.), <i>Oscillatoria</i> sp.	<i>Phormidium Henningsii</i> Lemm., <i>Spirulina subtilissima</i> Kutz.
Озеро Северное	<i>Oscillatoria ornate</i> (Kutz.) Gom., <i>Spirulina Jenneri</i> (Hass.) Kutz., <i>Phormidium</i> sp.	<i>Phormidium valderiae</i> (Delp.) Geitl., <i>Oscillatoria ornate</i> (Kutz.) Gom., <i>Phormidium tenuissimum</i> Woronich., <i>Synechocystis</i> sp.
Озеро Южное	<i>Oscillatoria ornate</i> (Kutz.) Gom., <i>Phormidium tenue</i> (Menegh.) Gom.	<i>Phormidium valderiae</i> (Delp.) Geitl., <i>Phormidium tenue</i> (Menegh.) Gom., <i>Phormidium tenuissimum</i> Woronich., <i>Oscillatoria ornate</i> (Kutz.) Gom.
ЕСР	<i>Oscillatoria chlorina</i> (Kutz.) Gom., <i>Oscillatoria tenuis</i> Ag., <i>Gloeocapsa magma</i> (Breb.) Kutz. emend. Hollerb.	<i>Phormidium tenuissimum</i> Woronich., <i>Synechocystis salina</i> Wisl.
ЗПО	<i>Oscillatoria tenuis</i> Ag., <i>Phormidium tenuissimum</i> Woronich.	<i>Phormidium valderiae</i> (Delp.) Geitl., <i>Phormidium tenue</i> (Menegh.) Gom., <i>Phormidium tenuissimum</i> Woronich., <i>Synechococcus</i> sp.
Окситенк очистных сооружений АГКМ	-	<i>Phormidium tenuissimum</i> Woronich., <i>Synechocystis minuscula</i> Woronich., <i>Synechococcus elongates</i> Nag.
Первый пруд-отстойник очистных сооружений АЦКК	-	<i>Phormidium tenuissimum</i> Woronich., <i>Synechocystis salina</i> Wisl.

«-» - не определяли

Исследования циано-бактериальных сообществ в накопительных культурах показало, что сообщества на основе воды озер Северное, Южное, ЗПО, ЕСП, окситенка АГКМ и полей испарения АЦКК образуют структуры в виде матов, тогда как в водоёмах и очистных сооружениях маты наблюдаются только в окситенке. В накопительной культуре на основе воды из озера Мраморное образовались циано-бактериальные сообщества в виде плёнок и хлопьев. В результате микробиологического исследования матов, выяснилось, что формообразующим компонентом изучаемых сообществ являются образующие гликокаликс цианобактерии, которые представлены нитчатыми формами в виде переплетённых трихом, погружённых в слизь, в которую заключены и одноклеточные цианобактерии и другие бактерии.

Выявлено, что во всех накопительных культурах доминирующими являются цианобактерии рода *Phormidium*, которые обладают особой физиологической пластичностью и быстрым откликом на изменение физико-химических параметров среды. В более узком спектре гидрохимических показателей в накопительных культурах развиваются одноклеточные цианобактерии: *Synechocystis sp.*, *Synechococcus sp.*

Физиологические группы микроорганизмов-ассоциантов в составе техногенных циано-бактериальных сообществ

Количественный учет выделенных физиологических групп микроорганизмов - ассоциантов цианобактерий показал превалирование численности бесцветных серобактерий с титром $1,3 \times 10^8$ кл/г во всех циано-бактериальных сообществах по сравнению с другими группами, что связано с присутствием в среде сероводорода абиогенного и биогенного происхождения. При исследовании физиологических групп микроорганизмов, трансформирующих соединения азота, обнаружили максимальное количество нитрифицирующих бактерий $1,3 \times 10^8$ кл/г во всех исследуемых циано-бактериальных сообществах. Это связано с достаточно высоким количеством аммонийного азота в водоемах (0,003 -0,009 г/л), а также развитием большого количества аммонифицирующих бактерий от $3,0 \times 10^4$ кл/г до $1,3 \times 10^8$ кл/г.

Основным свойством циано-бактериальных матов является слоистая структура и вертикальное распределение функциональных групп микроорганизмов по слоям (Stols, 1983; Stal et al, 1985; Бактериальная палеонтология, 2001; Заварзин, 2003), что подтверждается нашими исследованиями. В выделенных матах визуально и микроскопически выявили слоистую структуру. В оксигенной зоне всех исследуемых сообществ, кроме цианобактерий, обнаружили азотфиксирующие и нитрифицирующие бактерии; во втором слое сапротрофы, бесцветные и анаэробные фототрофные бактерии, в частности пурпурные; в анаэробной зоне присутствовали сульфатредуцирующие бактерии. Выделенные группы бактерий-ассоциантов создают благоприятные условия для трофических взаимодействий, что способствует жизнедеятельности циано-бактериальных сообществ в техногенных водоемах.

Видовой состав фототрофов в почвенных экосистемах

В полупустынях цианобактерии, как правило, являются основными компонентами почвенных фототрофов и микробиоценозов (Moghtaderietal, 2009). Они предотвращают ветровую эрозию, склеивая частички почвы и уменьшая скорость испарения с ее поверхности воды.

В результате проведенных исследований установили, что представители отдела Cyanobacteria составляют 71,3 % от общего числа изученных почвенных водорослей. Анализ всех почвенных образцов позволил выявить 64 вида цианобактерий, относящихся к 3 классам (Chroococceae, Chamaeciphoneae, Hormogoneae), 4 порядкам (Chroococcales, Pleurocapsales, Nostocales, Oscillatoriales,), 9 семействам, 19 родам. Всего выявлено 86 видов.

В исследованных почвенных объектах Астраханской области, по видовому разнообразию лидирующее положение занимает семейство Oscillatoriaceae (31 видовых таксона) – 36,0% от числа обнаруженных видов. В число ведущих, кроме того попадают 2 семейства, среди которых содержатся кокковые и колониальные формы (Gloeocapsaceae, Microcystidaceae). Основную долю представителей цианобактерий составляют виды родов: *Phormidium* (16), *Oscillatoria* (12), *Gloeocapsa* (10), *Microcystis* (3), *Anabaena* (3). Меньшим числом видов отдела Cyanobacteria отличаются роды *Cylindrospermum* (2), *Spirulina* (2), *Plectonema* (2), *Synechococcus* (2) и др. Среди зеленых водорослей идентифицировали роды *Chlorococcum* (4), *Scenedesmus* (4), *Chlorella* (2), *Bracteacoccus* (1) и др. Из диатомовых водорослей обнаружили роды *Pinnularia*, *Nitzschia*, *Navicula*, *Hantzschia*, *Spirogyra*.

Наибольшее число видов фототрофов обнаружили в аллювиальных луговых и бурых полупустынных почвах. Цианобактерии занимали лидирующее положение, как по общему числу видов, так и по числу видов в каждом типе почв (таблица 3). В солончаках и в бурых почвах присутствует максимальное количество цианобактерий 80,0%, по сравнению с другими водорослями. По данным Штиной и др. (1998) для всех пустынных почв характерно наибольшее видовое богатство и доминирующая роль цианобактерий из порядка Oscillatoriales. Меньшим числом видов отличаются светло-каштановые почвы.

Количество видов цианобактерий по отношению к зеленым водорослям в пустынных почвах является показателем аридности и экстремальности условий среды (Новичкова-Иванова, 1980; Гецен, 1985; Пивоварова и др., 2012). Долевое участие цианобактерий в максимальном выражении в 4,4 раза для бурых полупустынных почв, в 4,0 раза для солончаков и 3,2 раза для светло-каштановых почв больше, чем зеленых водорослей (таблица 3). Такие показатели близки к показателю 1:3,6 для Сахаро-Гобийской пустыни (Новичкова-Иванова, 1980; Пивоварова и др., 2012).

Таким образом, качественный состав фототрофных комплексов всех исследованных почв отличается большим разнообразием и включает представителей цианобактерий, зеленых и диатомовых водорослей.

Проведенные исследования показали, что цианобактерии родов *Phormidium* и *Oscillatoria* отличаются значительным видовым разнообразием и являются широко распространенными в наземных экосистемах формами (Давыдов, 2010; Зенова, Штина, 1990; Костиков и др., 2001; Lund, 1945). В почвах аридных территорий, в том числе в почвах Нижнего Поволжья среди водорослей доминировали цианобактерии рода *Phormidium* (Штина, Голлербах, 1976). Меньшим числом видов представлен отдел *Vaccillariophyta*.

Анализ видового состава цианобактерий показал, что к числу наиболее распространенных видов относились *Phormidium faveolarum*, *Phormidium tenue*, *Phormidium retzii* – космополит (Komárek, Anagnostidis, 2005), *Phormidium ambiguum*, *Phormidium inundatum*, *Phormidium bohneri*, *Oscillatoria woronchnii*, *Oscillatoria mucicola*, *Gloeocapsa magma*, *Gloeocapsa minuta*, *Anabaena variabilis*, *Plectonema nostocorum*.

Таблица 3 - Число видов цианобактерий и водорослей в почвах разных типов Астраханского региона

Типы почв	Число видов, %			Долевое участие (цианобактерии : зеленые)	Общее число видов
	Цианобактерий	Зеленых водорослей	Диатомовых водорослей		
Аллювиальные луговые	71,1	26,5	2,4	2,7:1	83
Бурые полупустынные	80,0	18,6	1,4	4,4:1	70
Светло каштановые	76,2	23,8	-	3,2:1	21
Песчаные	51,0	38,8	10,2	1,3:1	49
Солончаки	80,0	20,0	-	4,0:1	25

В результате анализа экологических особенностей обнаружили доминирование Р – жизненной формы, к которой относится род *Phormidium*. Это нитевидные цианобактерии, рассеянные в толще почвы, ксерофиты, устойчивые против засухи. Оценка по индексам сходства Жаккара и Сьёренсена показала, что наибольшее сходство цианобактерий отмечали для бурых полупустынных и аллювиальных луговых почв 0,37 и 0,54 и бурых полупустынных и песчаных почв 0,36 и 0,53. Таким образом, тип почвы оказывает значительное влияние на состав фототрофов в них.

В накопительных культурах в составе спутников почвенных циано-бактериальных сообществ обнаружили актиномицеты, в том числе стрептомицеты в количестве от $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г до $8,0 \times 10^6$ КОЕ/г.

Актиномицеты как основа микробных комплексов почв аридной зоны

Численность эколого-трофических групп, куда входили сапротрофы, олиготрофы, олигонитрофилы, сахаролитические, амилолитические микроорганизмы в 23 образцах аллювиальной луговой, бурой полупустынной, аллювиальной дерновой и светло-каштановой почв с различной степенью засоления находилась в пределах порядков 10^6 - 10^7 КОЕ/г. Среди них выделены микроскопические грибы, бактерии, в том числе, актиномицеты.

Наибольшее многообразие и распространение почвенных комплексов актиномицетов ($2,0 \times 10^6$ КОЕ/г – $22,0 \times 10^6$ КОЕ/г) встречалось в образцах почв с повышенной степенью засоления (величина сухого остатка водной вытяжки 1,1-2,8 %). Исследования показали, что в специфичных почвенно-экологических условиях региона, характеризующихся высокими концентрациями солей и недостатком влаги, одними из наиболее распространенных почвенных микроорганизмов являются актиномицеты. В результате исследования качественного состава эколого-трофических групп микроорганизмов выделен 21 изолят актиномицетов, в составе которых присутствовали стрептомицеты.

Глава 5 посвящена выделению и идентификации микроорганизмов, перспективных с точки зрения биотехнологии

Выделение и идентификация микроорганизмов, перспективных с точки зрения биотехнологии

Культурально-морфологическая характеристика почвенных циано-бактериальных сообществ и генотипическая характеристика *Anabaena constricta* IPPAS В-2020

Для исследования свойств биотехнологически перспективных микроорганизмов на первом этапе из почвенных экосистем и ризосфер растений Астраханской области выделяли циано-бактериальные сообщества, которые ранжировали от №1 до №26. Отбирали консорциумы, которые активно наращивали биомассу в лабораторных условиях №2, №5, №6, №11, №12, №14, №15, №21, №26. Циано-бактериальные сообщества изучали микроскопически и определяли доминирующие роды.

Циано-бактериальное сообщество №2 выделено из ризосферы дуба черешчатого (*Quercus robur*), произрастающего на аллювиальных луговых почвах. В сообществе преобладали роды *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Gloeocapsa*, *Chroococcus* с присутствием зеленых водорослей родов *Chlorococcum*, *Scenedesmus*. Сообщество №5, в котором преобладали роды *Anabaena* и *Amorphonostoc*, выделено из аллювиальных луговых почв ясеневоего леса. В циано-бактериальном сообществе №6, выделенном из аллювиальных луговых почв, доминирующим явился род *Phormidium*. Сообщество №11 выделено из бурых полупустынных почв сельскохозяйственного назначения. Доминирующими явились цианобактерии *Microcystis*, *Phormidium*, *Spirulina*, зеленые водоросли *Chlorococcum*, *Chlorella*. Циано-бактериальное сообщество №12 выделено из солончаковых почв. В нем преобладали роды *Oscillatoria* и *Microcystis*. В сообществе №14, выделенном из урбанозема г. Астрахани, преобладал род *Cyanothrix*. В сообществе №15,

выделенном из светло-каштановых почв, доминирующими явились цианобактерии родов *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Microcystis*, *Gloeocapsa*. Сообщество №21 получено из сухих биопленок рода *Nostoc*, развивающихся на светло-каштановых почвах. Цианобактериальное сообщество №26, в котором преобладали род *Phormidium* и род *Microcystis* выделено из ризосферы аморфы кустарниковой (*Amorpha fruticosa*).

Для получения альгологически чистой культуры рода *Anabaena* использовали циано-бактериальное сообщество №5 (Гайсина и др., 2008). Культуру цианобактерий идентифицировали до вида по фенотипическим признакам: *Anabaena constricta* (Szaf.) Geitl. Клетки цианобактерий *Anabaena constricta* синезеленые, цилиндрические, посередине перешнурованные, шириной 5,0-6,5 мкм, длиной - 3,0-6,0 мкм. Гетероцисты круглые шаровидные, 5-7 мкм в диаметре (рисунок 1).



Рисунок 1 - Трихомы *Anabaena constricta* в световом микроскопе; масштабная линейка соответствует 10 мкм

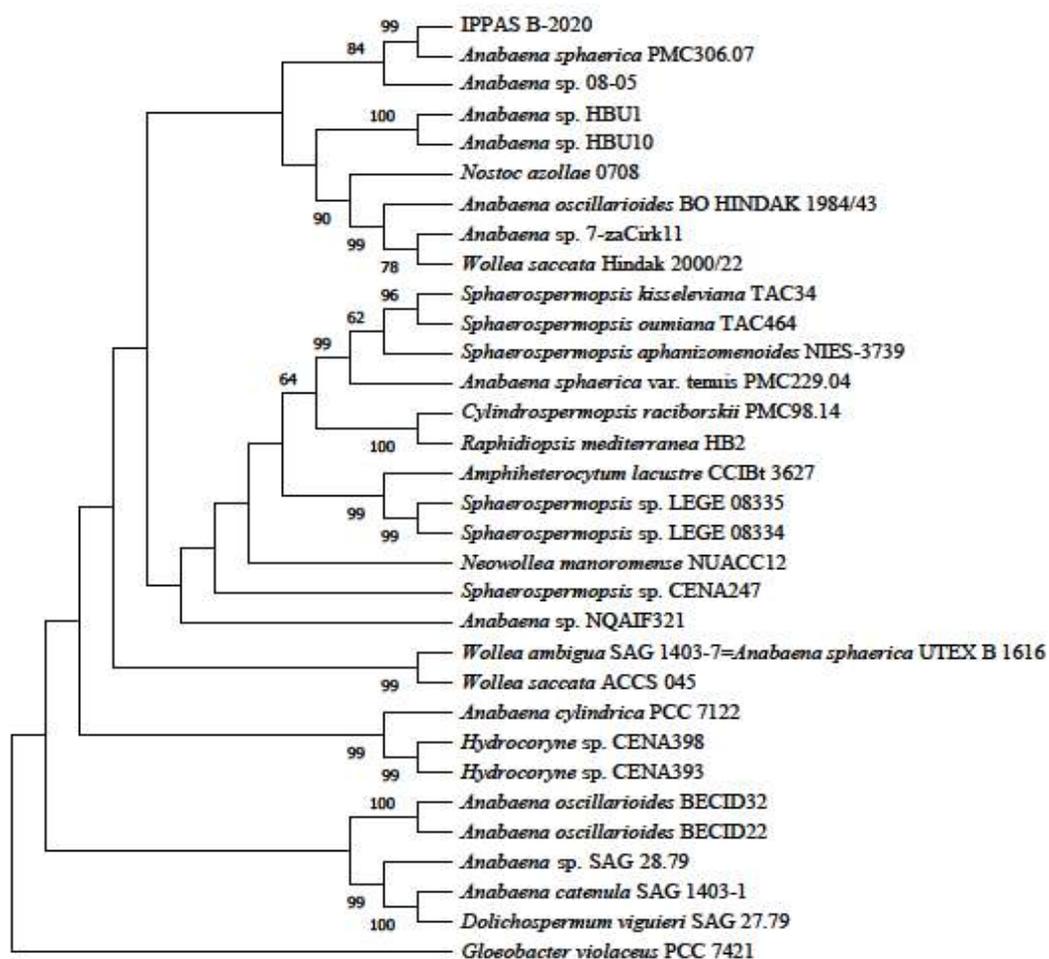


Рисунок 2 - Rrs-филограмма, отражающая таксономическое положение штамма *Anabaena constricta* IPPASB-2020 в пределах *Anabaena*

Спор не обнаружили. Амплификация фрагментов гена 16S рРНК *Anabaena constricta* дала фрагмент длиной 612 нуклеотидов: Untitled_Contig_1-2.seq "Contig 1"

(1,612). Максимальное сходство последовательность имеет со штаммами *Anabaena* sp. (рисунок 2).

У штамма *Anabaena constricta* IPPAS B-2020 обнаружена бутстрап-поддержка только для клады *Anabaena sphaerica* PMC306.07 — *Anabaena* sp. 08-05. Типовым видом анабены является *Anabaena oscillarioides*. Штаммы, которые отнесли к этому виду, оказались разнесены по двум дальним кладам — в одну попали *Anabaena oscillarioides* BECID32 и BECID22, и именно их склонны считать настоящими анабенами. Во вторую кладу попал штамм *Anabaena oscillarioides* BO HINDAK 1984/43 и он ближе к штамму IPPAS B-2020. Поэтому штамм *Anabaena constricta* IPPASB-2020 идентифицирован как *Anabaena* sp.

Культурально-морфологическая характеристика водных циано-бактериальных сообществ и генотипическая характеристика *Phormidium ramosum* IPPAS B-2022

С помощью метода накопительных культур на основе воды водоемов, компонентов водных экосистем получены водные циано-бактериальные сообщества, некоторые из которых ранжированы по номерам.

Циано-бактериальное сообщество №1 получено путем культивирования циано-бактериальных пленок, воды, ила, высшей растительности озера «Мраморное» при искусственном освещении на питательной среде BG_N-11 с соленостью 5-10 %. Циано-бактериальное сообщество №2 получено с использованием циано-бактериальных пленок озера «Мраморное» с добавлением гипсовых пород, культивируемые на питательной среде BG_N-11 при естественном освещении с соленостью 5-10%. Сообщества представляют собой многослойные тяжи сине-зеленого цвета, внешне схожие с циано-бактериальными матами, развивающимися в природных экстремальных местообитаниях. Микроскопическое исследование накопительной культуры №1 показало доминирование цианобактерий вида *Phormidium ramosum* и *Oscillatoria limnetica* в присутствии *Oscillatoria quasiperforata* и *Gloeocapsa* sp. В культуре №2 доминировал вид *Oscillatoria deflexa* и *Phormidium* sp., в присутствии *Oscillatoria animalis* и *Oscillatoria amphibian*.

Выделена альгологически чистая культура из накопительной культуры №1 *Phormidium ramosum* В.-Peters., которую идентифицировали по фенотипическим признакам. Дерновинки цианобактерий *Phormidium ramosum* В.-Peters. IPPASB-2022 ярко

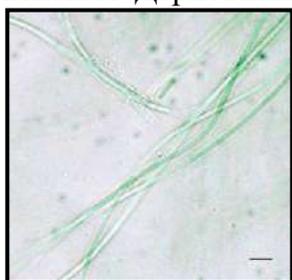


Рисунок 3 - Трихомы *Phormidium ramosum* IPPASB-2022 в световом микроскопе; масштабная линейка соответствует 5 мкм

синезеленые, волнистые. Трихомы расположены параллельными рядами или разнообразно переплетающиеся, 1,3-1,9 мкм шириной, у поперечных перегородок не перешнурованные (рисунок 3). Длина клеток в 2-3 раза больше ширины. Конечные клетки закругленные, с утолщенной сверху оболочкой.

Штамм *Phormidium ramosum* IPPAS B-2022 кластеризуется с *Halomicronema hongdechloris* C2206 (изолирован из строматолитов, собранных в заливе Шарк, Австралия (Raeid M. A. et al, 2002)) и штаммом CENA320, изолированным с листьев мангрового дерева *Avicennia schaueriana* Бразилии, экскрецирующей соль. Так как типовой вид *Halomicronema excentricum* TFER1 размещен от *Halomicronema hongdechloris* C2206 очень далеко, клада IPPAS B-2022 представляет собой новый род. Поэтому в базе данных GenBank NCBI он обозначен как Pseudanabaenaceae cyanobacterium (определен только до семейства).

В циано-бактериальном сообществе на основе воды озера Мраморное, структурообразователями явились цианобактерии *Phormidium henningii* и *Spirulina subtilissima*. В циано-бактериальном сообществе, культивируемом на воде озера Северное, эдификаторами явились *Phormidium valderiae* и *Phormidium tenuissimum*, присутствует также *Oscillatoria ornate*, из одноклеточных - *Synechocystis sp.* Циано-бактериальное сообщество из озера Южное состояло из *Phormidium valderiae*, *Phormidium tenue*, *Phormidium tenuissimum*, *Oscillatoria ornate*.

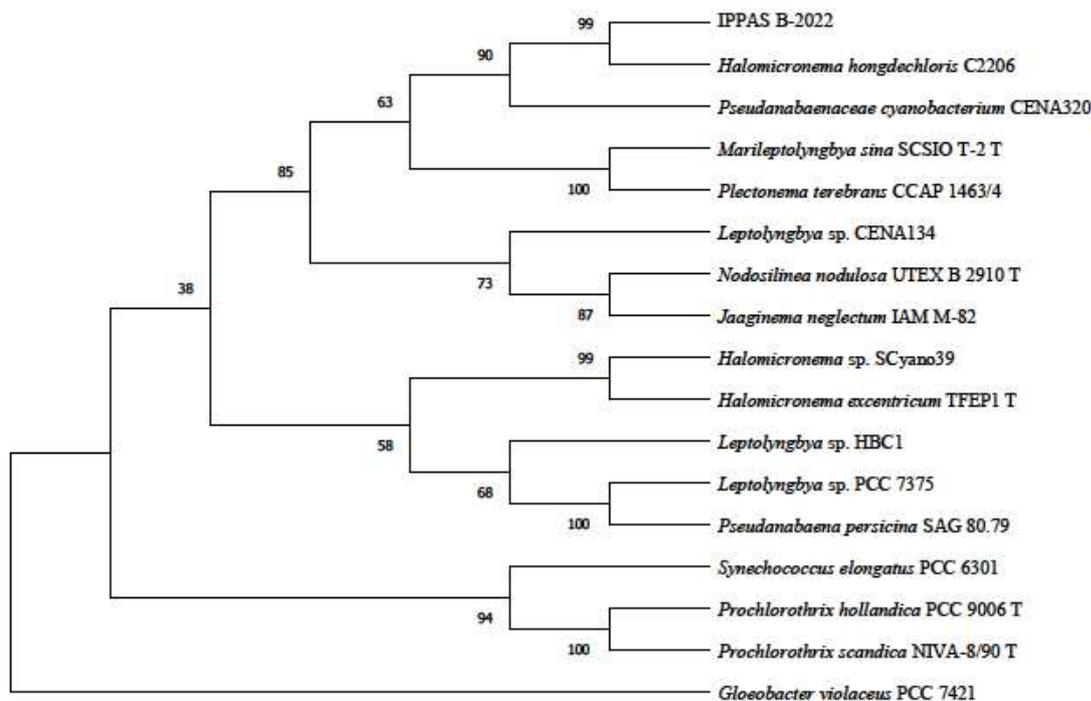


Рисунок 4 - Rrs-филограмма, отражающая таксономическое положение штамма *Phormidium ramosum* IPPASB-2022

В сообществе на основе воды из ЗПО структурообразователями явились *Phormidium valderiae*, *Phormidium tenuissimum* и *Phormidium tenue*, *Synechococcus sp.* В накопительной культуре на основе воды ЕСР доминирующей формой выделенного сообщества явились нитчатые *Phormidium tenuissimum*, среди которых присутствовало незначительное количество одноклеточных *Synechocystis salina*. Структурообразователями мата, выделенного из окситенка очистных сооружений АГКМ явились цианобактерии, идентифицированные как *Phormidium tenuissimum*, одноклеточные *Synechocystis minuscula* и *Synechococcus elongates*. Эдификаторами мата, выделенного из пруда-отстойника, явились цианобактерии *Phormidium tenuissimum* и *Synechocystis salina*. Накопительная культура на основе воды из реки Ахтуба содержала в качестве доминирующего компонента цианобактерии *Gloeocapsa sp.*

Описание штаммов актиномицетов

Выделенные 21 изолят актиномицетов исследовали на фитотоксичность на растениях томата Новичок. В результате выбраны 3 изолята (№11, №2, №18), проявивших высокую фитостимулирующую активность.

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства штамма *Streptomyces carpaticus* RCAM04697

Изолят №11 характеризовался следующими культурально-морфологическими признаками: спораносцы прямые или извилистые, короткие; споры овальные и шаровидные с гладкой оболочкой, размером 0,7-1,0×1,0-1,1 мкм; на крахмально-

казеиновой среде колонии округлые, уплощенные, слабоскладчатые, с мучнистой поверхностью (d = 4 мм); воздушный мицелий темно-коричневый; субстратный мицелий вишнево-красный; пигмент на среду не влияет; на сусло-агаре колонии мелкие (d = 1,5 мм), округлые; воздушный мицелий светло-коричневый, субстратный мицелий желто-бурый; среда не окрашена; на картофельном агаре колонии округлые, уплощенные (d = 5 мм); воздушный мицелий светло-серый, субстратный мицелий темно-коричневый; оптимальное значение pH 7,0-7,1. Данный изолят не нуждался в факторах роста, стабилен.

Генотипическая характеристика штамма *Streptomyces carpaticus* RCAM04697

Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК

С помощью метода секвенирования установлено, что фрагмент *rrs* гена изолята №11 имеет уровень сходства 100% с аналогичным фрагментом типового штамма *S. carpaticus*, что позволяет отнести изучаемый изолят к данному виду (Yanetal., 2018). Изолят идентифицирован, как *Streptomyces carpaticus* (рисунок 5). *Rrs*-дендрограммы демонстрируют таксономическое положение изучаемого изолята в пределах рода *Streptomyces*. Изолят №11 сформировал единый кластер с типовым штаммом *S. ginkgonis* KM-1-2T при высоком уровне поддержки 99% (рисунок 5).

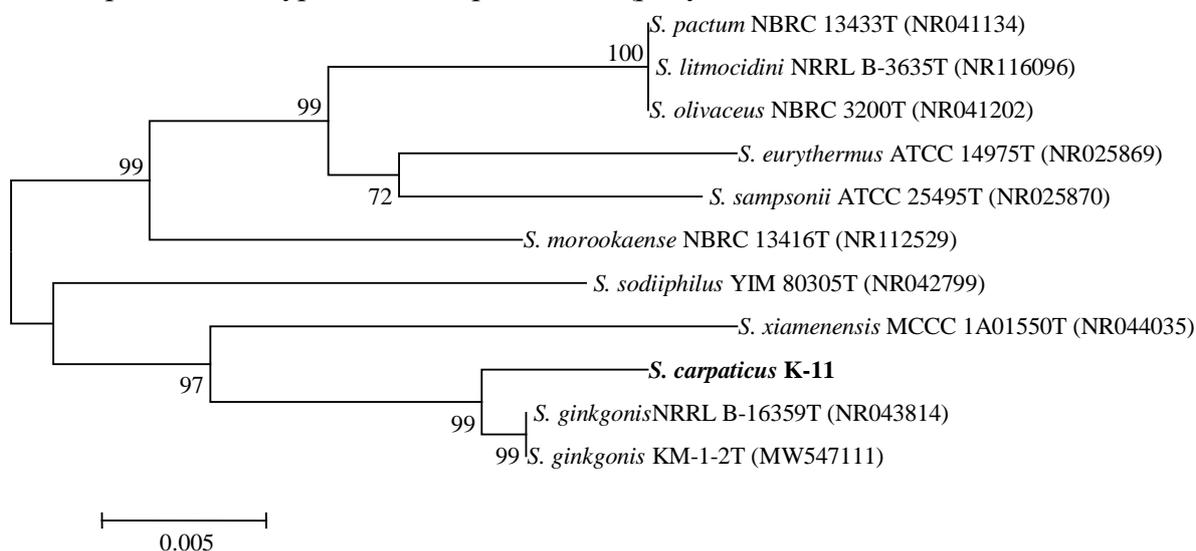


Рисунок 5 -*Rrs*-филограмма, отражающая таксономическое положение изолята №11 в пределах рода *Streptomyces**. Примечание: * Указаны уровни поддержки кластеров более 30%

Согласно литературным источникам штамм имеет следующее систематическое положение (Verslyppe et al., 2014): порядок – *Streptomycetales*, подотряд – *Streptomycineae*, семейство – *Streptomyetaceae*, род – *Streptomyces*, вид - *Streptomyces carpaticus*, полное научное название - *Streptomyces carpaticus* (Maximova and Terekhova, 1986).

Полногеномный анализ

В результате полногеномного секвенирования на платформе Illumina MiSeq получено 916 371 коротких прочтений (533 148 207 п.н.), на платформе MinION – 103 371 (247 666 704 п.н.). Финальная сборка генома состояла из одной линейной хромосомы размером 5 968 715 п.н. GC состав - 72,84%. Полный геном депонирован в GenBank (CP104005.1), аннотация осуществлена в NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) GeneMarkS-2+ (revision 6.2). В процессе аннотации и анализа генома было определено 5206 последовательностей, кодирующих белки, 60 последовательностей тРНК, 15 – рРНК (5 – 5S, 5 – 16S, 5 – 23S) и 8 CRISPR-локусов.

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства штаммов *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883

Культурально-морфологическими особенностями изолята №2 являлось образование круглых колоний с желтым мицелием субстрата и пепельно-серым

воздушным мицелием на картофельном агаре. Изолят №18 развивался на данном агаре, образуя круглые колонии с белым мицелием субстрата и бледно-розовым воздушным мицелием.

Генотипическая характеристика штаммов *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883

С помощью метода секвенирования установили, что изоляты №2 и №18 наиболее близки к типовому штамму *N. umidischolae* NBRC 100349T (99,84% и 99,82%, соответственно) и идентифицированы, как *Nocardiosis umidischolae* (рисунок 6).

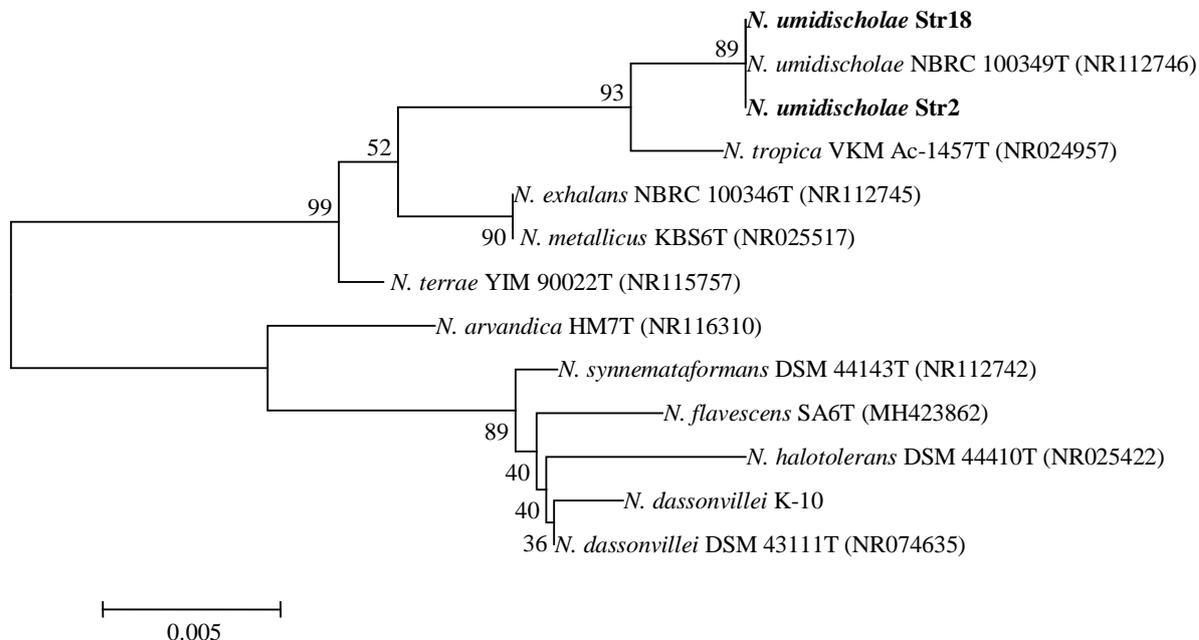


Рисунок 6 - *Rrs*-филограмма, отражающая таксономическое положение изолятов №2 и №18 в пределах рода *Nocardiosis**. Примечание: * Указаны уровни поддержки кластеров более 30%

Rrs-дендрограммы демонстрируют таксономическое положение изучаемых бактерий в пределах рода *Nocardiosis*. Согласно литературным источникам штаммы *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 имеют следующее систематическое положение (Peltola et al., 2001): подкласс – *Actinobacteridae*, порядок – *Actinomycetales*, семейство – *Nocardiosaceae*, вид - *Nocardiosis umidischolae*, полное научное название - *Nocardiosis umidischolae* (Peltola et al., 2002).

Глава 6 посвящена изучению свойств цианобактерий в лабораторных условиях

Трансформация видов и устойчивость водных цианобактерий к экстремальным значениям гидрохимических факторов

Устойчивость цианобактерий проверяли при изменении pH, температуры, концентрации неорганических фосфатов, солености.

Анализ экспериментальных данных показал, что изучаемые техногенные цианобактериальные сообщества в накопительных культурах жизнеспособны при pH от 5 до 10. При оптимальных значениях в диапазоне от 9 до 10, обнаружен активный прирост биомассы, например, при pH 9 биомасса увеличилась на 44%, при pH 10 – на 38%. Микробиологическое исследование циано-бактериальных сообществ при каждом значении pH показало изменения в составе доминантов. Например, при значении pH 5 доминировали виды *Phormidium ambiguum* и *Phormidium tenue*, при pH 6 - *Phormidium tenue*, *Phormidium dimorphum* явился структурообразователем сообщества, развивающегося при pH 7.

Оптимальной температурой развития сообщества является диапазон от 15°C до 20°C с увеличением биомассы в 6,5 раз, при этом отмечено явное доминирование видов рода

Phormidium. В температурном диапазоне от 5°C до 15°C эдификатором сообщества явился *Phormidium tenue*, при 20°C доминировал *Phormidium tenuissimum*. *Phormidium fragile* явился структурообразователем сообщества в температурном спектре от 30°C до 40°C, что согласуется с литературными данными о развитии данного вида в горячих источниках.

Интервал исследуемых концентраций фосфатов K_2HPO_4 (0,4 г/л, 1 г/л, 5 г/л, 10 г/л) не оказывал влияния на фотосинтетическую деятельность, косвенным показателем которой являлась интенсивность окраски дерновинок. Значительное увеличение биомассы циано-бактериальных сообществ обнаружили в концентрации 1 г/л при доминантах *Phormidium tenuissimum* и *Synechocystis* sp. в 3,3 раза; при концентрации 5 г/л – *Synechocystis* sp. в 5,5 раз, *Phormidium tenue* - в 3,5 раза, *Synechocystis* sp. - в 3 раза; при концентрации 10 г/л - в 7 раз, *Phormidium tenue* - в 6,5 раз, *Synechocystis* sp. - в 5,5 раз. Следует отметить, что при более низких концентрациях 0,04 г/л и 0,4 г/л только в циано-бактериальных сообществах, выделенных из озера Северное, наблюдали значительное увеличение биомассы в 3 раза при доминантах *Phormidium valderiae*. Таким образом, наиболее резистентным к концентрациям фосфатов от 0,04 г/л до 10 г/л из всех исследуемых сообществ явились сообщества, выделенные из ЕСР и из озера Южное. При этом в сообществе из ЕСР произошла замена трихомных цианобактерий на одноклеточные. Выделенные циано-бактериальные сообщества можно предложить для разработки методов очистки сточных вод от фосфорных соединений.

В эксперименте по влиянию общего содержания солей на жизнедеятельность циано-бактериальных сообществ (Южное и ЕСР) после окончания экспозиции значительное увеличение биомассы обнаружили при концентрации солей 50 г/л при доминантах *Phormidium tenue* и *Phormidium fragile* в 23 раза и 10 г/л при доминантах *Phormidium fragile* в 8 раз. В вариантах опытов с минерализацией 400 г/л происходило увеличение биомассы в 1,2 раза (ЕСР) и в 1,4 раза (Южное). Под влиянием концентраций солей, используемых в опытах, морфология циано-бактериальных сообществ не изменилась, но произошла смена видов трихомных цианобактерий рода *Phormidium*. Анализируя результаты исследования можно говорить о сообществе, выделенном из озера Южное, как наиболее резистентном к концентрациям солей от 10 г/л до 400 г/л.

Фитотоксичность цианобактерий

Установили, что культуры почвенных цианобактерий не оказывали угнетающего воздействия на семена кресс-салата, пырея безкорневищного, томатов и хлопчатника. При создании условий недостатка влаги, наиболее выносливыми оказались растения, семена которых были обработаны цианобактериями.

Антагонистическая активность цианобактерий по отношению к фитопатогенным грибам родов *Fusarium*, *Phythium*, *Alternaria*

Фунгицидной активностью по отношению к *Fusarium culmorum*, *Fusarium sporotrichioides* и *Phythium ultimum* обладали все исследуемые почвенные циано-бактериальные сообщества (№2, №11, №15, №21). По отношению к *Alternaria tenuissima* фунгицидной активностью обладали почвенные циано-бактериальные сообщества № 2, №11, №15.

По отношению к *Fusarium culmorum* наибольшую зону ингибирования обнаружили у циано-бактериального сообщества № 11 (2,2 см), а наименьшую – у сообщества № 2 - 1,2 см. Через 30 суток инкубирования наблюдали полное подавление роста микромицета (рисунок 7). Микроскопирование показало, что в условиях непосредственного взаимодействия с цианобактериями формирование мицелия грибов значительно замедлялось по сравнению с контролем. Нарушения в развитии гиф гриба при воздействии цианобактериями приводили к формированию излишне разветвленного и часто септированного мицелия, изменению ширины гиф и полному инактивированию патогена.

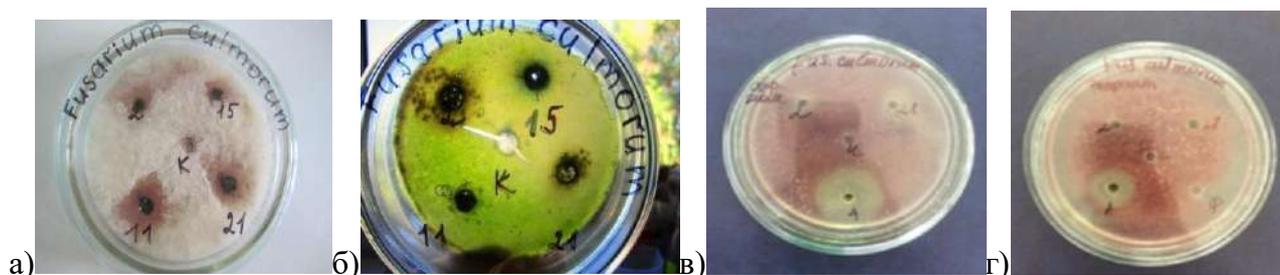


Рисунок 7 - Проявление фунгицидных свойств цианобактерий по отношению к *Fusarium culmorum* (цифры около лунок – номера культур цианобактерий). а) ДЗИ сообществ через 5 суток б) ДЗИ сообществ через 30 суток в) ДЗИ *Anabaena constricta* IPPASB-2020 через 3 суток г) ДЗИ водно-спиртового экстракта *Anabaena constricta* IPPASB-2020 через 3 суток

Исследования показали, что наиболее активным по отношению ко всем исследуемым микромицетам оказалось циано-бактериальное сообщество № 15 с наибольшим диаметром зоны ингибирования 3,2 см (рисунок 8) и водно-спиртовый экстракт цианобактерий *Anabaena constricta* IPPASB-2020, который ингибировал рост всех исследуемых фитопатогенных микромицетов рода *Fusarium*, в том числе и *Fusarium poae*. Водно-спиртовый экстракт и биомасса *Anabaena constricta* показали полное подавление грибов *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichioides* с максимальной зоной задержки роста 2,5 см.

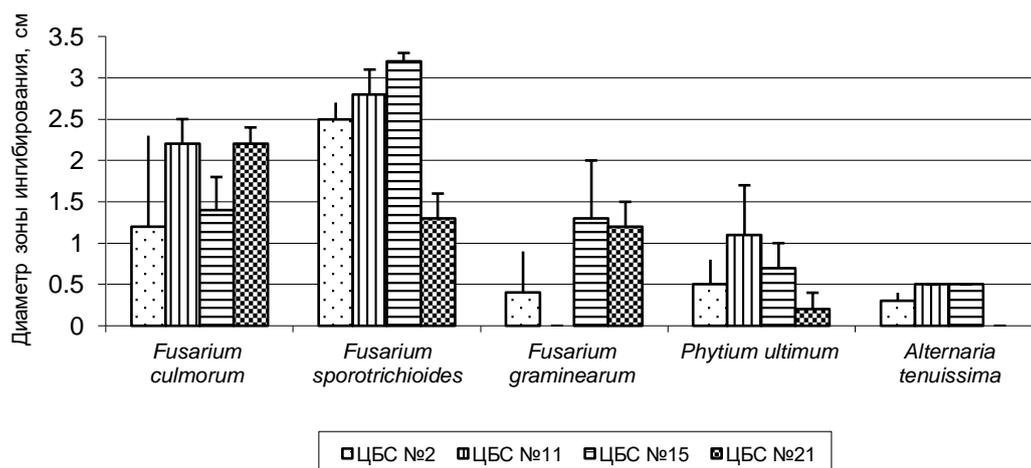


Рисунок 8 - Фунгицидная активность циано-бактериальных сообществ по отношению к фитопатогенным грибам родов *Fusarium*, *Phythium*, *Alternaria*

Таким образом, исследования показали активное антагонистическое действие цианобактерий на фитопатогенные грибы родов *Fusarium*, *Phythium*, *Alternaria*.

Антиоксидантная активность цианобактерий

Выраженной антиоксидантной активностью обладал водный экстракт цианобактерий *Anabaena constricta* IPPASB-2020 в объеме 20 мкл - 39,3%, а также культуральная жидкость сообщества №21 36,1% и водно-спиртовый экстракт сообщества №2 в объеме 100 мкл 39,6% (таблица 4).

При изучении водных культур, наибольшую антиоксидантную активность выявили в водном и водно-спиртовом экстрактах *Phormidium ramosum* IPPASB-2022 -18,3% и 18,5%, превышающих контроль на 46,4% и 48,0 %, соответственно.

Антибактериальная активность водных культур цианобактерий

Умеренную антибактериальную активность наблюдали в варианте с сырой биомассой цианобактерии *Phormidium ramosum* IPPASB-2022 по отношению к *Escherichia coli* с диаметром зоны ингибирования роста 0,9 см. Водно-спиртовой экстракт чистой культуры подавлял рост бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Таблица 4 - Антиоксидантная активность исследуемых почвенных культур цианобактерий

Вариант опыта		Антиоксидантная активность, %	
		20 мкл	100 мкл
Контроль – аскорбиновая кислота		12,5±0,02	25,0±0,11
Культуральная жидкость	<i>Anabaena constricta</i> IPPASB-2020	6,2±0,01	7,8±0,09
	Сообщество №2	17,7±0,01	24,2±0,07
	Сообщество №21	27,1±0,03	36,1±0,02
Водный экстракт	<i>Anabaena constricta</i> IPPASB-2020	39,3±0,94	28,7±0,06
	Сообщество №2	22,6±0,08	12,2±0,07
	Сообщество №21	28,7±0,07	5,8±0,12
Водно-спиртовый экстракт	<i>Anabaena constricta</i> IPPASB-2020	3,2±0,02	27,7±0,01
	Сообщество №2	4,3±0,20	39,6±0,02
	Сообщество №21	4,3±0,10	7,7±0,01

Исследование колонизирующей способности почвенных цианобактерий

Колонизирующую способность изучали на семенах томата и перца. На пятые сутки инкубирования обнаружили первые культуральные признаки роста – обрастания зеленого цвета вблизи корней. На 30 сутки визуально наблюдали активный рост зеленых обрастаний на корешках растений томата, который был интенсивнее при обработке семян почвенным сообществом № 2, эдификаторами которого явились цианобактерии родов *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Phormidium* в отличие от сообщества № 21 на основе рода *Nostoc*. В контрольных пробирках роста не наблюдали. Наибольшую оптическую плотность суспензии наблюдали у томатов с циано-бактериальным сообществом №2(1) – 0,114, у перца – с сообществом №21 – 0,110. Это свидетельствует о том, что данные сообщества обладают способностью к колонизации растений.

Исследование устойчивости цианобактерий к пестицидам

При исследовании влияния фосфорорганического пестицида на циано-бактериальное сообщество № 21, выявили ингибирование роста культуры практически во всех разведениях глифоса (раствор концентрата 1:1, 1:5, 1:10, 1:100; раствор рабочего раствора 1:1, 1:5, 1:10, 1:100). В рабочем растворе и разведении 1:100 рабочего раствора установили стимулирующее действие на цианобактерии. В разведении 1:100 наблюдали максимальное значение оптической плотности - 0,405, в сравнении с контролем – 0,396, что подтверждает стимулирование роста культуры. В разведении рабочего раствора 1:100 при микроскопировании не обнаружили изменений клеток, но в рабочем растворе глифоса отметили развитие большого количества кокковых форм наряду с нитевидными.

Таким образом, в ходе исследований свойств цианобактерий выявили их устойчивость к экстремальным значениям гидрохимических факторов среды: pH, температуры, концентрации неорганического фосфора, солености. Установили отсутствие фитотоксических свойств у всех исследуемых культур цианобактерий. Выявили активное антагонистическое действие культур циано-бактериальных сообществ №2, №11, №15, №21 и культуры *Anabaena constricta* IPPASB-2020 на фитопатогенные грибы родов *Fusarium*, *Phythium*, *Alternaria*. Обнаружили антиоксидантную активность водных и почвенных культур цианобактерий. Выявили антибактериальные, колонизирующие свойства цианобактерий и устойчивость к пестицидам.

Глава 7 посвящена изучению свойств штаммов актиномицетов

Исследование фитотоксичности штаммов актиномицетов в лабораторном опыте

Установили, что суспензии и все варианты экстрактов трех штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 не токсичны для

редиса, наблюдали выраженный ростстимулирующий эффект, а концентрация 1 мг/мл оказалась эффективнее, чем концентрация 0,5 мг/мл.

Исследование активности штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 в отношении вирусных патогенов растений
Противовирусную активность проводили на томатах и картофеле в лабораторных условиях визуальным, индикаторным и серологическим методами через 3 суток после второй обработки.

Суспензии исследуемых штаммов проявляли противовирусную активность в отношении ВОМ и ВМТо (таблица 5).

Таблица 5 - Противовирусная активность суспензий штаммов *N. umidischolae* RCAM04882, *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04883 в лабораторных условиях на томате

Вариант эксперимента	Количество инокулированных растений, шт.	Количество растений без симптомов	
		шт.	%
Контроль при инокуляции ВОМ	80	2	2,5
Контроль при инокуляции ВМТо	80	4	5,0
<i>N. umidischolae</i> RCAM04882			
Обработка суспензией штамма после инокуляции ВОМ	80	27	33,8
Обработка суспензией штамма после инокуляции ВМТо	80	21	26,3
<i>S. carpaticus</i> RCAM04697			
Обработка суспензией штамма после инокуляции ВОМ	80	32	40,0
Обработка суспензией штамма после инокуляции ВМТо	80	26	32,5
<i>N. umidischolae</i> RCAM04883			
Обработка суспензией штамма после инокуляции ВОМ	80	22	27,5
Обработка суспензией штамма после инокуляции ВМТо	80	15	18,8

Наибольшие показатели противовирусной активности обнаружили при обработке суспензией штамма *S. carpaticus* RCAM04697: при инокуляции ВОМ количество бессимптомных растений томата составило 40,0%, при ВМТо – 32,5%. Наименьшую противовирусную активность в отношении исследуемых вирусов установили при обработке суспензией штамма *N. umidischolae* RCAM04883 (ВОМ – 27,5%; ВМТо – 18,8%). Противовирусная активность суспензии штамма *N. umidischolae* RCAM04882 не превышала 33,8% в отношении ВОМ и 26,3% в отношении ВМТо. Анализ полученных данных показал, что ВМТо более устойчив к действию штаммов актиномицетов (18,8%-32,5%), чем ВОМ (27,5%-40,0%).

Изучение противовирусной активности суспензии исследуемых штаммов на картофеле показало наличие противовирусных свойств в отношении УВК и ХВК. Максимальное значение противовирусной активности обнаружено при обработке суспензией штамма *S. carpaticus* RCAM04697: при инокуляции УВК количество бессимптомных растений картофеля составило 51,3%, при ХВК – 41,3%.

Таким образом, лабораторные опыты по изучению противовирусных свойств суспензий исследуемых бактерий свидетельствует о сдерживании развития и распространения вирусных возбудителей ВОМ, ВМТо, УВК, ХВК.

Антагонистическая активность штаммов актиномицетов по отношению к фитопатогенным грибам родов *Fusarium*, *Phythium*, *Alternaria*

Наибольшую фунгицидную активность обнаружили у штамма *Streptomyces*

carpaticus RCAM 04697 по отношению к *Alternaria tenuissima* - 3,3 см и *Fusarium sporotrichioides* – 3,1 см. При микроскопировании отмечено усиленное спороношение и лизис мицелия. Спектр зон подавления роста фитопатогенных грибов колебался в пределах от 1,7 до 3,3 см. Цианобактерии в отличие от актиномицетов по отношению к *Alternaria tenuissima* проявили наименьшую фунгицидную активность – 0,7 см. Но относительно фитопатогена *Fusarium culmorum* *Streptomyces carpaticus* RCAM 04697, *Anabaena constricta* IPPASB-2020 и циано-бактериальные сообщества №2, №11, №15, №21 проявили высокие антагонистические свойства с ДЗИ от 1,2 см до полного подавления роста гриба во всей чашке.

Антиоксидантные свойства штаммов актиномицетов

Наибольшую антиоксидантную активность проявили суспензия (88,8%) и водно-спиртовой экстракт (76,0%) штамма *S. carpaticus* RCAM04697. Максимальную антиоксидантную активность штамма *N. umidischolae* RCAM04882 обнаружили в гексановом и водно-спиртовом (80:20) экстрактах 63,8% и 71,4%, соответственно. (таблица 6).

Таблица 6 - Антиоксидантная активность штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883

№ п/п	Вариант	АОА, %		
		<i>N. umidischolae</i> RCAM04882	<i>S. carpaticus</i> RCAM04697	<i>N. umidischolae</i> RCAM04883
1	Гексановый экстракт	63,8±0,07	37,2±0,15	61,0±0,08
2	Метанольный экстракт	46,9±0,11	56,1±0,18	59,0±0,05
3	Водно-спиртовой экстракт (20:80)	38,8±0,06	76,0±0,08	58,0±0,09
4	Водно-спиртовой экстракт (50:50)	59,7±0,15	63,5±0,05	58,0±0,13
5	Водно-спиртовой экстракт (80:20)	71,4±0,02	35,2±0,12	61,0±0,05
6	Суспензия	62,8±0,05	88,8±0,09	43,0±0,07
7	Контроль	12,5		

Все суспензии и экстракты проявили большую активность, чем контроль. Штамм *S. carpaticus* RCAM04697 в сравнении с другими штаммами актиномицетов, *Anabaena constricta* IPPASB-2020, *Phormidium ramosum* IPPASB-2022 и циано-бактериальными сообществами является наиболее перспективным, так как проявляет максимальные антиоксидантные свойства.

Таким образом, обнаружены фитостимулирующие, противовирусные, фунгицидные и антиоксидантные свойства исследуемых штаммов актиномицетов.

Глава 8 посвящена изучению химического состава вторичных метаболитов исследуемых микроорганизмов.

Исследование трансформации экзогенных метаболитов (НОС) альго-цианобактериального комплекса на основе природного водоема (р. Ахтуба)

Хроматографический анализ трех исследованных проб (вода реки Ахтуба – проба №1, через 2 недели – проба №2, через 1 месяц экспозиции – проба №3, с добавлением среды BG) показал, что в культуральной среде водорослей и цианобактерий находятся насыщенные, ненасыщенные и ароматические углеводороды, карбоновые кислоты, фенольные и терпеновые соединения и их производные.

В пробе №1 (нативная речная вода р. Ахтубы) обнаружили 22 НОС, из которых 6 – неидентифицированных. Среди 22 соединений наибольшее процентное содержание от общего объема экстракта приходится на лимонен (1-метил-4-проп-1-ен-2-илциклогексен) (19,71%) и 2-гептеналь (12,84%), которые относятся к терпенам и терпеноидам. Известно, что выявленный в пробе гексанон, проявлял антимицробную активность в отношении 7

видов бактерий и одного микромицета (Vukovicetal., 2009). Фунгицидные и антимикробные свойства гексанола описаны в работах (Lanciottietal, 2003).

Содержание ароматических соединений - фталатов в пробе №1 составляло от 2,27 до 3,65%. Растения, в том числе водные, и водоросли в природных условиях синтезируют эти соединения, участвующие как фитотоксины в аллелопатических взаимодействиях (Хуанetal., 2006; Курашов и др., 2013). В пробе №1 также обнаружены алканы – додекан и тетрадекан.

Было бы трудно предположить, какое происхождение имеют эти 2 алкана в пробе №1, если бы не результаты обследования культуральной среды через две недели. В пробе №2 в микроэкосистеме уже обнаружили 13 соединений алканового ряда (включая упомянутые выше) с содержанием 0,48-7,27%, что однозначно связано с функционированием альго-бактериального сообщества.

В сравнении с пробой №1, компонентный состав алканов пробы №2 увеличился, что подтверждает выделение этих веществ развивающейся микрофлорой. В достаточно высоких концентрациях появились гексакозан и гептакозан (6,44% и 7,27%). Высокое содержание алканов было выявлено также в культуральной среде монокультуры цианобактерий *Oscillatoria neglecta* (до 11,14%) (Кирпенко и др, 2010). Таким образом, с высокой долей вероятности мы можем предположить, что и в пробе №1 алканы являются экзометаболитами водорослей.

Всего в пробе №2 обнаружили 32 НОС, из которых 4 – не идентифицированы. В наибольшей концентрации содержалась бензойная кислота (12,05%), которая отсутствовала в 1-й пробе. Бензойная кислота обладает антимикробными и фунгицидными свойствами (Eun-SooPark. etal., 2001; Drăceaetal., 2008). Во второй пробе присутствовали те же фталаты, что и в первой: диизобутилфталат, дибутилфталат и диэтилгексилфталат, только в меньших концентрациях. Обнаружено соединение камфора, которая известна как антибактериальный агент с активными антагонистическими свойствами (Chehreganietal., 2013). В пробе №2 в культуральной жидкости появились жирные кислоты. Их суммарная концентрация составила 1,52% от общего количества НОС. Появление в среде бензойной кислоты и жирных кислот свидетельствует о наличии активных аллелопатических взаимодействий между отдельными представителями микроэкосистемы. Особого внимания заслуживает обнаруженный в пробе №2 маноол, отличающийся значимыми биохимическими, фармакологическими, физиологическими и токсикологическими свойствами.

Проходящие в накопительной культуре процессы привели к увеличению числа обнаруживаемых в культуральной жидкости НОС. Об этом свидетельствуют результаты исследования третьей пробы, в которой обнаружили уже 53 соединения; 8 из которых остались неидентифицированными. Состав соединений 3-й пробы существенно отличался и от 1-й и от 2-й разнообразием компонентного состава, увеличением доли терпенов, насыщенных углеводов, спиртов, альдегидов, кетонов.

Наиболее сильные отличия по индексам сходства Жаккара и Сьёренсена наблюдались между исходной водой (проба №1) и культуральной жидкостью (проба №3) после месяца культивирования, что показывает, что состав присутствующих в воде НОС прежде всего определяется функционирующей микрофлорой.

Следует отметить, что в третьей пробе, по сравнению со второй, произошло значительное снижение как числа присутствующих в воде алканов (с 13 до 4), так и их относительного содержания (с 55,16 % до 30,48%). При этом наиболее высоко было процентное содержание октакозана, которое выросло с 5,06% до 23,78%. Абсолютная концентрация алканов снизилась с 0,128 мг/л до 0,076 мг/л. Высокое содержание в составе НОС в третьей пробе отмечено также для терпена (Е)-3,7-диметилгект-2-ена (7,14%).

В результате анализа альгофлоры культуральной среды обнаружено

превалирование в первой пробе цианобактерий вида *Gloeocapsa naegelina*, в третьей пробе - цианобактерий вида *Gloeocapsa sp.*, т.е. произошла замена доминантов. Причем эти доминанты отмечены практически в одинаковых количествах: *G. naegelina* – $6,8 \times 10^4$ кл/мл (исходная проба), *Gloeocapsa sp.* – $7,0 \times 10^4$ кл/мл (через месяц культивирования). В 3-й пробе обнаружены скопления зеленых водорослей *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus sp.* Присутствие в большой концентрации (23,78%) октакозана в 3-й пробе совпало с массовым развитием цианобактерий *Gloeocapsa sp.* в присутствии диатомовых водорослей рода *Navicula* и зеленых водорослей родов *Chlorella* и *Scenedesmus*.

Изучение бактериального населения в системе показало незначительное его количество (в пределах порядка 10^2 кл/мл) и большое разнообразие. Из физиологических групп были обнаружены сапротрофы, олиготрофы, амило- и сахаролитические, липолитические микроорганизмы. Среди них выделены микроскопические грибы, бактерии, в том числе, актиномицетоподобные формы. Актиномицеты часто встречаются в составе спутников цианобактерий (Батаева, Держинская, 2009). Учет микрофлоры показал общую тенденцию незначительного увеличения количества микроорганизмов в процессе культивирования системы.

В результате проведенных исследований обнаружен широкий спектр метаболитов водорослей, цианобактерий и их бактериальных спутников, которые отражали интенсивно протекающие между ними эколого-биохимические взаимодействия, в том числе и аллелопатические.

Исследование компонентного состава метаболитов техногенных водных циано-бактериальных сообществ и *Phormidium ramosum* В.-Peters. IPPASB-2022

Методом ТСХ проанализировали 18 элюирующих систем, из которых лучшее разделение и качество хроматографических зон достигнуто в системах хлороформ, этанол : уксусная кислота (1:1), бутанол, этанол : вода (1 : 9), бутанол : уксусная кислота : вода (4 : 1 : 5), этанол : вода (1:9), бутанол : уксусная кислота : вода (4 : 1 : 5). Хлороформ является одной из наилучших систем для разделения. Она показала разделение веществ во всех образцах. По литературным данным при разделении хлороформом обнаружено соединение - метиловый эфир кислотной формы витамина А (Katsui G. et al., 1964).

Методом ВЭТСХ в водно-спиртовом экстракте сообщества №2 обнаружен флавоноид кверцетин, обладающий высокой биологической активностью (рисунок 9).

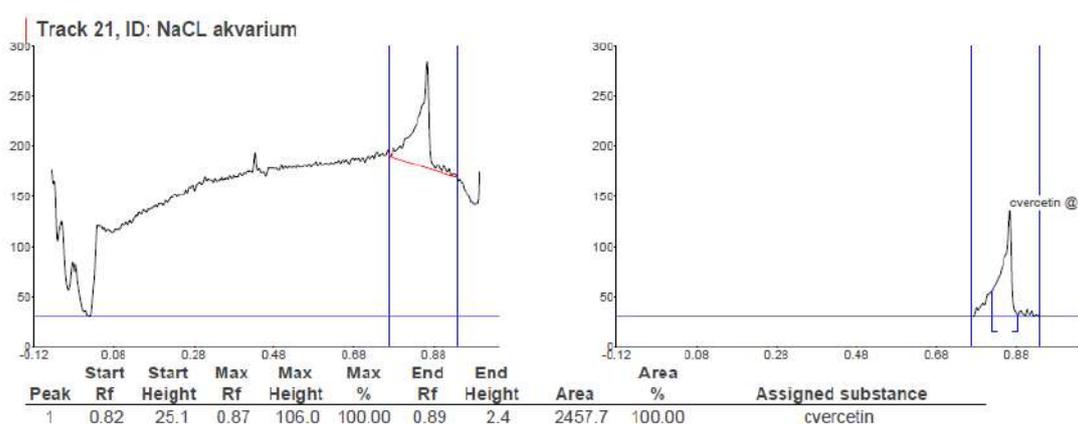


Рисунок 9 - Содержание кверцетина в водно-спиртовом экстракте циано-бактериального сообщества №2

Содержание его в экстракте накопительной культуры составило 22,78 мг при длине Rf равной 0,87.

Исследование водно-спиртовых экстрактов (50/50) циано-бактериального сообщества №2 и культуры *Phormidium ramosum* В.-Peters. IPPASB-2022 методом ВЭЖХ показало наличие органических кислот: изолимонной, молочной, аспарагиновой,

фумаровой. В водно-спиртовом экстракте циано-бактериального сообщества №2 обнаружено наибольшее количество аспарагиновой кислоты – 3,473 г/л. А в экстрактах культуры наибольшее количество изолимонной и молочной (0,363 г/л и 0,226 г/л) кислот. Изолимонная кислота является изомером лимонной кислоты, обладает высокой антиоксидантной активностью, также, как и фумаровая кислота (Triantis et al., 2002).

Исследование компонентного состава метаболитов почвенных культур цианобактерий

Все исследуемые циано-бактериальные сообщества в большей или меньшей степени содержали биологически активные вещества. Аскорбиновая кислота в наибольшем количестве содержалась в сообществе №2 - 1,74 %, глюкоза - в сообществе №21 - 0,85%, фосфор в сообществе №15 – 2,85%, азот в максимальном количестве обнаружен в сообществах №15 и №21 – 4,85%.

Методом ТСХ всего было проанализировано 18 элюирующих систем, из которых разделение показали 8: гексан, этилацетат, этанол:вода (1:9; 9:1; 1:1), хлороформ, хлороформ+уксусная кислота, этанол+гексан. При исследовании культуральной жидкости почвенных сообществ №2, №15, №21, культуры *Anabaena constricta* IPPASB-2020 максимальное разделение было выявлено с элюентами этанол-вода в разных концентрациях, гексан и хлороформ+уксусная кислота (5:2), с помощью которых хорошо выделяются фенольные соединения (Сиренко, 1975).

Методом ВЭТСХ в водно-спиртовых экстрактах сообществ №2 и №21 обнаружен флавоноид кверцетин, который обладает высокой биологической активностью.

Исследование водно-спиртовых экстрактов (50/50, 80/20, 20/80) сухой биомассы цианобактерий методом ВЭЖХ показало наличие органических кислот: аспарагиновой, муравьиной, пропионовой, фумаровой, изолимонной, молочной, уксусной, пировиноградной (таблица 7, рисунок 10).

Таблица 7 - Органические кислоты водно-спиртовых экстрактов почвенных цианобактерий

Тривиальное название	Название по ИЮПАК	Содержание, г/л							
		Сооб. №2 50/50	Сооб. №2 80/20	Сооб. №2 20/80	Сооб. №21 50/50	Сооб. № 21 80/20	Сооб. № 21 20/80	Anab. 80/20	Anab. 20/80
Аспарагиновая кислота	2-аминобутандиовая кислота	0,349	-	-	0,072	-	-	-	-
Муравьиная кислота	Метановая кислота	0,016	0,030	0,027	0,039	0,021	0,029	-	-
Пропионовая кислота	Пропановая кислота	0,766	-	-	-	-	-	-	-
Фумаровая кислота	Транс-бутендиовая кислота	0,001	-	-	-	-	-	-	-
Изолимонная кислота	1-гидрокси-1,2,3-пропантрикарбоновая кислота	-	0,496	-	-	0,507	-	0,439	-
Молочная кислота	2-гидроксипропановая кислота	-	-	0,257	-	-	0,235	-	0,207
Уксусная кислота	Этановая кислота	-	-	0,373	-	-	0,309	-	0,270
Пировиноградная кислота	2-оксопропановая кислота	-	0,089	0,090	-	0,080	0,083	-	-

Примечание: «-» - кислота не обнаружена

В экстрактах сообщества №2 обнаружено наибольшее количество пропионовой - 0,766 г/л и изолимонной кислот - 0,496 г/л. В экстрактах сообщества №21 и культуры *Anabaena constricta* IPPASB-2020 в максимальном количестве обнаружена изолимонная

кислота 0,507 г/л и 0,439 г/л, соответственно. Молочная и уксусная кислоты выявлены во всех вариантах концентраций водно-спиртовых экстрактов 20/80. Муравьиная, пропионовая, фумаровая, молочная кислоты обладает активными противомикробными свойствами (Рыжкова и др., 2018; Triantis et al., 2002; Lamb et al., 2006; Zinkevičienė et al., 2014).

Исследование НОС культуральной жидкости сообщества №21 проводили методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии. В метаболитах сообщества было определено 5 соединений: три из которых относятся к алкалоидам (резерпин, бупренорфин, йохимбин), одно - (пеонидин 3,5-диглюкозид) относится к флавоноидам, одно – пептидам (цикло (L-глутаминил-L-триптофил-L-фенилаланилглицил-L-лейцил-L-метионил)). В наибольшем количестве обнаружен резерпин – 0,23% и йохимбин - 0,19%. Пеонидин 3,5 – диглюкозид обладает антибиотической и фитонцидной активностью, и, следовательно, может оказывать влияние на подавление развития других микроорганизмов.

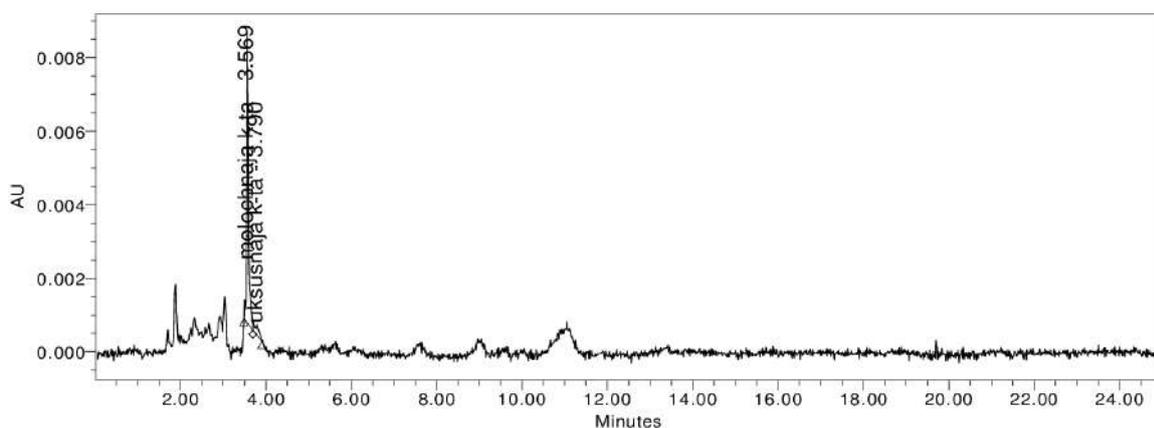


Рисунок 10 - Хроматограмма водно-спиртового экстракта (20/80) культуры *Anabaena constricta* IPPASB-2020

Исследование химического состава метаболитов штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883

Для установления основных групп веществ, проявляющих антагонистическую активность, в анализируемых экстрактах были проведены качественные реакции на обнаружение гликозидов, сапонинов, алкалоидов, флавоноидов исследуемых бактерий.

В составе метаболитов трех штаммов обнаружили флавоноиды, алкалоиды и гликозиды, сапонины отсутствовали. Наличие флавоноидов установлено во всех исследуемых образцах штаммов, за исключением гексанового экстракта. В работе Dai W. с соавторами выявлено, что флавоноиды способны проявлять ингибирующее действие на РНК-содержащие вирусы (Dai et al., 2019). Реакция на определение алкалоидов показала их присутствие в гексановых экстрактах всех штаммов, водно-спиртовых экстрактах (50:50; 80:20) и метанольном экстракте штамма *N. umidischolae* RCAM04882, в водно-спиртовых экстрактах (20:80) штаммов *N. umidischolae* RCAM04883 и *S. carpaticus* RCAM04697. Гликозиды выявлены во всех водно-спиртовых экстрактах, суспензии и метанольном экстракте штамма RCAM04882. Противовирусная активность гликозидов в отношении ДНК- и РНК-содержащих вирусов подтверждена в работе Reddy et al. (2020).

Методом ТСХ в водно-спиртовом экстракте 50:50 штамма *N. umidischolae* RCAM04882 обнаружили производные пиридина: γ -пиридинкарбоновая кислота, α -пиридинкарбоновая кислота. В водно-спиртовых экстрактах 50:50 штаммов *N. umidischolae* RCAM04882 и *N. umidischolae* RCAM04883 выявили аминокислоту – оксипролин. В суспензии штамма *S. carpaticus* RCAM04697 обнаружили антибиотик алтиомицин. С помощью системы хлороформ:метанол (95:5) в суспензии штаммов *N.*

umidischolae RCAM04882 и *N. umidischolae* RCAM04883 выделили антибиотик нарбомицин, в водно-спиртовом экстракте 20:80 штаммов *N. umidischolae* RCAM04882 идентифицировали антибиотик тилозин, в водно-спиртовом экстракте 50:50 штамма *N. umidischolae* RCAM04883 выделили антибиотик форомацидин С. Антибиотик эритромицин определили в суспензии штаммов *N. umidischolae* RCAM04882. С помощью элюирующей системы бензол:метанол (1:1) в экстрактах (водно-спиртовый штамма *N. umidischolae* RCAM04882, метанольный штамма *N. umidischolae* RCAM04883) выявили фенол – протокатеховый альдегид.

Методом ВЭЖХ изучен состав водно-спиртовых экстрактов штаммов *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 и *S. carpaticus* RCAM04697. Установлено, что среди 6 кислот органического происхождения в экстракте штамма *N. umidischolae* RCAM04882 преобладала уксусная кислота – 51,448 г/л (рисунок 11). Штамм *N. umidischolae* RCAM04883 синтезировал изолимонную, уксусную, фумаровую, молочную кислоты. В наибольшем количестве присутствовала изолимонная кислота 0,449 г/л. Штамм *S. carpaticus* RCAM04697 синтезировал кислоты: изолимонную, уксусную, фумаровую, молочную, пировиноградную, яблочную.

В наибольшем количестве обнаружена уксусная кислота, присутствие которой зафиксировано в трех вариантах водно-спиртовых экстрактов: водно-спиртовый экстракт (20:80) – 20,395 г/л; водно-спиртовый экстракт (80:20) – 19,443 г/л; водно-спиртовый экстракт (50:50) – 21,277 г/л. Исследования Zinn M.-K. с соавторами (2020) показали, что уксусная кислота в концентрациях 5%, 7,5% и 10% обладает противовирусным эффектом.

Методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии исследовали компонентный состав метаболитов штамма *S. carpaticus* RCAM04697, который обладает наиболее выраженными противовирусными, фунгицидными и ростостимулирующими свойствами, в связи с чем, был выбран для более детального исследования компонентного состава метаболитов.

ГХ/МС анализ показал наличие в составе вторичных метаболитов - спиртов, альдегидов, углеводов, эфиров, сульфатов и других групп низкомолекулярных органических соединений (НОС). При всех вариантах экстракции в составе НОС преобладали спирты и эфиры. Мажорными метаболитами в суспензии, в гексановом и водно-спиртовом экстракте были 3-бутенилпентиловый эфир и 2-метилпентан-2,4-диол (1,2-гександиол) (таблица 8). Содержание в суспензии составило 32,17% и 23,20%, в гексановом экстракте - 19,49% и 20,69% и в водно-спиртовом экстракте - 15,59% и 18,91% соответственно.

Соединение 1,2-гександиол обладает широким антимикробным спектром действия, нарушает цитоплазматическую мембрану и эффективен против грамположительных и грамотрицательных бактерий (Yogiara et al., 2015). Данное вещество характеризуется фунгицидными и антисептическими свойствами, его используют как консервант, сурфактант, эмульгатор (Lide et al., 1994).

В метанольном экстракте преобладал 5-(пиридин-4-ил)-1Н-пиразол-3-карбоксилат (57,8% от суммарного содержания НОС). Вещества, содержащие пиразол, в частности, этил-5-(пиридин-4-ил)-1Н-пиразол-3-карбоксилат характеризуются противовирусными, бактерицидными и противоопухолевыми свойствами (Karrouchi et al., 2018).

В метанольном экстракте обнаружены еще два НОС, которых нет в других экстрактах и суспензии: метилпальмитат (15,9%), который находит применение в качестве эмульгатора и стабилизатора эмульсий (Lewis et al., 1993); метиловый эфир 8-октадеценовой кислоты (26,2%), содержащийся в эфирных маслах цитрусовых.

Таблица 8. Состав экзогенных метаболитов суспензии и экстрактов штамма *S. carpaticus* RCAM04697

№ п/п	Вещество (в скобках IUPAC имя)/формула	LRI*	Гексановый экстракт		Водно-спирт. экстракт (50:50)		Метаноль- ный экстракт		Суспензия	
			%	С	%	С	%	С	%	С
1	2-метилпентан-2,4-диол (2-methylpentane-2,4-diol)/ C ₆ H ₁₄ O ₂	912	20,69	1,05	18,01	0,78	-	-	23,20	1,12
2	3-гексилгидропероксид (3-hydroperoxyhexane)/ C ₆ H ₁₄ O ₂	950	-	-	-	-	-	-	8,91	0,43
3	3-бутенилпентиловый эфир (1-but-3-enoхурpentane)/ C ₉ H ₁₈ O	967	19,49	0,99	15,59	0,68	-	-	32,17	1,55
4	2-этилгексанол (2-ethylhexan-1-ol)/ C ₈ H ₁₈ O	1056	7,43	0,38	-	-	-	-	-	-
5	5-оксогексил ацетат (5-Oхohexyl acetate)/C ₈ H ₁₄ O ₃	1088	-	-	-	-	-	-	7,67	0,37
6	1-додеканол (dodecan-1-ol)/ C ₁₂ H ₂₆ O	1481	4,69	0,24	10,25	0,45	-	-	3,64	0,17
8	2,6,10,14- тетраметилпентадекан [пристан] (2,6,10,14- tetramethylpentadecane)/ C ₁₉ H ₄₀	1728	3,57	0,18	-	-	-	-	-	-
10	октадекан (octadecane)/ C ₁₈ H ₃₈	1800	2,27	0,12	3,52	0,15	-	-	0,84	0,04
11	2,6,10,14- тетраметилгексадекан [фитан] (2,6,10,14- tetramethylhexadecane)/ C ₂₀ H ₄₂	1804	3,46	0,18	-	-	-	-	-	-
12	изопропилмиристат (propan-2-yl tetradecanoate)/ C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1822	7,15	0,36	10,27	0,45	-	-	5,32	0,26
13	метилпальмитат (methyl hexadecanoate)/ C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1929	-	-	-	-	15,9	0,48	-	-
14	8-октадеценал ((E)-octadec-8-enal)/ C ₁₈ H ₃₄ O	2011	2,51	0,13	-	-	-	-	0,84	0,04
15	метилвый эфир 8- октадеценовой кислоты (methyl octadec-8-enoate)/ C ₁₉ H ₃₆ O ₂	2078	-	-	-	-	26,2	0,79	-	-
16	тетракозан (tetracosane)/ C ₂₄ H ₅₀	2400	7,55	0,38	-	-	-	-	-	-
17	этил 5-(пиридин-4-ил) - 1Н- пиразол-3-карбоксилат (ethyl 3-pyridin-4-yl-1H-pyrazole-5- carboxylate)/ C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂	2409	-	-	-	-	57,8	1,74	-	-
18	бензол, 1,1'-[2-метил-2 - (фенилтио)циклопропилиден] бис- ((1-methyl-2,2- diphenylcyclopropyl)sulfanylbe nzene)/ C ₂₂ H ₂₀ S	2567	-	-	18,75	0,82	-	-	-	-
19	2-метилпентокозан (2- methylpentacosane)/ C ₂₆ H ₅₄	2583	5,53	0,28	-	-	-	-	-	-
Всего:			100,0	5,1	100,0	4,4	100,0	4,8	100,0	3,0

Примечание: LRI* – линейный индекс удерживания; % - доля соединения среди всех НОС; С – концентрация соединения в экстракте, мкг/г сухого вещества

1-Додеканол, выявленный в гексановом (4,69%), водно-спиртовом (10,25%) экстрактах, суспензии (3,64%) и пристан, выявленный в гексановом экстракте (3,57%) входят в состав феромонов, половых аттрактантов и сурфактантов для контроля

численности насекомых-вредителей (Никольский, 1966).

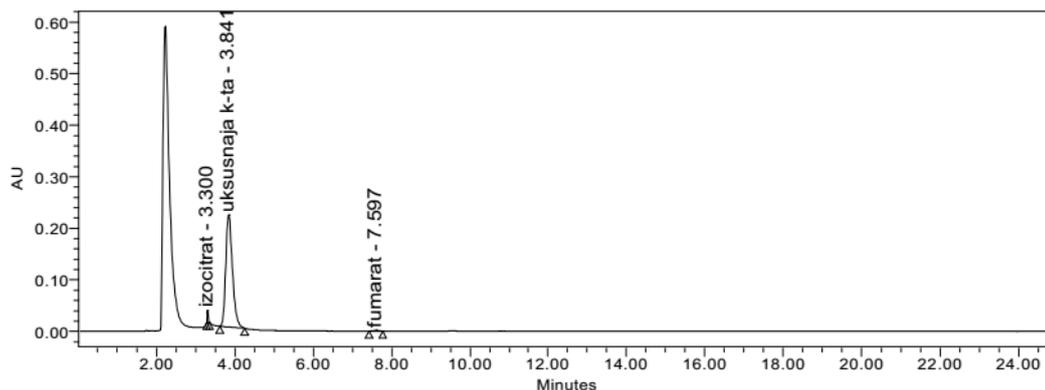


Рисунок 11 - Хроматограмма водно-спиртового экстракта (20:80) штамма *N. umidischolae* RCAM04882

Таким образом, исследуемые цианобактерии и образуемые ими сообщества и штаммы актиномицетов активно синтезируют соединения с высокой биологической активностью и могут быть использованы в качестве основы для создания биопрепаратов, удобрений, биологических средств защиты растений.

Глава 9 посвящена эффективности применения цианобактерий в биодegradации компонентов высокоминерализованных загрязненных вод.

Исследование возможности биодegradации компонентов пищевых засоленных сточных вод при интродукции цианобактерий

Одной из актуальных и сложных задач является поиск технологий очистки отходов с высокими концентрациями солей от органических веществ. Цианобактерии активно участвуют в активизации очистки сточных вод (Дзержинская, 1993; Саинов, 1993; Райская, 2003). Минеральные компоненты могут утилизироваться путем аккумуляции в гликокаликсе цианобактерий, постепенно превращая внеклеточную слизь в плотные структуры (Герасименко, 2003). Для исследования взяты водные циано-бактериальных сообщества №1 и №2, полученных из озера Мраморное, развивающихся в концентрации NaCl 5-10%, и культура *Phormidium ramosum* IPPASB-2022. В эксперименте использовали сточную воду после посола рыбы с 25% концентрацией солей.

Через месяц экспозиции в пробах с цианобактериями стало наблюдаться заметное обесцвечивание воды. Так как процессы деструкции органических веществ в агрессивной соленой среде замедляются, то системы культивировали длительное время – 5 месяцев, по прошествии которого проводили оценку критериев: цвет, мутность, запах, его интенсивность (таблица 9).

В результате исследования химических показателей контроля, а также сточной воды с внесенными циано-бактериальными культурами, активная реакция среды (pH) изменилась на один порядок в щелочную сторону с 5 до 6. Устойчивость пенообразования также заметно уменьшилась в сточной воде с цианобактериями, в сравнении с контролем, что говорит о биодegradации органических веществ. Сухой остаток, характеризующий взвешенные вещества, максимально уменьшился с внесенным циано-бактериальным сообществом №2, составив 75,7 гр/л, в отличие от контрольной сточной воды (98,5 гр/л).

Максимальный эффект использования циано-бактериальных сообществ для биодegradации компонентов сточной воды после посола рыбы достигнут в варианте с сообществом №2 с эдификаторами *Oscillatoria deflexa* и *Phormidium sp.*, в присутствии *Oscillatoria animalis* и *Oscillatoria amphibian*.

Таблица 9 - Химические и физические показатели при внесении цианобактерий в сточную воду рыбного производства

Вариант опыта	pH	Цвет	Мутность (светопропуск.), %	Пенистость	Сухой остаток (гр/л)
Сточная вода	5,0	Светло-коричневый	35,1	Больше 30 мин (большое кол-во орг. в.)	98,5
Сточная вода с внесенным ЦБС № 1	6,2	Прозрачный с желтым оттенком	79,1	12-13 мин (среднее кол-во орг. в.)	86,0
Сточная вода с внесенным ЦБС № 2	6,4	Прозрачный с желтым оттенком	85,5	10-12 мин (среднее кол-во орг. в.)	75,7
Сточная вода с культурой <i>Phormidium ramosum</i>	6,3	Прозрачный с желтым оттенком	83,2	10-12 мин (среднее кол-во орг. в.)	81,2

Физиологические группы микроорганизмов - спутников в составе циано-бактериальных сообществ

Максимальная численность микроорганизмов при исследовании двух сообществ отмечена на среде РА и составила $1,5 \cdot 10^5$ КОЕ/г в первом и $1,2 \cdot 10^5$ КОЕ/г во втором сообществе, соответственно. Грибы не обнаружены.

На среде МПА ОМЧ составило: в сообществе №1 - $0,3 \cdot 10^5$ КОЕ/г, в сообществе №2 - $0,4 \cdot 10^5$ КОЕ/г (рисунок 12).

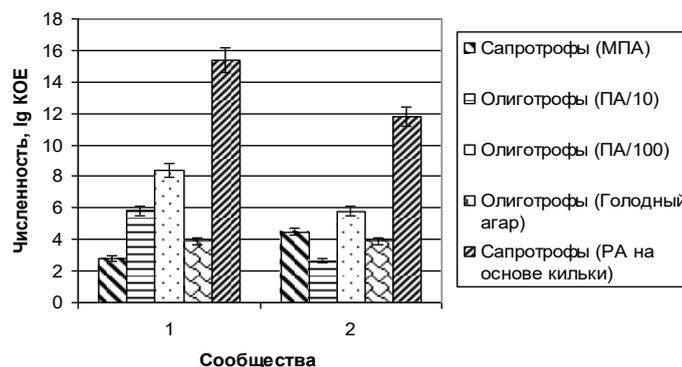


Рисунок 12 - Численность гетеротрофных микроорганизмов - спутников циано-бактериальных сообществ

Анализируя количество аэробных и анаэробных форм, развивающихся на среде МПА отмечается значительное преобладание анаэробных форм в сообществах №1 и №2.

Микробиологический состав сапротрофов по своей морфологии однообразен, представляя собой грамположительные неспоровые палочки и грамположительные кокки, но различен по культуральным признакам. Наибольшее количество представлено группой аммонифицирующих микроорганизмов, активно деградирующих белковые соединения. Поэтому при внесении циано-бактериальных сообществ в высокоминерализованную сточную воду после посола рыбы, цианобактерии, находясь в ассоциациях с гетеротрофной микрофлорой, в экстремальных условиях высокой солености, активно участвуют в деструкции белковых и других органических соединений. Именно микрофлора спутников обеспечивает важнейшие звенья процесса очистки – регенерацию кислорода и деструкцию труднорастворимых токсических веществ (Держинская, 1993).

Протеолитическая и липолитическая активности выделенных дрожжевых микроорганизмов со среды МПА/100, р. *Bacillus* со среды РА и р. *Aeromicrobium* с

модифицированной среды BG_N-11 с органическим субстратом оказались в несколько раз ниже активностей исследуемых циано-бактериальных сообществ.

Очистке сточных вод в экстремальных условиях способствует не только деятельность спутников – гетеротрофов цианобактерий и их сообществ, аккумуляция минеральных веществ в гликокаликсе, но и выделение в окружающую среду метаболитов, обладающих высокой биологической активностью.

В **главе 10** описано получение и применение экспериментальных образцов на основе цианобактерий и штаммов актиномицетов

Разработка технологии получения и применения экспериментальных образцов на основе *Anabaena constricta* IPPASB-2020

Сырую и сухую биомассу цианобактерий для приготовления суспензии получали следующим образом. Цианобактерии *Anabaena constricta* IPPASB-2020 культивировали в вихревом биореакторе при температуре 28°C в течение 5 суток при 60 об/мин с люминесцентной лампой (4000 кельвин). Посевной материал вносили в количестве 20 % от ее общего объема. За это время происходило максимальное наращивание биомассы - 47 мг/м²/ч сухого вещества. Затем биомассу высушивали в термостате при температуре 37°C до постоянного веса и измельчали.

Разработанная технология заключается в том, что семена и растения томата, перца, хлопчатника перед высадкой в грунт обрабатывают суспензией цианобактерий *Anabaena constricta* IPPASB-2020 с концентрацией 5 гр. сухой биомассы цианобактерий на 1 л воды в течение 1 часа и обеспечивают пролив под корень в фазу 2-4 настоящего листа и в фазу цветения и бутонизации растений. Культура цианобактерий хранится на среде BG-11. Результатом от использования цианобактерий является увеличение всхожести семян, повышение энергии роста, повышение урожайности растений, защита от фитопатогенов, оздоровление растений, обусловленное антиоксидантным эффектом цианобактерий *Anabaena constricta* IPPASB-2020 в условиях аридного климата.

Получение экспериментальных образцов препаратов на основе штаммов *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883, *S. carpaticus* RCAM04697

Для оценки технологических возможностей штаммов RCAM04882, RCAM04883, RCAM04697 проводили анализ роста на картофельной, крахмально-казеиновой средах и среде Гаузе №2, оценивая концентрацию клеток в суспензии и оптическую плотность при длине волны 340 нм (Астафьева и др., 2015). Оказалось, что именно на третьи сутки культивирования установлено наибольшее значение оптической плотности во всех анализируемых средах.

Таким образом, максимальная продуктивность штамма *S. carpaticus* RCAM04697 ($8,6 \cdot 10^9$ КОЕ/мл) обнаружена на картофельной среде. Продуктивность штаммов *N. umidischolae* RCAM04882 и *N. umidischolae* RCAM04883 также выше на картофельной среде ($2,53 \cdot 10^9$ КОЕ/мл и $1,74 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, соответственно). Титр клеток на среде Гаузе №2 оказался самым низким из исследуемых сред и составил для штамма *S. carpaticus* RCAM04697 – $0,094 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Оптимальную температуру для синтеза биомассы штаммов, равную плюс 28°C, определяли по максимальной удельной скорости роста. Процесс культивирования контролировали отбором промежуточных и заключительных проб, подсчетом концентрации клеток и определением оптической плотности.

Картофельная среда явилась наиболее эффективной для культивирования штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, а также *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883, так как при культивировании в течение 72 часов при 28°C титр клеток составил 10^9 КОЕ/мл, что соответствует концентрации клеток в коммерческих биопрепаратах. По результатам проведенных исследований предложили 1 рецептуру питательной среды (картофельная среда) для глубинного культивирования продуцентов в вихревом биореакторе (БИОК-022) для наработки биомассы и максимального получения

метаболитов штаммов *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883, *S. carpaticus* RCAM04697. Для приготовления картофельной среды 200 г мелко нарезанного картофеля заливали 1 литром водопроводной воды и кипятили 30 минут, фильтровали через ватно-марлевые фильтры, стерилизовали при 1,5 атмосферах.

Анализ антагонистической активности штаммов RCAM04882, RCAM04883, RCAM04697 по отношению друг к другу методом штриха показал ее отсутствие.

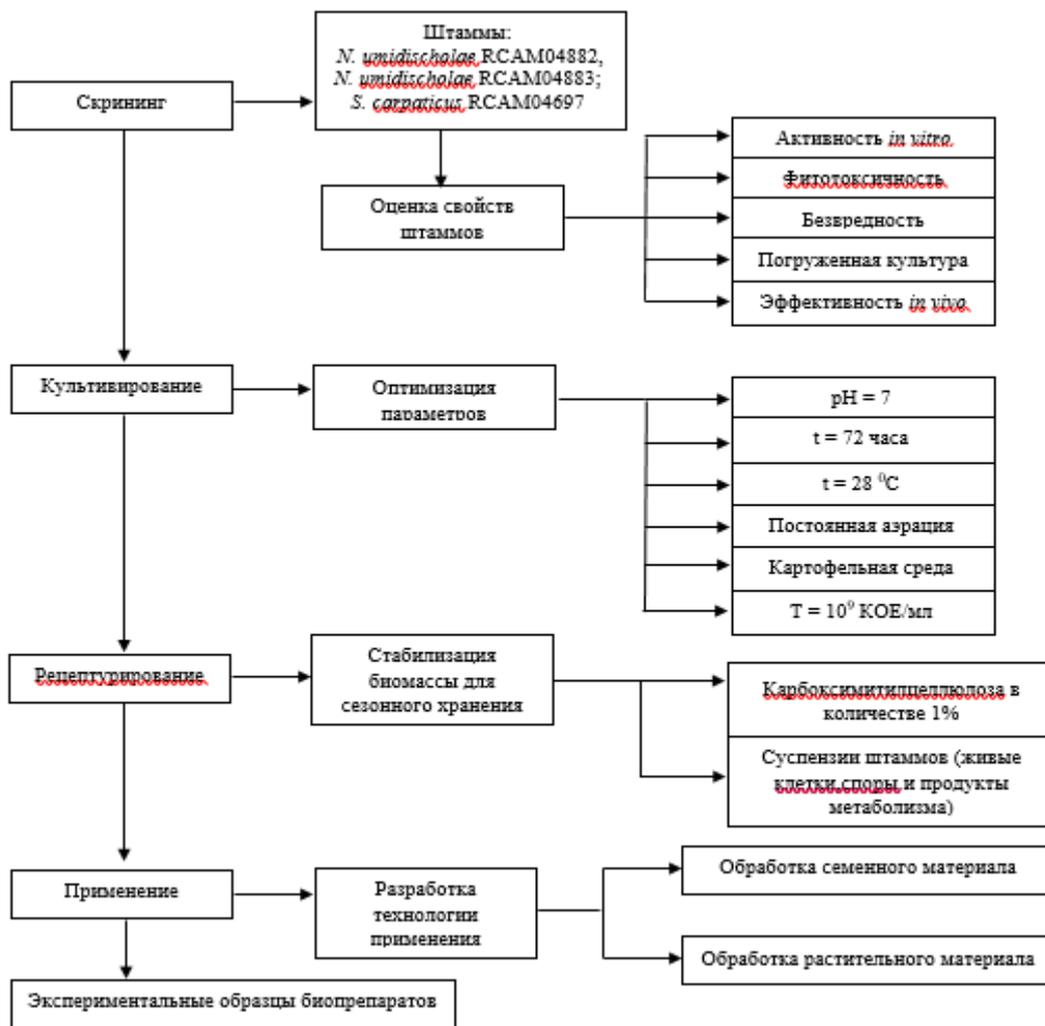


Рисунок 13 - Технологическая схема получения экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 и *S. carpaticus* RCAM04697.

Комплексную схему изготовления экспериментальных образцов биопрепаратов на основе предлагаемых продуцентов можно представить следующим образом: штаммы *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 и *S. carpaticus* RCAM04697 (каждый по отдельности) выращиваются в вихревом биореакторе (БИОК-022) на картофельной среде (pH = 7,0) при температуре плюс 28°C в течение 72 часов при равномерном перемешивании и постоянной аэрации. Далее в полученные суспензии (живые клетки, споры и продукты метаболизма) с титром клеток 10⁹ КОЕ/мл в качестве загустителя добавляется карбоксиметилцеллюлоза в количестве 1%. Данные растворы являются концентрированными экспериментальными образцами биопрепаратов (рисунок 13).

Схема получения экспериментальных образцов на основе штаммов позволяет получать бактериальные препараты в любой микробиологической лаборатории при минимальных производственных затратах. Среда для выращивания не содержит

дефицитных субстратов, что способствует удешевлению и доступности производства.

Предложенную технологию использовали при разработке инструкции по применению экспериментальных образцов средств защиты растений на основе штаммов *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 и *S. carpaticus* RCAM04697, обладающих фитостимулирующими, противовирусными, фунгицидными и антиоксидантными свойствами. По данной технологии изготовили экспериментальные образцы биопрепаратов для полевых испытаний.

В главе 11 описаны исследования по изучению безвредности цианобактерий и актиномицетов.

Изучение безопасности штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 и культуры *Anabaena constricta* IPPASB-2020

В опыте на дафниях суспензии штаммов актиномицетов и культура цианобактерий оказались нетоксичными. Изучена патогенность (вирулентность, токсичность, токсигенность, диссеминация) для теплокровных животных штамма *S. carpaticus* RCAM04697. При изучении вирулентности при внутрижелудочном введении летальная доза (ЛД₅₀) для крыс и мышей превышала 10⁹ клеток, при внутрибрюшинном введении превышала 10⁸ клеток. Рост штамма *S. carpaticus* RCAM04697 в высевах из органов животных при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении не обнаружили, поэтому штамм *S. carpaticus* RCAM04697 не способен к диссеминации. Токсигенность изучали на беспородных белых мышах при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении фильтратов 3-х и 7-ми суточных культуральных жидкостей. На протяжении всего срока наблюдения (5 суток) клинических симптомов заболевания и гибели животных не было. Таким образом, по показателям вирулентности, диссеминации, токсичности и токсигенности штамм *S. carpaticus* RCAM04697 не является патогенным для теплокровных животных.

Глава 12 посвящена полевым экспериментам по проверке эффективности применения экспериментальных образцов биопрепаратов.

Влияние цианобактерий на рост и развитие растений в полевых опытах

В полевом опыте хлопчатник (*Gossypium hirsutum*) сорта АС 1 обрабатывали различными стимуляторами роста: почвенным циано-бактериальным сообществом №2 с преобладанием родов *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Gloeocapsa*, *Chroococcus*, лабораторной культурой бактерий *Bacillus megaterium*, минеральными удобрениями, эпином. Двукратный пролив растений хлопка-сырца оказался эффективным только при обработке циано-бактериальным сообществом, и позволил получить больший прирост урожайности. Максимальную урожайность получили при обработке хлопчатника бактериями *Bacillus megaterium* при однократной бактеризации, минимальную - при двукратной обработке минеральными удобрениями.

Для оценки качества полученного сырья, проводили измерение длины волокна хлопка. Результаты измерений представлены на рисунке 14.

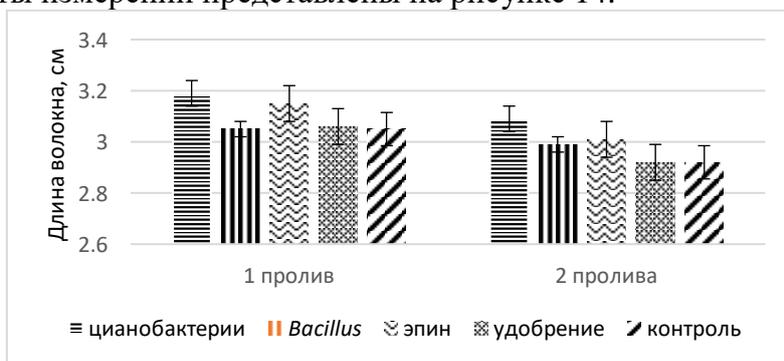


Рисунок 14 Длина волокна хлопчатника, выращенного с использованием различных стимуляторов роста, см

Хлопчатник, обработанный циано-бактериальным сообществом, обеспечил лучшее качество - наибольшую длину волокна. Так, при однократном проливе длина волокна на 0,14 см больше, при двукратном – на 0,17 см больше, чем в контроле. Семена, обработанные циано-бактериальным сообществом, показали 100% всхожесть, что на 15% выше контроля. Двойная обработка циано-бактериальным сообществом стимулировала увеличение цветков и бутонов на 18,5%, количество листьев на 13,9%, массу листьев на 42,4%, площадь листа на 9,7%, длину корня на 4,1%, в сравнении с контролем.

Циано-бактериальное сообщество проявило активные фитостимулирующие свойства, повысив урожайность на 9,6% и 12,8% в сравнении с контролем и на 12,7% и 25,6% в сравнении с обработкой минеральным удобрением.

Отмечено ускоренное созревание плодов перца сорта «Калифорнийское чудо» у обработанных суспензией *Anabaena constricta* IPPASB-2020 растений на 5-8 дней по сравнению с контролем. Масса одного плода перца и количество плодов при обработке суспензией цианобактерий превышает контрольную массу на 19,2% и 70,0%, соответственно. Урожайность перца при обработке суспензией цианобактерий *Anabaena constricta* IPPASB-2020 составила 0,272 кг/куст, что превышало контроль на 90,2%. После обработки растений суспензией цианобактерий ни у одного растения не обнаружили симптомов фузариоза, что свидетельствует о высокой фунгицидной активности образца цианобактерий. Урожайность томатов сорта «Дар Заволжья» с бактеризацией цианобактериями составила 1,14 кг/куст, что на 0,83 кг/куст больше, чем в контроле (0,31 кг/куст) (таблица 10).

Таблица 10 - Урожайность томатов при внекорневой подкормке суспензией цианобактерий *Anabaena constricta* IPPASB-2020

Вариант опыта	Урожайность, кг/куст	Количество урожайных кустов (%)
Контроль	0,31±11,12	31,73±2,54
Обработка цианобактериями	1,14±0,29	38,82±3,85

При обработке суспензией цианобактерий растения с симптомами фузариоза отсутствовали, в то время как в контроле составили 12%, что подтверждает высокую фунгицидную активность культуры цианобактерий. Исследование в ризосфере микромицетов рода *Fusarium* показало их наличие в варианте опыта с обработкой растений цианобактериями в количестве 10² КОЕ/г, что меньше контроля на три порядка. Колонии грибов рода *Fusarium* отличали от других родов микроскопически.

Полевые опыты по влиянию цианобактерий на растения, показали, что культура *Anabaena constricta* IPPASB-2020 обладает активными фитостимулирующими и защитными свойствами, также, как и циано-бактериальные сообщества.

Влияние штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 на рост и развитие растений в полевых опытах

Экспериментальные образцы биопрепаратов на основе трех штаммов RCAM04882, RCAM04883 и RCAM04697 использовали для обработки растений в полевом опыте на томатах сорта Ажур F1. В результате мониторинга фитовирусов на испытательном участке, установлены три возбудителя вирусной инфекции - ВОМ, ВМТо, ВБТ. Интенсивность проявления данных вирусов в контрольных вариантах, носила эпифитотийный характер. В вариантах с обработкой экспериментальными образцами биопрепаратов на основе штаммов актиномицетов *N. umidischolae* RCAM04883 и *S. carpaticus* RCAM04697 очаги вирусной инфекции отсутствовали, что подтверждает наличие противовирусного эффекта (таблица 11).

Фитостимулирующее влияние экспериментальных образцов биопрепаратов на

основе штаммов актиномицетов на растения оценивали по увеличению урожайности томатов. Максимальную урожайность томатов Ажур F1 выявили при обработках экспериментальными образцами на основе штаммов – *N. umidischolae* RCAM04882 (54,6 кг), *N. umidischolae* RCAM04883 (49,1 кг) и *S. carpaticus* RCAM04697 (51,6 кг), в сравнении с контролем 1 (без обработок) (19,8 кг) и контролем 2 (эталон) (32,2 кг).

Таблица 11 - Изучение влияния обработок на возбудителей болезней томата Ажур F1 методом ИХА на иммунострипах

Вариант	Распространенность возбудителей болезней, %						
	альтер нариоз	фитофтороз	черная бакт. пятнистость	ВОМ	ВМТо	ВБТ	столбур
Контроль 1(без обработок)	19	8	3	50	10	5	5
Контроль 2(эталон)	15	5	2	40	28	6	4
Экспериментальный образец биопрепарата на основе штамма <i>N. umidischolae</i> RCAM04882	2	3	4	5	6	7	8
Экспериментальный образец биопрепарата на основе штамма <i>S. carpaticus</i> RCAM04697	0	0	0	0	0	0	0
Экспериментальный образец биопрепарата на основе штамма <i>N. umidischolae</i> RCAM04883	0	0	0	0	0	0	0

Исследование фитостимулирующей и противовирусной активностей экспериментального образца биопрепарата на основе штамма *S. carpaticus* RCAM04697 проводили в полевом опыте на картофеле (*Solanum tuberosum*) сорта Ред Скарлетт. Первая обработка заключалась в проливе под корень и показала, что в экспериментальной группе показатель заболеваний растений вирусной природы составил всего 30%, тогда как в контрольной группе достиг 65%. Соответственно, показатель эффективности данного экспериментального образца достиг 53,9%. После второй обработки (опрыскивания) и третьей обработки (пролива под корневую систему) распространенность заболеваний вирусного характера в контроле возросла и составила 81,2% (рисунок 15).

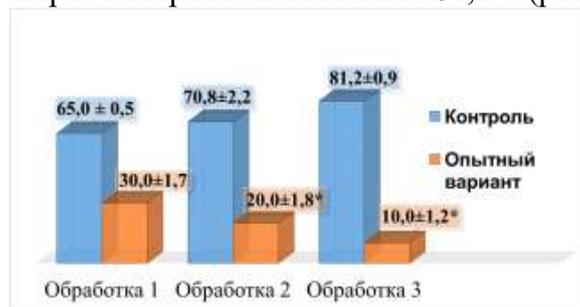


Рисунок 15 - Влияние противовирусной активности экспериментального образца биопрепарата на основе штамма *S. carpaticus* RCAM04697 на распространение вирусной инфекции картофеля в полевом опыте, %

В контроле показатель заболеваний клубней картофеля возрос до трех фитопатогенов, к которым относятся: ВСЛК (7,3%), УВК (53,4%) и ХВК (13,5%). При этом следует отметить, что в образцах, которые обрабатывали суспензией штамма RCAM04697, другие разновидности данных патогенов отсутствовали, а показатель пораженности УВК соответствовал всего 2,7%. Именно поэтому можно говорить о том, что вирусные патогенные микроорганизмы сдерживаются благодаря воздействию противовирусной активности экспериментального образца биопрепарата на основе штамма *S. carpaticus* RCAM04697 (Григорян и др., 2019).

Проведенные исследования показали значительное снижение концентрации вируса в растениях под воздействием штаммов бактерий, замедление развития вирус-

индуцированных симптомов, уменьшение негативного влияния вирусной инфекции и, как следствие, улучшение физиологических показателей картофеля и томатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время накоплен большой объем знаний по цианобактериям и актиномицетам, как микроорганизмам с высокими адаптационными свойствами. В работе изучили видовой и групповой состав циано-бактериальных сообществ природных и техногенно преобразованных экосистем на территории Астраханского региона. Показали, что цианобактерии выполняют роль структурообразователей в микробных комплексах почв за счет устойчивых к экстремальным факторам нитчатых и гетероцистных форм. В исследовании провели идентификацию цианобактерий и актиномицетов, выделенных из водных и почвенных экосистем Астраханской области. Выполнили полногеномное секвенирование штамма *S. carpaticus* RCAM04697, последовательность которого задепонировали в базе данных NCBI GenBank. Изучили взаимосвязь физико-химических факторов среды и видового состава цианобактерий в накопительных культурах, выявили особенности организации сообществ в различных экосистемах, исследовали трансформацию и состав метаболитов водных фототрофных комплексов в накопительных культурах. Изучили свойства цианобактерий и актиномицетов, значимые для сельскохозяйственной и экологической биотехнологии. Выявили состав вторичных метаболитов цианобактерий и актиномицетов, представляющие собой ценные соединения для различных областей биотехнологии. Итогом работы стала разработка экспериментальных образцов биопрепаратов на основе безопасных штаммов актиномицетов и цианобактерий с целью стимуляции роста и развития растений, повышения урожайности и защиты от фитопатогенных вирусов и грибов. В ходе работы выполнен комплекс научно-практических задач: помимо создания экспериментальных образцов, разработаны и утверждены технологическая схема получения и инструкция по применению экспериментальных образцов; оформлены акты производственных испытаний и акты внедрений, получены три патента на изобретение. Проведенные исследования дают научную и практическую платформу увеличения устойчивости почвенных экосистем, повышения биоразнообразия в экстремальных аридных условиях окружающей среды.

ВЫВОДЫ

1. Нитчатые цианобактерии родов *Phormidium* и *Oscillatoria* (семейство *Oscillatoriaceae*) отличаются значительным видовым разнообразием и являются основой циано-бактериальных комплексов в почвенных (*Phormidium*) и водных (*Oscillatoria*) природных и техногенных экосистемах аридной зоны. Сообщества являются многокомпонентными со спутниками: водорослями, микромицетами, бактериями, в том числе актиномицетами. Анализ видового состава цианобактерий техногенных водоёмов показал, что род *Oscillatoria* развивается в самом широком диапазоне гидрохимических факторов при концентрации сероводорода от 0,0003 г/л до 0,04 г/л, минерализации от 2,0 г/л до 383,7 г/л, pH от 5,5 до 9,0. По сравнению с природными экстремальными обитаниями, в техногенных водоемах не выявлено четко стратифицированных матов, цианобактерии в них образуют хлопья, пленки и обрастания.
2. Представители отдела Cyanobacteria составляют 71,3 % от общего числа изученных почвенных водорослей. Выявлено 64 вида цианобактерий. К числу наиболее распространенных относились виды рода *Phormidium*. Наибольшее число видов водорослей обнаружено в аллювиальных луговых и бурых полупустынных почвах. В солончаках и в бурых почвах присутствует максимальное количество цианобактерий 80,0%, по сравнению с другими водорослями. Анализ экологических особенностей показал доминирование Р – жизненной формы.

3. Из техногенных водоемов выделены цианобактерии и их сообщества, проявляющие деструкционные свойства по отношению к загрязняющим веществам засоленных пищевых сточных вод и обладающие антибактериальной (по отношению к *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*), протеолитической, липолитической, антиоксидантной активностью. Из почвенных экосистем выделены циано-бактериальные сообщества на основе родов *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium* и культура цианобактерий *Anabaena constricta* IPPASB-2020 с фитостимулирующими, фунгицидными, колонизирующими, антиоксидантными свойствами и устойчивостью к пестицидам. Водно-спиртовой экстракт цианобактерий *Anabaena constricta* IPPASB-2020 ингибировал рост всех исследуемых фитопатогенных микромицетов рода *Fusarium*.
4. Циано-бактериальные сообщества проявляют резистентные свойства по отношению к содержанию фосфатов от 0,04 г/л до 10 г/л и общему содержанию солей от 10 г/л до 400 г/л. При этом, под влиянием экстремальных значений реакции среды, температуры и общего содержания солей структура техногенных сообществ не изменяется, в то же время, под влиянием концентраций фосфора, происходит изменение морфологии сообществ. Наиболее устойчивыми к исследуемым факторам являются представители рода *Phormidium*. Выделенные сообщества образуют в накопительных культурах на разбавленной питательной средой воде водоема стратифицированные маты в течение 3-4 месяцев культивирования. Сообщества, выделенные из техногенного водоема с общим содержанием солей 383,7 г/л в накопительных культурах маты не образуют.
5. В результате трансформации накопительной культуры во время экспозиции обнаружен широкий спектр метаболитов водорослей, цианобактерий и их бактериальных спутников, которые отражали интенсивно протекающие между ними эколого-биохимические взаимодействия, в том числе и аллелопатические. Происходящие в накопительной культуре процессы привели к увеличению числа обнаруживаемых в культуральной жидкости НОС. Через месяц экспозиции в пробе обнаружено 53 соединения в сравнении с первой пробой речной воды (22 соединения), отличающейся разнообразием компонентного состава, увеличением доли терпенов, насыщенных углеводов, спиртов, альдегидов, кетонов.
6. В экосистемах аридной зоны почвенные циано-бактериальные сообщества синтезируют комплекс соединений и метаболитов: терпеноиды, флавоноиды (пеонидин 3,5-диглюкозид; кверцетин), алкалоиды (резерпин, бупренорфин, йохимбин), аспарагиновую, муравьиную, пропионовую, фумаровую, изолимонную, молочную, уксусную, пировиноградную кислоты, кверцетин, пептид (цикло (L-глутаминил-L-триптофил-L-фенилаланилглицил-L-лейцил-L-метионил) и другие вещества, обладающие полезными антибактериальными, фитонцидными, фунгицидными свойствами.
7. Из засоленных почв выделен 21 штамм актиномицетов, из которых отобраны три штамма с фитостимулирующими свойствами, идентифицированные как *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883. Суспензии штаммов RCAM04697, RCAM04882, RCAM04883 безопасны и обладают антагонистической активностью по отношению к вирусным и грибным патогенам растений, что выражается в сдерживании развития вируса огуречной мозаики, вируса мозаики томата, вируса бронзовости томата, Y-вируса картофеля, X-вируса картофеля, вируса скручивания листьев картофеля и подавлении роста фитопатогенных микромицетов родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Pythium*. Наибольшую антиоксидантную активность проявили суспензия (88,8%) и водно-спиртовой экстракт (76,0%) штамма RCAM04697.
8. Штаммы *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 синтезируют флавоноиды, алкалоиды и гликозиды, органические кислоты (изолимонная, уксусная, фумаровая, молочная, яблочная, лимонная, пировиноградная),

антибиотики (нарбомицин, тилозин, форомацидин С, эритромицин), фенол – протокатеховый альдегид. В составе вторичных метаболитов штамма *S. carpaticus* RCAM04697 обнаружены низкомолекулярные органические соединения следующих групп: спиртов, альдегидов, углеводов, эфиров, сульфатов и других функциональных групп. Обнаруженные в составе метаболитов соединения 1,2-гександиол, 1-додеканол, этил 5-(пиридин-4-ил) - 1Н-пиразол-3-карбоксилат характеризуются противовирусными, противомикробными и противоопухолевыми свойствами.

9. Разработаны технологическая схема получения и инструкция по применению экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 на томате и картофеле. Разработаны технологии получения и применения экспериментальных образцов на основе *Anabaena constricta* IPPASB-2020. По показателям вирулентности, диссеминации, токсичности и токсигенности штамм *S. carpaticus* RCAM04697 не является патогенным для теплокровных животных. На основании результатов проведенных испытаний штаммы могут быть рекомендованы, как продуценты ценных вторичных метаболитов, обладающих фитостимулирующими, противовирусными, антиоксидантными, колонизирующими, фунгицидными свойствами, и могут быть использованы в качестве основы биопрепаратов для агроэкосистем.

10. Экспериментальные образцы на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 могут быть использованы в стимуляции роста и развития томата, защиты от болезней, так как обеспечивали достоверную прибавку урожайности относительно контроля (без обработок) до 175,8% и проявляли противовирусные свойства в отношении возбудителей вирусов огуречной мозаики, мозаики томата и бронзовости томата. Обработка экспериментальным образцом биопрепарата на основе штамма *S. carpaticus* RCAM04697 оказывает стимулирующее действие на рост и развитие картофеля, позволяя получить достоверную прибавку урожайности относительно контроля (без обработок) на 35,4%, при этом зараженность типичными для картофеля видами фитовирусов не обнаружена, а пораженность Y-вирусом картофеля составляет 2,7%.

11. Циано-бактериальные сообщества и культура *Anabaena constricta* IPPASB-2020 могут быть использованы для повышения урожайности, качества и защиты растений от грибных болезней. Урожайность томатов с бактеризацией цианобактериями *Anabaena constricta* IPPASB-2020 составила 1,14 кг/куст, что на 0,83 кг/куст больше, чем в контроле. При обработке суспензией цианобактерий растения с симптомами фузариоза отсутствовали, в то время как в контроле составили 12%, что подтверждает высокую фунгицидную активность культуры цианобактерий.

Рекомендации по использованию результатов работы. Полученная в ходе секвенирования полногеномная последовательность штамма *S. carpaticus* RCAM04697 может быть использована для аннотации геномов бактерий рода *Streptomyces*. Разработанные экспериментальные образцы препаратов на основе штаммов актиномицетов и культуры цианобактерий с фитостимулирующими, противовирусными, фунгицидными, антиоксидантными, колонизирующими, деструкционными свойствами, являющиеся продуцентами ценных вторичных метаболитов, рекомендуются в качестве основы биопрепаратов для агро и техногенных экосистем.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
Всего по теме диссертации опубликовано 172 научные работы. Основные работы приведены ниже.

Статьи в реферируемых журналах

1. **Батаева, Ю.В.** Особенности микроорганизмов техногенных водоемов Нижней Волги // Экол. Сист. и Приб. – 2009. - №12. - С. 32-34. ИФ=0,360.
2. **Батаева, Ю.В.** Биоразнообразии цианобактерий в почвах Астраханской области / **Ю.В. Батаева, И.С. Держинская, Мвале Камуквамба** // Юг России: Экол., Разв. - 2010. - № 4. - С. 76-78. ИФ=0,423. Цит 8.
3. **Батаева, Ю.В.** Исследование ростстимулирующей и фунгицидной активности циано-бактериальных ообществ из экосистем Астраханской области // Ест. науки. - 2011. - № 3 (36). – С. 81-86. ИФ=0,197. Цит. 4.
4. Чан, М. К. Исследование фунгицидной активности бактерий рода *Bacillus*, выделенных из клубеньков *Vigna cylindrica* / Чан Минь Куан, **Ю.В. Батаева**, М.А. Егоров // Труды Кубан. Гос. Агр. Универ. - 2011. № 12 (33), С. 93-96. ИФ=0,379.
5. **Батаева, Ю.В.** Скрининг циано-бактериальных сообществ из экосистем Нижнего Поволжья, обладающих ростстимулирующими свойствами / **Ю.В. Батаева, И.С. Держинская, Чан Минь Куан, Мвале Камуквамба** // Вестн. Алт. Гос. Агр. Универ. – 2012. - № 2 (88). - С. 46-49. ИФ=0,241. Цит. 3.
6. Чан, М. К. Ростстимулирующий эффект штамма *Bacillus megaterium* в вегетационном опыте / Чан Минь Куан, М.А. Егоров, **Ю.В. Батаева** // Вестн. Алт. Гос. Агр. Универ. – 2012. - № 3 (89). - С. 46-49. ИФ=0,241. Цит. 3.
7. Шадманова, Т.Х. Микробиологические показатели почв территорий г. Астрахань / Т.Х. Шадманова, Ю.С. Чуйков, М.А. Егоров, **Ю.В. Батаева** // Ест. науки. - 2014. - №1 (46). - С. 33-40. ИФ=0,197. Цит. 1.
8. **Батаева, Ю.В.** Хромато-масс-спектрометрическое исследование экзогенных метаболитов альго-бактериальных сообществ в накопительной культуре / **Ю.В. Батаева, Е.А. Курашов, Ю.В. Крылова** // Вода: Хим. и Экол. - 2014. - №9 (75). - С. 59-68. ИФ=0,349. Цит. 6.
9. **Батаева, Ю.В.** Исследование колонизации ризопланы растений семейства Пасленовые (*Solanaceae*) цианобактериями / **Ю.В. Батаева, М.Д. Фомина** // Вестн. Алт. Гос. Агр. Универ. - 2014. - №11 (121). – С. 77-82. ИФ=0,241. Цит. 1.
10. **Батаева, Ю.В.** Оценка некоторых фенологических показателей рода *Gossypium hirsutum (malvaceae)* при воздействии биостимуляторов разной природы / **Ю.В. Батаева, Д.К. Магзанова, О.В. Астафьева, М.Д. Фомина** // Вестн. Алт. Гос. Агр. Универ. - 2015. - №1 (123). - С. 70-76. ИФ=0,241. Цит. 2.
11. Астафьева, О.В. Исследование антибактериальных свойств стимулятора роста растений «Эпин-экстра» с целью получения экологически чистой продукции / О.В. Астафьева, Д.Д. Вилкова, **Ю.В. Батаева, Д.К. Магзанова, М.А. Егоров** // Вестн. Алт. Гос. Агр. Универ. - 2015. - №8 (130). - С. 81-85. ИФ=0,241. Цит. 7.
12. **Батаева, Ю.В.** Исследование процесса интенсификации очистки сточных вод рыбоперерабатывающей промышленности циано-бактериальными консорциумами / **Ю.В. Батаева, М.С. Саткалиева** // Экол. Сист. и приоб. - 2015. - №8 - С. 10-16. ИФ=0,360. Цит. 1.
13. **Bataeva, Y.V.** Composition of phototrophs in different soil types of Astrakhan oblast / **Y.V. Bataeva, I.S. Dzerzhinskaya, L.V. Yakovleva** // Euras. Soil Sci. – 2017. – Vol. 50, N 8. – P. 943-951. ИФ=2,810, WoS, Scopus, Q2. CrossRef. Цит. 3.
14. Astafyeva, O. Chemical composition and antibacterial properties of *Achillea micrantha* / O. Astafyeva, L. Sukhenko, M. Egorov, **Y. Bataeva**, A. Baimukhambetova, E. Kurashov, J. Krylova // Ind. J. Pharm. Sci. - 2018. - Vol. 80, N 3. - P. 434-441. Scopus, Q2, IF=1,035.
15. **Bataeva, Yu.V.** Study of antioxidant activity and composition of cyanobacteria metabolites by TLC, HPTLC, and HPLC for the search of environmentally safe cleaning agents / **Yu.V. Bataeva, M.S. Satkalieva, S.V. Antonova, M.A. Sinetova, A.Yu. Kozlova, O.V. Astafyeva and**

A.S. Baimuhambetova // Rus. J. of Gen. Chem. – 2018. - Vol. 88. – №. 13. - P 2898-2902. ИФ=0,716, Web of Science, Scopus, Q3. CrossRef. Цит. 1.

16. Григорян, Л.Н. Оценка биологической эффективности бактерий *Streptomyces sp.*, выделенных из засоленных почв аридной зоны, в отношении возбудителей вирусных болезней картофеля / Л.Н. Григорян, **Ю.В. Батаева**, В.А. Шляхов, Е.Д. Андреева, М.А. Егоров // Совр. наука: Акт. Пробл. Теор. и Практ. Серия «Естественные и технические науки». – 2018. - № 12. - С. 14-22. РИНЦ, ИФ=0,164. Цит. 1.

17. Григорян, Л.Н. Микробиологический состав засоленных почв аридных территорий / Л.Н. Григорян, **Ю.В. Батаева**, Л.В. Яковлева, В.А. Шляхов // Совр. наука: Акт. Пробл. Теор. и Практ. Серия «Ест. и Техн. науки». - 2018. - № 12. - С. 6-14. РИНЦ, ИФ=0,164. Цит. 5.

18. Григорян, Л.Н. Фитотоксичность и инсектоакарицидная активность актиномицетов, выделенных из засоленных почв аридной территории / Л.Н. Григорян, **Ю.В. Батаева**, В.А. Шляхов, Д.К. Магзанова, А.С. Баймухамбетова // Юг России: Экол., Разв. - 2020. – Т. 15. - № 2. - С. 103-112. РИНЦ, ИФ=0,423, Scopus, Q4. Цит. 1.

19. Grigoryan, L.N. Study of the component structure of the metabolites of bacteria *Nocardiosis umidischolae* in the search for eco-friendly plant protection agents / L.N. Grigoryan, **Y.V. Bataeva**, E.D. Andreeva, D.Kh. Zakar'yaeva, Z.O. Turaeva // Rus. J. of Gen. Chem. – 2020. - № 90 (13). - P. 2531–2541. ИФ=0,716, Web of Science, Scopus, Q3. CrossRef. Цит. 4.

20. Григорян, Л.Н. Влияние штамма бактерий *Streptomyces carpaticus* RCAM 04697 на фитостимуляцию, фитовирусы томата и насекомых-вредителей в лабораторных условиях / Л.Н. Григорян, **Ю.В. Батаева**, В.А. Шляхов // Ест. и Техн. науки. - 2020. - № 6 (144). - С. 58-61. РИНЦ. ИФ=0,194. Цит. 2.

21. Григорян, Л.Н. Биологическое обоснование применения суспензии штамма *Streptomyces carpaticus* RCAM 04697 для защиты томата от насекомых – вредителей и фитопатогенов в открытом грунте / Л.Н. Григорян, **Ю.В. Батаева**, В.А. Шляхов // Ест. и Техн. науки. - 2020. - № 6 (144). - С. 54-57. РИНЦ. ИФ=0,194. Цит. 1.

22. Prokopchuk, T.M. Evaluation of the mutagenic and antimutagenic potentials of plant raw materials for functional and food purposes / T.M. Prokopchuk, E.I. Kondratenko, **U.V. Bataeva** // IOP Conf. Series: Earth and Envir. Science. 839. – 2021. - 042029. P. 1-6. Scopus.

23. **Батаева, Ю.В.** Изучение метаболитов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 для создания экологически безопасных средств защиты растений / **Ю.В. Батаева**, Л.Н. Григорян, Е.А. Курашов, Ю.В. Крылова, Е.В. Федорова, Е.Я. Явид, В.В. Ходонович, Л.В. Яковлева // Теор. и Прикл. Экол. - 2021. С. №. 3. P. 172-178. РИНЦ, ИФ=0,679, Web of Science, Scopus, Q2. CrossRef. Цит. 1.

Авторские свидетельства и патенты

24. База данных РФ № 2013620692, от 10 июня 2013г. Цианобактерии техногенных водоемов Каспийского бассейна / **Ю.В. Батаева**, И.С. Держинская, М.А. Егоров – Правообладатели: ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет».

25. Пат. № 2634387 С2 Российская Федерация, МПК А01N 63/02. Способ стимуляции роста и развития растений, повышения урожайности и защиты от фитопатогенных грибов в Аридной зоне / **Ю.В. Батаева**, И.С. Держинская; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет». - № 2015143855; заявл. 19.04.2017; опубл. 26.10.2017; Бюл. № 11.

26. Пат. на полезную модель № 189062, Российская Федерация, МПК С02F 1/00. Устройство для доочистки сточных вод пищевой промышленности / **Ю.В. Батаева**, М.С. Саткалиева, С.В. Золотокопова; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет». - № 2018121163; заявл. 07.06.2018; опубл. 07.05.2019; Бюл. № 13.

27. Пат. №2709308 С1 Российская Федерация, МПК С02F 1/50 Альгицид для подавления развития цианобактерий и зеленых водорослей на основе метаболитов – аллелохимиков водных растений / Е.А. Курашов, Ю.В. Крылова, **Ю.В. Батаева**, А.Г. Русанов, Л.Т. Сухенко; заявитель и патентообладатель ООО «МЕТА-АКВА». - № 2019104959; заявл. 21.02.2019; опубл. 17.12.2019; Бюл. № 35.
28. Пат. № 2695157 Российская Федерация, МПК С12N1/20, А01N63/02, С12R1/465. Штамм *Streptomyces carpaticus* для защиты от насекомых-вредителей, грибных, вирусных болезней и стимуляции роста томатов / Л.Н. Григорян, **Ю.В. Батаева**, В.А. Шляхов, И.С. Держинская; заявитель и патентообладатель Л.Н. Григорян, **Ю.В. Батаева**, В.А. Шляхов. – № 2018113688; заявл. 13.04.2018; опубл. 22.07.2019; Бюл. № 21.
29. База данных РФ № 2020620186, от 30.01.2020. Влияние штаммов актиномицетов на вирусные болезни овощебахчевых культур и картофеля в аридной зоне Северного Прикаспия / Л.Н. Григорян, **Ю.В. Батаева** – Правообладатели: Л.Н. Григорян, **Ю.В. Батаева**.
30. База данных РФ № 2022620218, от 24.01.2022. Компонентный состав метаболитов бактерий рода *Streptomyces* с полифункциональными свойствами, выделенных из почв Астраханской области / Л.Н. Григорян, **Ю.В. Батаева** - Правообладатели: ООО «Фитобиогарант».

Публикации в других изданиях

31. **Батаева, Ю.В.** Влияние экстремальных гидрохимических условий на видовой состав цианобактерий в водоемах Нижней Волги / **Ю.В. Батаева**, И.С. Держинская // Электронный журнал "Исследовано в России". 2006. – 168. - С. 1566-1573. <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2006/168.pdf>
32. **Батаева, Ю.В.** Микробиологический пейзаж высокоминерализованного техногенного озера на территории Баскунчакской котловины / **Ю.В. Батаева**, И.С. Держинская, Р.Г. Габитов // Вестник АГТУ. Сер. Экология. – 2006. - № 3. – С. 183-187. Цит. 2.
33. Держинская, И.С. Перспектива использования цианобактерий в биоремедиации территорий нефтегазового комплекса / И.С. Держинская, О.Б. Сопрунова, **Ю.В. Батаева**, Е.В. Петровичева, Г.Ю. Райская // Защ. Окр. Ср. в Нефтегаз. Компл. Научно-технический журнал. - 2008. - № 5. - С.51-54. РИНЦ, ИФ=221. Цит. 2.
34. **Батаева, Ю.В.** Галофильные микроорганизмы для очистки высокоминерализованных сточных вод / **Батаева Ю.В.**, Габитов Р.Г. // Экология и Пром. Росс. - 2010. - № 10. - С. 29-31. ИФ=0,575.
35. **Батаева, Ю.В.** Биологическое разнообразие цианобактерий и водорослей почв Астраханской области / **Ю.В. Батаева**, И.С. Держинская, Мвале Камуквамба // Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения профессора Эмилии Адриановны Штиной. – г. Киров / 2010. - С. 46-49.
36. Kurashov, E.A. Low-molecular weight metabolites in *Spirodela polyrhiza* (L.) scheiden from northwest Russia in the middle of the growing season / E.A. Kurashov, J.V. Krylova, G.G. Mitrukova, D.G. Aleshina, **Y.V. Bataeva**, O.V. Astafyeva // PONTE Int. Sci. Res. J. - 2016. - Vol. 72. – №. 10. - P. 10-22.
37. **Батаева, Ю.В.** Роль цианобактерий в техногенных экосистемах юга России / **Ю.В. Батаева**, И.С. Держинская // VI Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», материалы VI международного конгресса, часть 1. – г. Москва / ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2011. - С. 156-157.
38. **Bataeva, Y.** Growth-Promoting and Fungicide Characteristics of Cyanobacterial Communities from Ecosystems of the Astrakhan / **Y. Bataeva**, I. Dzerzhinskaya, M. Egorov, D.

Magzanova, O. Astafyeva // J. of Agricul. and Food Techn. (JAFT). - 2012. - 2(12). - P. 184-187.

39. **Bataeva, Y.** Study of growthpromoting and fungicidal properties of cyano-bacterial communities of Astrakhan region // V съезд микробиологов Узбекистана. - Ташкент, Узбекистан / 2012. - С. 3.

40. **Батаева, Ю.В.** Влияние цианобактерий на бактеризацию семян при определении всхожести томатов // The Materials of III International Scientific Conference on Innovation Problems of Modern Biology for Young Scientists devoted to 90 anniversary of outstanding ophthalmologist, akad. Zarifa Aliyeva. – Baku / 2013. – P. 63 — 66.

41. **Батаева, Ю.В.** Влияние цианобактерий на рост и развитие растений в условиях аридного климата // Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге. Сборник материалов докладов III Международной научной конференции. - Ярославль / Институт биологии внутренних вод им. Папанина. Филигрань, 2014. - С. 122-123.

42. **Батаева, Ю.В.** Исследование химического состава экзогенных метаболитов циано-бактериальных сообществ в накопительной культуре / **Ю.В. Батаева**, Е.А. Курашов, Ю.В. Крылова // Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов: Всероссийский симпозиум с международным участием. – Москва / МГУ имени М.В. Ломоносова. МАКС Пресс, 2014. - С. 31.

43. **Bataeva, Y.** Investigation of properties of fito-stimulate cyano-bacterial communities obtained from Lower Volga // Life Chem. Res.: Biological Systems, Apple Academic Press Inc. Available. - 2015. - P. 125-130.

44. **Bataeva, Y.V.** Investigation of specific microorganisms in the salt lakes of Southern Russia / **Y.V. Bataeva**, I.S. Dzerzhinskaya, O.V. Astafyeva, M.C. Satkalieva, L.V. Yakovleva, E.I. Kondratenko, D.K. Magzanova, A.S. Vaimuhambetova // African J. of microb. Res. - 2015. - Vol.9. - (38). - P. 2051-2056. Цит. 2.

45. Курашов, Е.А. Изучение состава низкомолекулярных метаболитов цианобактерий и микроводорослей в накопительной культуре и оценка перспектив их применения в борьбе с "цветением" воды / Е.А. Курашов, **Ю.В. Батаева**, Ю.В. Крылова, М.С. Саткалиева // В сборнике: Цианопрокариоты/цианобактерии: систематика, экология, распространение. Материалы докладов II Международной научной школы-конференции. – Сыктывкар / 2019. - С. 175-180.

46. **Батаева, Ю. В.** Особенности развития томатов при инокуляции циано-бактериальными сообществами / **Ю.В. Батаева**, Л.Н. Григорян, Л.В. Яковлева, Д.К. Магзанова, А.С. Баймухамбетова, Е.Д. Андреева // АгроЭкоИнфо. - 2020. - № 2 (40). http://agroecoinfo.narod.ru/journal/STATYI/2020/2/st_219.pdf.

47. Григорян, Л.Н. Оценка эффективности применения почвенных актинобактерий на томатах в аридной зоне / Л.Н. Григорян, **Ю.В. Батаева** // Пробл. Агрех. и экол. – 2021. - № 1. - С. 27-31. РИНЦ, ИФ=0,303. Цит. 1.

Методические и учебные пособия и глава в книге

48. **Батаева, Ю.В.** Методические указания по люминесцентной микроскопии для студентов специальности 012400 «Микробиология», [Текст]: методические указания / Сост.: Ю.В. Батаева – Астрахань: Астраханский гостехуниверситет», 2004. – 36с.

49. **Батаева, Ю.В.** Методы выделения и исследования цианобактерий / Методическое пособие // Сост.: Ю.В. Батаева – Астрахань: Астраханский гостехуниверситет», 2008. – 71 с.

50. Микроорганизмы в процессах деструкции и биоремедиации Курапов А.А., Сопрунова О.Б., Куликова И.Ю., Еремеева С.В., **Батаева Ю.В.**, Миталев В.И. Проблемные лекции: учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению 020200 "Биология" и специальностям 020803

"Биоэкология" / Астраханский гос. технический ун-т, НИИ проблем Каспийского моря. Астрахань, 2009. (Гриф УМО по классическому университетскому образованию). Цит. 5. 51. **Батаева, Ю.В.** Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Частная микробиология и систематика микроорганизмов» для студентов специальности 020209.65 «Микробиология» и направления 020200.62 «Биология», [Текст]: методические указания / Сост.: Ю.В. Батаева – Астрахань: Астраханский гостехуниверситет», 2009. – 104 с.

52. **Батаева, Ю.В.** Отбор проб на микробиологические исследования из природной и производственной сред для самостоятельной работы студентов. Учебно-методическое пособие // Сост.: Батаева Ю.В., Держинская И.С. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2015. – 111 с.

53. **Батаева Ю.В.** Противомикробная активность и определение чувствительности микроорганизмов: учебно-методическое пособие / АГУ им. В.Н. Татищева; Сост.: Ю.В. Батаева, Д.Д. Вилкова, Л.Н. Григорян, Т.М. Прокопчук, Е.И. Кондратенко, С.С Астафьева. – Астрахань: Изд.: Сорокин Р.В., 2022. – 104 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГКМ – Астраханское газоконденсатное месторождение

ЕСР - ёмкость сезонного регулирования

ЗПО - земельные поля орошения

АЦКК - Астраханский целлюлозно-картонный комбинат

НОС – низкомолекулярные органические соединения

ЦБС – циано-бактериальное сообщество

Кл/г – клеток бактерий в 1 грамме циано-бактериального сообщества

КОЕ/г–колониеобразующих единиц микроорганизмов в 1 грамме

РА – рыбный агар

ДЗИ – диаметр зоны ингибирования

МПА – мясопептонный агар

МПБ – мясопептонный бульон

ОМЧ – общее микробное число

ТСХ – тонкослойная хроматография

ВЭТСХ - высокоэффективная тонкослойная хроматография

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ/МС – газовая хроматография и масспектрометрия

УВК - У-вирус картофеля (*Potato Ypotyvirus, PVY*)

ХВК - Х-вирус картофеля (*Potato X potyvirus, PVX*)

ВСЛК - вирус скручивания листьев картофеля (*Potato leafroll virus, PLRV*)

ВМТо - вирус мозаики томата (*Tomato mosaic virus, ToMV*)

ВОМ - вирус мозаики огурца (*Cucumber Mosaic Virus, CMV*)

ВБТ - вирус бронзовости томата (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*)