

**Министерство образования и науки Российской Федерации**  
**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение**  
**высшего образования**  
**«Астраханский государственный университет»**

*На правах рукописи*



**Григорян Лилит Норайровна**

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**  
**АКТИНОМИЦЕТОВ – ПРОДУЦЕНТОВ**  
**АНТИМИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ**

Специальности:

1.5.11. – Микробиология  
1.5.6. – Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Астрахань - 2021

Работа выполнена на кафедре биотехнологии, зоологии и аквакультуры Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный университет», г. Астрахань

**Научный руководитель:**

**Батаева Юлия Викторовна**, кандидат биологических наук, доцент, [1.5.11. - Микробиология], Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный университет», г. Астрахань, кафедра биотехнологии, зоологии и аквакультуры, доцент кафедры

**Официальные оппоненты:**

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

**Широких Ирина Геннадьевна**, доктор биологических наук, [1.5.19. – Почвоведение, 1.5.11. – Микробиология], Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого», г. Киров, лаборатория биотехнологии растений и микроорганизмов, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» Федерального агентства научных организаций, Санкт-Петербург, г. Пушкин

Защита диссертации состоится «10» сентября 2021 г. в 13:00 ч на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 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 «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.**

**Ученый секретарь**

диссертационного совета Д 350.002.01  
кандидат биологических наук

**Фурсова Надежда Константиновна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** В микробном пейзаже экстремальных почвенных экосистем Астраханской области одними из наиболее адаптированных и распространенных микроорганизмов являются актиномицеты, в особенности, стрептомицеты (Звягинцев и др., 2001; Зенова и др., 2007, 2011, 2016; Оборотов, 2007; Ашихмина и др., 2012; Семенов и др., 2016, 2019; Григорян и др., 2018, 2021; Бегматов и др., 2020; Стома и др., 2020). Актиномицеты продуцируют в окружающую среду комплекс вторичных экзометаболитов различного состава с алифатическими, карбоциклическими и гетероциклическими, азотистыми, кислород- и серусодержащими соединениями (Терехова и др., 2007; Анисимова, 2008).

Актиномицеты оказывают влияние на другие организмы – вирусы, бактерии, грибы, растения, животные, которые находятся во взаимодействии друг с другом и окружающей средой (Мерзаева и др., 2006; Широких и др., 2008, 2011, 2020; Назарова и др., 2019; Родовиков и др., 2020; Хазиев и др., 2020; Singh et al., 2020; Vityaz et al., 2020). Поэтому актиномицеты являются основой современных биопрепаратов, например, направленных на защиту и стимуляцию роста растений: Фитоверм, Вертимек, Мекар, Биокилл, Оберон Рапид (Долженко, 2009; Castillo et al., 2006; Machavariani et al., 2014; Amaresan et al., 2018).

Агроценозы аридной зоны, испытывают еще больший стресс, чем природные засоленные почвы, вследствие применения химических удобрений и средств защиты растений, что сопровождается обеднением состава биоценоза почвы, выпадением из нее ценных видов, возникновением болезней и деградацией почвенных экосистем (Добровольский и др., 2012). Особую опасность в агроценозах представляют болезни растений, вызываемые вирусами мозаики томата (ВМТо) (*Tomato mosaic virus, ToMV*) и мозаики огурца (ВОМ) (*Cucumber Mosaic Virus, CMV*) (Цыпленков и др., 1988; Сорока и др., 2009; Бойкова и др., 2019).

Актуальной является проблема поиска новых штаммов актиномицетов, продуцирующих биологически активные вещества с широким спектром экологического влияния, обладающих фитостимулирующими, противовирусными, фунгицидными, антиоксидантными свойствами, которые могут быть основой новых биопрепаратов (Григорян и др., 2019, 2020, 2021; Manucharova et al., 2016).

**Степень разработанности темы исследования.** Изучено значительное количество штаммов актиномицетов, обладающих антибиотическими, антимикробными, гербицидными, инсектицидными свойствами (Громовых, 2005; Бурцева и др., 2014; Широких и др., 2017, 2021; Григорян и др., 2021; Oskay, 2009; Newitt et al., 2019; Pylro et al., 2019). Исследована сложная организация генетической детерминации вторичных метаболитов актиномицетов, включающая не только гены, кодирующие и регулирующие синтез биологически активных веществ, но и сцепленные с ними гены, придающие устойчивость к собственным антибиотикам (Булгакова и др., 2010; Bentley et al., 2002; Asano, 2006; Grünwald, 2006; Efimenko et al., 2016; Manucharova et al., 2017, 2020, 2021). Являясь антагонистами фитопатогенов

за счет синтеза широкого спектра вторичных метаболитов, актиномицеты способны значительно стимулировать развитие растений, защищать от болезней и проявлять антиоксидантные свойства (Синева и др., 2017, 2019; Григорян и др., 2018, 2020).

**Цель исследования** – поиск новых штаммов актиномицетов с фитостимулирующими свойствами – антагонистов вирусных и грибных патогенов и обоснование возможности их применения в качестве продуцентов антимикробных препаратов.

**Задачи исследования:**

1. Провести скрининг актиномицетов засоленных почвенных экосистем Астраханской области для выбора наиболее активных штаммов – фитостимуляторов и изучить их культурально-морфологические, биохимические свойства, таксономическую принадлежность.
2. Исследовать активность выбранных штаммов в отношении вирусных и грибных патогенов растений.
3. Проверить выбранные штаммы на безвредность по отношению к живым организмам и выявить их антиоксидантную активность.
4. Выявить и охарактеризовать основные физико-химические и биологические свойства активных метаболитов отобранных штаммов, ответственных за антагонистическую активность.
5. Подобрать биотехнологические параметры для культивирования отобранных штаммов с целью повышения выхода биомассы.
6. Получить экспериментальные образцы препаратов на основе отобранных штаммов и их метаболитов и испытать эффективность в полевых условиях.

**Научная новизна.** Впервые из почвенных экосистем Астраханской области с различной соленостью выделены штаммы бактерий *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883, оказывающие ингибирующее действие на вирусы растений Y-вирус картофеля (YBK) (*Potato Y potyvirus, PVY*), X-вирус картофеля (ХВК) (*Potato X potyvirus, PVX*), вирус скручивания листьев картофеля (ВСЛК) (*Potato leafroll virus, PLRV*), ВОМ, ВМТо и вирус бронзовости томата (ББТ) (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*), а также обладающие высокими фитостимулирующими, фунгицидными и антиоксидантными свойствами, что делает их перспективными продуцентами для создания биопрепаратов. Данные штаммы способны синтезировать антимикробные соединения, компонентный состав которых определен впервые. Установлено, что исследуемые бактерии синтезируют: флавоноиды, алкалоиды, гликозиды, органические кислоты (изолимонная, уксусная, фумаровая, молочная, яблочная, лимонная, пировиноградная), антибиотики (нарбдомицин, 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 защиты агроэкосистем. Часть исследований биологической

активности штамма *S. carpaticus* RCAM04697 защищена Патентом РФ 2695157. Выявлено влияние штаммов актиномицетов на вирусные болезни овощебахчевых культур и картофеля в аридной зоне Северного Прикаспия, которое зарегистрировано в Базе данных РФ 2020620186.

**Теоретическая и практическая значимость.** Отобраны активные штаммы *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 с фитостимулирующими, противовирусными, фунгицидными и антиоксидантными свойствами и 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).

Получен патент РФ на изобретение «Штамм *Streptomyces carpaticus* для защиты от насекомых-вредителей, грибных, вирусных болезней и стимуляции роста томатов» (№ 2695157 от 22.07.2019г.; авторы: Л.Н. Григорян, Ю.В. Батаева, В.А. Шляхов, И.С. Держинская; уровень внедрения - федеральный). Получено свидетельство на Базу данных РФ «Влияние штаммов актиномицетов на вирусные болезни овощебахчевых культур и картофеля в аридной зоне Северного Прикаспия» (№ 2020620186 от 30.01.2020; авторы: Григорян Л.Н., Батаева Ю.В.; уровень внедрения – федеральный).

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

Результаты двух независимых полевых испытаний экспериментальных образцов биопрепаратов на основе 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 оформлены актами производственных испытаний, утвержденными руководителем и сотрудниками указанной организации (уровень внедрения - межучрежденческий).

Результаты исследований внедрены в Астраханском государственном университете в научную деятельность (использованы в научных отчетах по грантам) и в учебный процесс (при преподавании дисциплин «Промышленные микроорганизмы», «Промышленная биотехнология», «Экология микроорганизмов», «Сельскохозяйственная биотехнология» студентам бакалаврских и магистерских программ направлений 06.03.01 и 06.04.01 «Биология») (Справка о внедрении результатов диссертации в учебный процесс от 31.05.2021г.; уровень внедрения - учрежденческий).

Результаты выполненного исследования могут быть использованы для разработки природных биопрепаратов на основе актиномицетов, являющихся источниками ценных в практическом отношении органических соединений

**Методология и методы исследования.** Диссертационное исследование спланировано согласно поставленной цели и задачам. Предметом исследования явился поиск новых природных штаммов-антагонистов вирусных и грибных патогенов, обладающих фитостимулирующими и антиоксидантными свойствами.

При выполнении работы использовали микробиологические, биотехнологические, биохимические, токсикологические, физико-химические, биологические и статистические методы исследований.

**Штаммы микроорганизмов.** Материалами исследований явились штаммы актиномицетов. В опытах использовали двухсуточные и трехсуточные суспензии отобранных штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883; 5 вариантов экстрактов (водно-спиртовой в трех модификациях: 80:20; 50:50; 20:80, метанольный и гексановый) штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883.

**Микробиологические методы.** Для выявления и количественного учета эколого-трофических групп микроорганизмов методом предельных разведений проводили посев на плотные питательные среды: ГРМ-агар, среда Эшби, голодный агар, среда Чапека, а также на среды для выявления актиномицетов: среда Гаузе №2, крахмально-казеиновая среда, агар крахмально-аммиачный, агар глицерин-аргининовый, агар глицерин-нитратный (Теппер и др., 1993; Нетрусов и др., 2005). Микроскопирование актиномицетов проводили с использованием бинокулярного микроскопа G 380 с темнопольной и фазово-контрастной приставкой, визуализатором и фотоаппаратом.

Сравнительное изучение морфологических (форма цепочек спор) и культуральных (окраска воздушного мицелия, окраска субстратного мицелия, наличие растворимых пигментов, наличие меланоидных пигментов) диагностических признаков при росте штаммов актиномицетов выполнили на следующих средах: минеральный агар I, солевой раствор А, овсяный агар, овсяный агар ISP3, глицерин-нитратный агар, глюкозо-аспарагиновый агар, глицерин-аспарагиновый агар ISP5, пептонно-дрожжевой агар с железом ISP6, среда ISP9, крахмально-аммиачный агар ISP4 (Гаузе и др., 1983).

Противовирусную активность суспензий штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 с титром  $10^9$  КОЕ/мл исследовали на рассаде томата (*Solanum lycopersicum*) сорта Новичок и картофеле (*Solanum tuberosum*) сорта Ред Скарлетт в индикаторной лаборатории филиала ФГБУ «Россельхозцентр» по Астраханской области.

Для выявления антифунгальной активности суспензий штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 использовали метод диффузии в агар (Теппер и др., 1993; Нетрусов и др., 2005). Для определения

антагонистической активности в качестве тест-объектов использовали 12 изолятов грибов, относящихся к родам *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Macrosporium*.

Оценку продуктивности клеток штаммов RCAM04697, RCAM04882, RCAM04883 осуществляли при культивировании на крахмально-казеиновой среде, среде Гаузе №2, картофельной среде (Гаузе и др., 1983). Режим культивирования: температура плюс 28°C, время 72 часа при непрерывном перемешивании на шейкере (120 об/мин). Количество клеток в суспензии определяли путем посева суспензии на аналогичные плотные питательные среды (Звягинцев, 1991; Нетрусов и др., 2005).

**Биотехнологические методы.** Метанольный и водно-спиртовой экстракты готовили из сухой биомассы исследуемых штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 с титром клеток  $10^9$  КОЕ/мл, полученной путем высушивания в ротационном испарителе. Сухую биомассу штаммов смешивали в разных соотношениях дистиллированной воды и этанола (Елинов, 1989; Соболева и др., 2012). После центрифугирования, удаления осадка, высушивания жидкости в ротационном вакуумном испарителе (IKA RV 10 digital) при температуре от 60 до 70 °C получали сухой экстракт.

Для приготовления гексановых экстрактов 250 мл суспензии (титр клеток  $10^9$  КОЕ/мл) штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 экстрагировали 5 мл гексана в течение 3 минут в делительной воронке. Гексановый экстракт высушивали в ротационном испарителе (Чудина и др., 2011).

Для получения опытных образцов сухую биомассу суспензии и сухие экстракты штаммов разводили стерильной дистиллированной водой в соотношениях: 0,5 мг/мл и 1 мг/мл.

**Биохимические методы.** Биохимические анализы изолятов актиномицетов проводили: на оксидазу - согласно ГОСТ 32064-2013, на каталазу - ГОСТ 30425-97, на сероводород - ГОСТ 31659-2012, на индол - ГОСТ 30726-2001. Способность штаммов восстанавливать нитраты в нитриты исследовали на жидкой среде Чапека с 1% глицерина. Материалом для диагностики вирусов методом иммунохроматографического анализа (ИХА) служили иммунострипы ImmunoStrip Test Kit Flashkits (США) (Гиббс и др., 1978). Материалом для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме «реального времени» с использованием микрочипового амплификатора нуклеиновых кислот «АриаДНА» служили пробы ДНК и РНК, полученные из клубней и зеленой массы картофеля (Инструкция., 2015).

**Оценка безвредности штамма.** На первом этапе для отбора активных изолятов с фитостимулирующими свойствами определяли фитотоксичность суспензии актиномицетов в лабораторных опытах на семенах томата Новичок (ГОСТ 12038-84). Учет всхожести томата проводили на 7-е и 14-е сутки. Фитотоксичность суспензии и экстрактов отобранных активных штаммов исследовали методом

ингибирования роста корня редиса (*Rarhanus sativus*) Хелро при 20 °С в течение 3 суток в двух концентрациях: 0,5 мг/мл и 1 мг/мл (Селивановская, 2011). Безвредность штаммов для животных проверяли в экспериментах *in vivo* на дафниях (*Daphnia magna* Straus) (Селивановская и др., 2011).

**Физико-химические методы.** Изучение антиоксидантной активности и компонентного состава метаболитов суспензии и экстрактов трех исследуемых штаммов проводили с концентрацией 1 мг/мл. Для определения антиоксидантной активности использовали реакцию со стабильным свободным радикалом ДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) (Крешков, 1970; Астафьева и др., 2015).

Изучение компонентного состава метаболитов исследуемых культур бактерий проводили методами определения оптической плотности, качественных реакций, методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах ПТСХ-АФ-А-УФ (10x15 см) марки «Сорбфил», высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газовой хроматографии (ГХ) и методом масс-спектрометрии (МС) (Кирхнер, 1981).

Определение органических кислот в водно-спиртовых экстрактах трех исследуемых штаммов проводили методом ВЭЖХ в НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика с использованием анионообменных колонок и супрессионной системы с кондуктометрическим детектированием на жидкостном хроматографе Waters – Alliance 2695 с диодно-матричным детектором Waters 2996 при длине волны 220 нм.

Суспензию и экстракты (водно-спиртовой, метанольный, гексановый) штамма *S. carpaticus* RCAM04697 исследовали на газовом хромото-масс-спектрометре SHIMADZU GCMS-QP2010 Ultra в лаборатории гидробиологии ФГБУН Института озероведения РАН.

**Биологические методы.** Отбор почвенных образцов для химического и микробиологического анализа и определения степени засоления почв проводили согласно ГОСТ 17.4.4.02-2017. Для идентификации вирусной инфекции использовали тестирующий набор растений-индикаторов (Проценко, 1966).

Полевой опыт на томатах сорта Ажур F1 проводили в 8 вариантах: контроль 1 – без обработок, контроль 2 - с обработкой коммерческим биопрепаратом Лепидоцид СК (эталон), пять вариантов с обработкой суспензией каждого из пяти штаммов и вариант с обработкой суспензией всех штаммов одновременно. Полевой опыт на картофеле сорта Ред Скарлетт был представлен двумя вариантами: 1) обработка картофеля трехсуточной суспензией штамма *S. carpaticus* RCAM04697; 2) контрольный участок без обработок.

**Статистическая обработка результатов.** Обработку результатов осуществляли стандартными общепринятыми методиками. Оценку разброса данных в экспериментах проводили подсчетом средних величин и среднего квадратичного отклонения для выявления доверительного интервала при 95%-ном уровне значимости. Для расчетов применяли программы BioStat 2008 и Excel.



### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Выделенные штаммы актиномицетов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 с фитостимулирующими свойствами способны к подавлению широкого спектра вирусных (вирус огуречной мозаики, вирус мозаики томата, вирус бронзовости томата, Y-вирус картофеля, X-вирус картофеля, вирус скручивания листьев картофеля) и грибных (относящихся к родам *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Macrosporium*) возбудителей болезней растений. Противовирусные, фунгицидные и фитостимулирующие свойства экспериментальных образцов подтверждены в лабораторных и полевых опытах.

2. Способность штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 к подавлению микробных патогенов и проявление антиоксидантных свойств определяются синтезом активных метаболитов в виде следующих соединений: флавоноиды, алкалоиды, гликозиды, производные пиридина ( $\gamma$ -пиридинкарбоновая кислота,  $\alpha$ - пиридинкарбоновая кислота), аминокислота – оксипролин, антибиотики (альтиомицин, нарбомицин, тилозин, форомацидин С, эритромицин), фенол – протокатеховый альдегид, органические кислоты (изолимонная, уксусная, фумаровая, молочная, пировиноградная, яблочная). Штамм *S. carpaticus* RCAM04697, кроме того, синтезирует этил-5-(пиридин-4-ил)-1H-пиразол-3-карбоксилат, метилпальмитат, метиловый эфир 8-октадеценовой кислоты, 1,2-гександиол, 1-додеканол, что обуславливает его более высокую активность.

3. Экспериментальные образцы на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 обеспечивают достоверную прибавку урожайности относительно контроля (без обработок) на 35,4% (картофель) и до 175,8% (томат) в полевых условиях за счет стимуляции роста и подавления возбудителей болезней.

**Степень достоверности и апробация результатов исследования.** Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается использованием современных методов исследования, статистических методов обработки данных и оборудования, поверенного и сертифицированного надлежащим образом.

Основные результаты исследования представлены на III Международной научной конференции «Шаг в будущее: теоретические и прикладные исследования современной науки» (Санкт-Петербург, 2013), XVIII Международной научной конференции «Научная дискуссия: инновации в современном мире» (Москва, 2013), III Международной научной конференции «Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков» (Новосибирск, 2013), Всероссийской научной конференции «Молекулярно – генетические и фармакологические аспекты изучения ценных биологически активных компонентов» (Астрахань, 2014), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов»

(Москва, 2014), Международной научной конференции «Научно-практические пути повышения экологической устойчивости и социально-экономическое обеспечение сельскохозяйственного производства» (Москва, 2014), Международной научной конференции «Роль почв в биосфере и жизни человека» (Москва, 2015), XXVIII зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2016), XXII Московском международным салоне инноваций и инновационных технологий «Архимед» (Санкт-Петербург, 2018), VIII Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой» (Саратов, 2019), Всероссийской научной конференции с международным участием «Социально-экономические и экологические аспекты развития Прикаспийского региона» (Элиста, 2019), Международном научном форуме «Каспий XXI века: пути устойчивого развития» (Астрахань, 2020), Всероссийской научно-практической онлайн-конференции «Биоразнообразие, рациональное использование биологических ресурсов и биотех-нологии» (Астрахань, 2021).

**Работа выполнена** на кафедре биотехнологии, зоологии и аквакультуры ФГБОУ ВО «АГУ» при финансовой поддержке Фонда Содействия Инновациям по программам «УМНИК» (грант 0047042) и «СТАРТ-1» (грант 0065616), проекта АВЦП - Стратегическое развитие государственных образовательных учреждений высшего профессионального образования «Механизмы действия биологически активных веществ — брассиностероидов как регуляторов биологических систем» (№ 4. 2222. 2011, 2012-2014), гранта РФФИ №13-04-90744 «Оценка состава метаболитов альго-бактериальных сообществ в зависимости от их структуры и видового разнообразия».

**Личный вклад автора.** Тема, цель, задачи, объекты, методы и план исследования определены автором совместно с руководителем. Автор принимал непосредственное участие на всех этапах выполнения диссертационной работы: сбор полевых материалов, микробиологический анализ актиномицетов с использованием методов посевов и микроскопии, изучение биологической активности, определение химического состава, обработка и обобщение полученных данных, написание и оформление диссертационной работы.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 49 научных работ, из них 1 статья в журнале, входящем в базы данных международных индексов научного цитирования Scopus и Web of Science, 7 статей в журналах, входящих в издания, рекомендованные ВАК, 1 Патент на изобретение, 1 электронная База данных, 4 статьи в других изданиях и 35 тезисов в материалах международных и всероссийских научных конференций. Доля участия автора в публикациях составляет 95%.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 184 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, рекомендации по использованию результатов работы и списка литературы,

включающего 216 работ отечественных и 181 зарубежных авторов. Работа содержит 34 рисунка, 31 таблицу, 9 приложений.

**Благодарности:** Автор выражает глубокую благодарность и признательность за внимательное руководство научному руководителю к.б.н., доценту, Ю.В. Батаевой, за ценные консультации д.б.н., профессору И.С. Держинской, а также за помощь при выполнении работы д.с.-х.н., доценту В.А. Шляхову, д.б.н., профессору Е.И. Кондратенко, д.б.н., профессору Е.А. Курашову.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**1. Поиск новых штаммов актиномицетов с фитостимулирующей активностью.** Из 23 образцов аллювиальной луговой, бурой полупустынной, аллювиальной дерновой и светло-каштановой почв различной степени засоления (величина сухого остатка от 0,3% до 2,9%) выделен 21 изолят актиномицетов, которые проверяли на фитотоксичность на растениях томата Новичок. В результате выбрали 3 изолята, проявивших высокую фитостимулирующую активность.

**2. Исследование культурально-морфологических и биохимических свойств штаммов.** Выделенные изоляты пересевали на плотную крахмало-казеиновую среду. Изолят RCAM04697 характеризовался образованием круглых колоний с вишнево-красным мицелием субстрата и коричневым воздушным мицелием с черным рассеянным пигментом. Культурально-морфологическими особенностями изолята RCAM04882 являлось образование круглых колоний с желтым мицелием субстрата и пепельно-серым воздушным мицелием. Изолят RCAM04883 развивался, образуя круглые колонии с белым мицелием субстрата и бледно-розовым воздушным мицелием.

Изучение биохимических свойств показало, что изоляты оксидазо- и каталазоположительные, не образуют сероводород и индол, культивируются на средах с глюкозой, мальтозой, фруктозой, сахарозой, лактозой, маннитом; на среде с ксилозой, арабинозой, раффинозой, инозитом рост отсутствует; восстанавливают нитраты до нитритов.

На основе изучения культурально-морфологических, биохимических свойств, а также данных секвенирования 16S рРНК изолят RCAM04697 определили, как *Streptomyces carpaticus*, изолят RCAM04882 – как *Nocardiosis umidischolae*, изолят RCAM04883 идентифицирован, как *Nocardiosis umidischolae*.

**3. Исследование активности штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 в отношении вирусных и грибных патогенов растений.** Противовирусную активность изучали 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 1).

Таблица 1 - Противовирусная активность суспензий штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *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>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> RCAM04882			
Обработка суспензией штамма после инокуляции ВОМ	80	27	33,8
Обработка суспензией штамма после инокуляции ВМТо	80	21	26,3
<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 обнаружены при обработке суспензией штамма *S. carpaticus* RCAM04697: при инокуляции ВОМ количество бессимптомных растений составило 33,8%, при ВМТо – 26,3%.

Наименьшая противовирусная активность в отношении исследуемых вирусов установлена 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 менее устойчив к действию штаммов актиномицетов (18,8%-32,5%), чем ВОМ (27,5%-40,0%).

Изучение противовирусной активности исследуемых штаммов на картофеле методами растений-индикаторов, иммунострипов и ПЦР-диагностики показало присутствие свойств, способствующих снижению развития и распространения фитовирусов.

Выявлено, что суспензии исследуемых штаммов обладают противовирусными свойствами в отношении УВК и ХВК. Максимальное значение противовирусной активности обнаружено при обработке суспензией штамма *S. carpaticus* RCAM04697: при инокуляции УВК количество бессимптомных растений 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.

Различную степень фунгицидной активности суспензии штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 проявили по отношению к 12 исследованным фитопатогенным грибам (таблица 2).

Таблица 2 - Антагонизм суспензий штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 к фитопатогенным грибам

№ п/п	Наименование фитопатогена	Размер зон подавления, мм		
		<i>S. carpaticus</i> RCAM04697	<i>N. umidischolae</i> RCAM04882	<i>N. umidischolae</i> RCAM04883
1	<i>Alternaria solani</i>	31±1	27±1	20±1
2	<i>Alternaria alternata</i>	25±0	22±0	15±0
3	<i>Alternaria infecta</i>	29±1	18±1	10±1
4	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	25±0	10±0	8±0*
5	<i>Fusarium oxysporum</i>	22±0	8±0*	4±0*
6	<i>Phoma exiqua</i>	10±1*	5±1*	3±1*
7	<i>Colletotrichum atramentarium</i>	8±1*	4±1*	2±1*
8	<i>Phytophthora infestans</i>	17±0	9±0	5±0
9	<i>Phytophthora</i> spp.	15±0	10±0	8±0
10	<i>Pythium</i> sp.	10±1	5±1*	3±1*
11	<i>Rhizoctonia solani</i>	25±0	20±0	15±0
12	<i>Macrosporium solani</i>	6±1*	5±1*	3±1*

Примечание: (\*) – угнетение

Полученные данные свидетельствуют о том, что наибольшей фунгицидной активностью в отношении всех исследуемых фитопатогенных грибов обладает суспензия штамма *S. carpaticus* RCAM04697. Максимальное значение зоны подавления выявлено в варианте с изолятом *Alternaria solani* (31 мм), минимальное – с *Macrosporium solani* (6 мм). Размеры зон подавления в вариантах с остальными тест-объектами колебались от 8 мм до 29 мм.

**4. Изучение безвредности штаммов и их антиоксидантных свойств.** В опыте на дафниях суспензии штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 оказались нетоксичными.

При определении фитотоксичности на редисе наибольшее прорастание на 3-и сутки выявлено при обработке гексановыми экстрактами исследуемых актиномицетов, которое составило от 64,5% до 90,1%. Наиболее высокие биометрические показатели растений, характеризующиеся длиной корня, выявлены в гексановом экстракте 2,67-2,82 см и водно-спиртовом экстракте 80:20 в концентрации 0,5 мг/мл – 2,44 см штамма *S. carpaticus* RCAM04697.

Установлено, что все варианты экстрактов трех штаммов нетоксичны, наблюдался выраженный ростстимулирующий эффект, а концентрация 1 мг/мл оказалась эффективнее, чем концентрация 0,5 мг/мл.

При определении антиоксидантной активности использовали трехсуточные суспензии штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883, а также их экстракты: водно-спиртовые (80:20, 50:50, 20:80), метанольные и гексановые (таблица 3).

Таблица 3 - Антиоксидантная активность штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883

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

Наибольшую антиоксидантную активность проявили суспензия (88,8%) и водно-спиртовый экстракт (20:80) (76,0%) штамма *S. carpaticus* RCAM04697. Максимальная антиоксидантная активность штамма *N. umidischolae* RCAM04882 обнаружена в гексановом и водно-спиртовом (80:20) экстрактах 63,8% и 71,4%, соответственно. Все суспензии и экстракты проявили большую активность, чем контроль.

**5. 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 обнаружены флавоноиды, алкалоиды и гликозиды. 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 выделены производные пиридина:  $\gamma$ -пиридинкарбоновая кислота,  $\alpha$ -пиридинкарбоновая кислота (Grigoryan et al., 2020). В водно-спиртовых экстрактах 50:50 штаммов *N. umidischolae* RCAM04882 и *N. umidischolae* RCAM04883 выделена аминокислота – оксипролин.

В суспензии штамма *S. carpaticus* RCAM04697 обнаружен антибиотик алтиомицин. С помощью системы хлороформ:метанол (95:5) в суспензии штаммов *N. umidischolae* RCAM04882 и *N. umidischolae* RCAM04883 выделен антибиотик нарбомицин, в водно-спиртовом экстракте 20:80 штаммов *N. umidischolae* RCAM04882 идентифицирован антибиотик тилозин, в водно-спиртовом экстракте 50:50 штамма *N. umidischolae* RCAM04883 выделен антибиотик форомацидин. Антибиотик эритромицин определен 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) выявлен 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 преобладает уксусная кислота – 51,448 г/л (рисунок1).

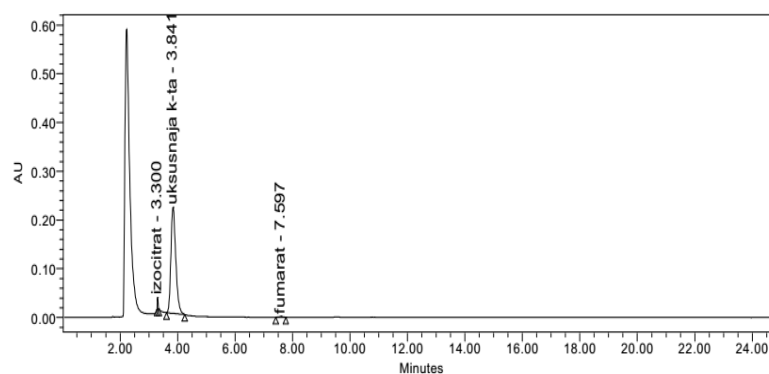


Рисунок 1 - Хроматограмма водно-спиртового экстракта (20:80) штамма *N. umidischolae* RCAM04882

Штамм *N. umidischolae* RCAM04883 синтезирует изолимонную, уксусную, фумаровую, молочную кислоты. В наибольшем количестве присутствовала изолимонная кислота 0,449 г/л. Штамм *S. carpaticus* RCAM04697 синтезирует 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.-К. с соавторами (2020) показали, что уксусная кислота в концентрациях 5%, 7,5% и 10% обладает противовирусным эффектом.

Молочная кислота, или лактат, представляет собой особый элемент, входящий в карбоновую группу и характеризуется выраженными антибактериальными свойствами (Lamb et al., 2006). В группу карбоновых кислот входит также лимонная,

способная ингибировать процессы окисления. Яблочная кислота отличается высокими бактерицидными свойствами (Нейланд, 1990).

Методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии исследовали компонентный состав метаболитов штамма *S. carpaticus* RCAM04697. Этот штамм 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). Содержание в суспензии составило 32,17% и 23,2%, 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 потенциал цитоплазматической мембраны и эффективен против как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Данное вещество характеризуется фунгицидными свойствами, его используют как консервант, сурфактант, эмульгатор (Lide et al., 1994). 1,2-гександиол характеризуется антисептическими свойствами, применяется в качестве смягчающего агента и увлажнителя (<https://kosmokis.ru/ingredients/12-hexanediol>).

При метанольной экстракции преобладал 5-(пиридин-4-ил)-1Н-пиразол-3-карбоксилат (57,8% от суммарного содержания НОС). По данным Kargouchi K. с соавторами вещества, содержащие пиразол, в частности, этил-5-(пиридин-4-ил)-1Н-пиразол-3-карбоксилат характеризуются противовирусными, бактерицидными и противоопухолевыми свойствами (Kargouchi 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.

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).

Выявленные метаболиты подтверждают полученные нами ранее сведения о том, что суспензия и экстракты (гексановый, водно-спиртовый (50/50), метанольный) штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 могут быть использованы в качестве основы для создания биологических средств защиты растений, обладающих высокой биологической



эффективностью в качестве противовирусных средств, фунгицидов, бактерицидов, антиоксидантов и фитостимуляторов в агроэкосистемах.

**6. Получение экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883.** Для оценки технологических возможностей штаммов RCAM04697, RCAM04882, RCAM04883 проводили анализ роста на картофельной среде, крахмально-казеиновой среде, 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 (рисунок 2). 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.

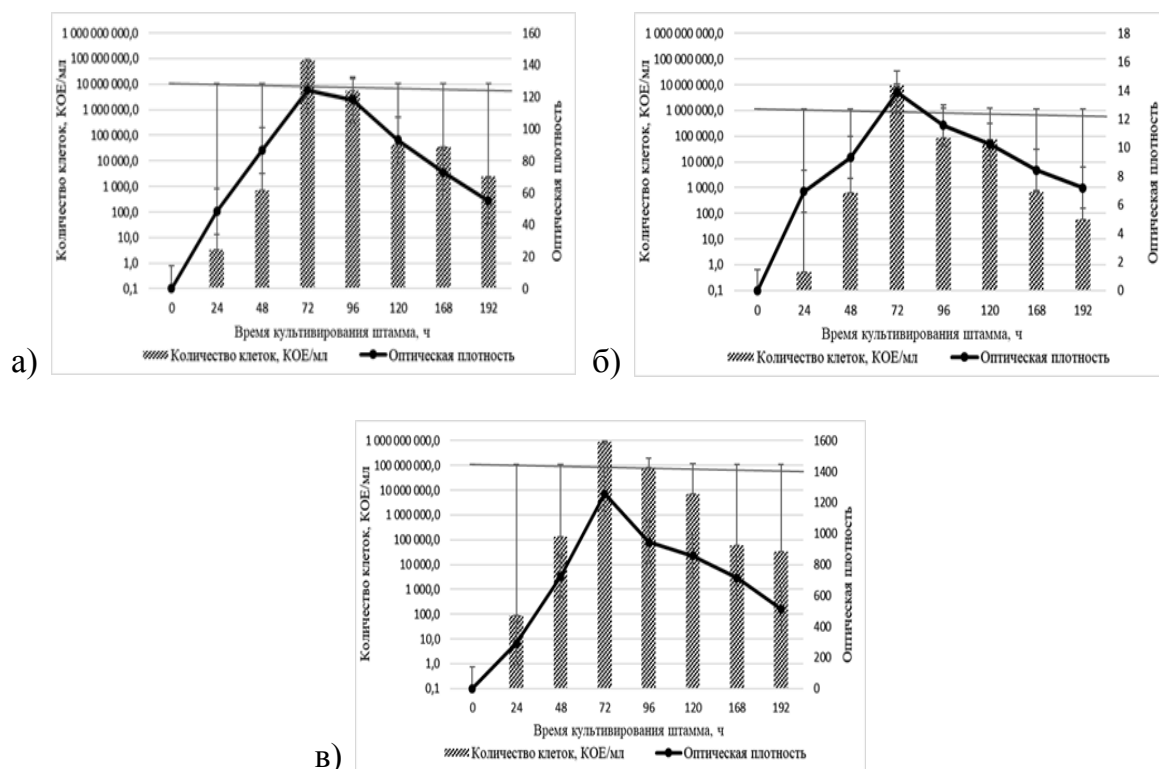


Рисунок 2 – Продуктивность штамма *S. carpaticus* RCAM04697 при культивировании на жидких питательных средах: а) крахмально-казеиновая среда, б) среда Гаузе №2, в) картофельная среда

Оптимальную температуру для синтеза биомассы штаммов, равную плюс 28<sup>0</sup>С, определяли по максимальной удельной скорости роста. Процесс культивирования контролировали отбором промежуточных и заключительных проб, подсчетом концентрации клеток и определением оптической плотности.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что картофельная среда является наиболее подходящей средой для культивирования штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, а также *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883. На этой среде при плюс 28<sup>0</sup>С через 72 часа культивирования титр клеток составляет 10<sup>9</sup> 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 *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883.

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

Для приготовления картофельной среды тщательно вымывали клубни картофеля, очищали от кожуры, глазков и снова вымывали. 200 г мелко нарезанного картофеля заливали 1 литром водопроводной воды и кипятили 30 минут. Отвар фильтровали через ватно-марлевые фильтры и разливали в сосуды для культивирования. Среду стерилизовали 30 минут при 1,5 атмосферах (рН = 7,0) (Нетрусов и др., 2005).

Комплексную схему изготовления экспериментальных образцов биопрепаратов на основе предлагаемых продуцентов можно представить следующим образом: штаммы *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 и (каждый по отдельности) выращиваются в вихревом биореакторе (БИОК-022) на картофельной среде (рН = 7,0) при температуре плюс 28<sup>0</sup>С в течение 72 часов при равномерном перемешивании и постоянной аэрации. Далее в полученные суспензии (живые клетки, споры и продукты метаболизма) с титром клеток 10<sup>9</sup> КОЕ/мл в качестве загустителя добавляется карбоксиметилцеллюлоза в количестве 1%. Данные растворы являются концентрированными экспериментальными образцами биопрепаратов.

Схема получения экспериментальных образцов на основе штаммов позволяет получать бактериальные препараты в любой микробиологической лаборатории при минимальных производственных затратах (рисунок 3). Среда для выращивания не содержит дефицитных субстратов, что способствует удешевлению и доступности производства.

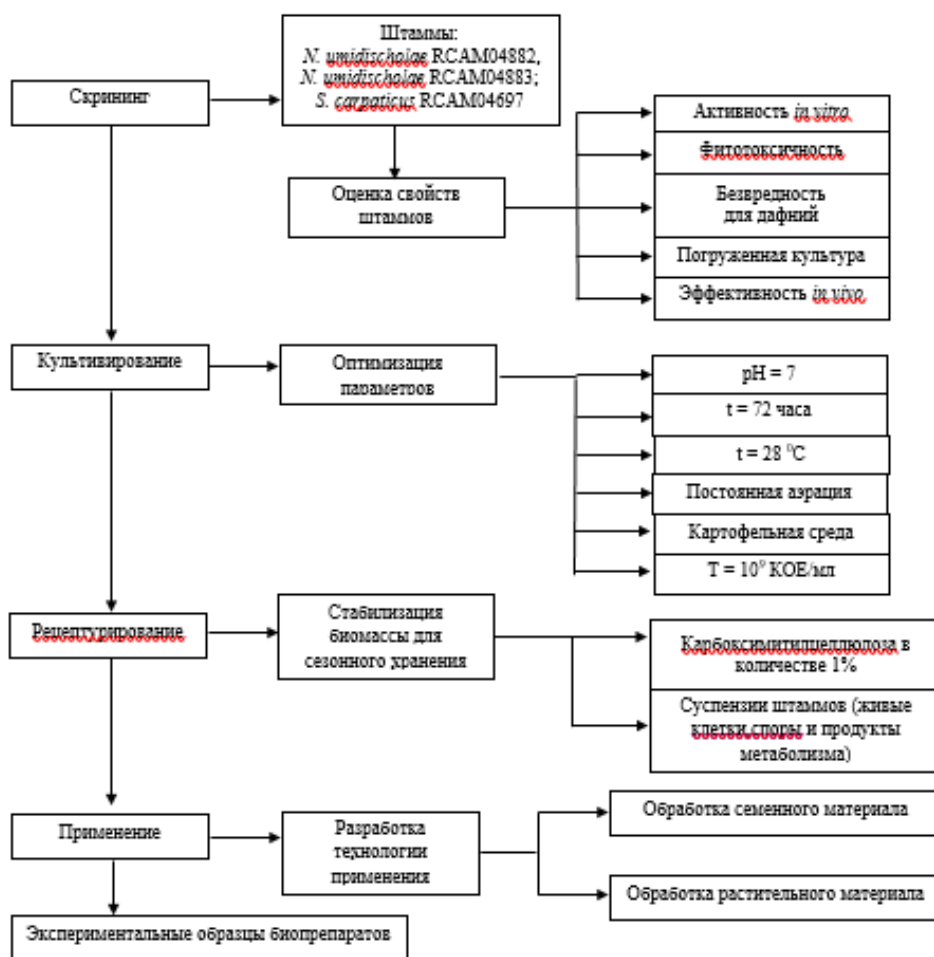


Рисунок 3 - Технологическая схема получения экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883

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

**7. Исследование фитостимулирующей и противовирусной активностей экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 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 (Григорян и др., 2021). 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.

Фитостимулирующее влияние экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов актиномицетов на растения оценивали по увеличению урожайности томатов. Исследования показали, что максимальная урожайность томатов Ажур F1 выявлена 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).

Исследование фитостимулирующей и противовирусной активностей экспериментального образца биопрепарата на основе штамма *S. carpaticus* RCAM04697 проводили в полевом опыте на картофеле (Григорян и др., 2020). Первая обработка заключалась в проливе под корень и показала, что в контрольной группе показатель заболеваний растений вирусной природы достиг 65%, тогда как в экспериментальной группе он составил всего 30%. Соответственно, показатель эффективности данного экспериментального образца достиг 53,9%. Результаты второй обработки растений картофеля методом опрыскивания свидетельствуют о повышении биологической эффективности до 71,8%.

Третья обработка - это пролив под корневую систему в контроле. В результате распространенность заболеваний вирусного характера возросла и составила 81,2% (рисунок 4).

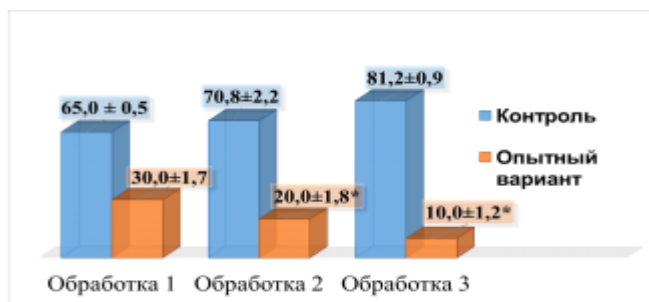


Рисунок 4 - Влияние противовирусной активности экспериментального образца биопрепарата на основе штамма *S. carpaticus* RCAM04697 на распространение вирусной инфекции картофеля в полевом опыте, %

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 обрабатывались суспензией штамма RCAM04697, другие разновидности данных патогенов отсутствовали, а показатель пораженности УВК равнялся 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 испытания полученных экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 показали значительное снижение

концентрации вируса, замедление развития вирус-индуцированных симптомов, уменьшение негативного влияния вирусной инфекции и, как следствие, улучшение физиологических показателей растений. Результаты антивирусной активности экспериментальных образцов биопрепаратов свидетельствуют об отрицательном действии на течение вирусной инфекции, и положительном влиянии на урожайность томатов и картофеля.

## ВЫВОДЫ

1. Из засоленных почв выделен 21 штамм актиномицетов, из которых отобраны три фитостимулирующих штамма. Изучены их культурально-морфологические и биохимические свойства. Штаммы идентифицированы как *Streptomyces carpaticus*, *Nocardioopsis umidischolae*, *Nocardioopsis umidischolae*.

2. Суспензии и экстракты штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882 и *N. umidischolae* 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 12 фитопатогенных микромицетов относящихся к родам *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Macrosporium*.

3. Выявлена антиоксидантная активность штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883. Наибольшую антиоксидантную активность проявили суспензия (88,8%) и водно-спиртовый экстракт (76,0%) штамма RCAM04697.

4. Штаммы *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 синтезируют флавоноиды, алкалоиды и гликозиды. Компонентный состав метаболитов водно-спиртовых экстрактов штаммов представлен органическими кислотами: изолимонная, уксусная, фумаровая, молочная, яблочная, лимонная, пировиноградная. Методом тонкослойной хроматографии выявлены: антибиотики нарбомицин, тилозин, форомацидин С, эритромицин; фенол – протокатеховый альдегид. Данные метаболиты обладают противовирусными и антибактериальными свойствами.

5. В составе вторичных метаболитов штамма *S. carpaticus* RCAM04697 с помощью метода газовой хроматографии и масс-спектрометрии 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.

6. Синтез одновременно нескольких антимикробных метаболитов является основным механизмом антагонистического действия штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883.

7. Предложены состав питательной среды и условия культивирования штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 с целью получения биомассы и синтеза антимикробных метаболитов (флавоноиды, алкалоиды, гликозиды, производные пиридина ( $\gamma$ -пиридинкарбоновая кислота,  $\alpha$ -пиридинкарбоновая кислота), аминокислота – оксипролин, антибиотики (алтиомицин, нарбомицин, тилозин, форомацидин С, эритромицин), фенол – протокатеховый альдегид, органические кислоты (изолимонная, уксусная, фумаровая, молочная, пировиноградная, яблочная), этил-5-(пиридин-4-ил)-1Н-пиразол-3-карбоксилат, метилпальмитат, метиловый эфир 8-октадеценовой кислоты, 1,2-гександиол, 1-додеканол). Разработаны технологическая схема получения и инструкция по применению экспериментальных образцов биопрепаратов на основе данных штаммов на томате и картофеле.

8. Экспериментальные образцы биопрепаратов на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 стимулируют рост и развитие томата, обеспечивая достоверную прибавку урожайности относительно контроля (без обработок) до 175,8% и проявляют противовирусные свойства в отношении возбудителей вирусов огуречной мозаики, мозаики томата и бронзовости томата.

9. 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%.

10. На основании результатов проведенных испытаний штаммы *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 могут быть рекомендованы, как продуценты вторичных метаболитов, обладающих фитостимулирующими, противовирусными, антиоксидантными, фунгицидными свойствами, и могут быть использованы в качестве основы биопрепаратов для агроэкосистем.

#### **ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

На основании результатов полевых испытаний экспериментальные образцы биопрепаратов на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 могут быть предложены для создания на их основе микробиологических средств защиты растений с противовирусными, фунгицидными, фитостимулирующими и антиоксидантными свойствами для повышения урожайности томата и картофеля. Рекомендуемая технология применения: замачивание семенного материала из расчета 1 л/10 кг семян на 20 минут; пролив под корень в фазу бутонизации с нормой расхода 4 л/га; опрыскивание в фазу плодоношения с нормой расхода 4 л/га.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Всего по теме диссертации опубликовано 49 научных работ. Ниже перечислены основные работы.

### В изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Шляхов, В.А. Теоретические аспекты возделывания картофеля в аридной зоне / В.А. Шляхов, В.В. Коринец, А.Е. Талышкина, **Л.Н. Григорян** // Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса. – 2014. - № 3 (20). - С. 20-22. РИНЦ, ИФ=0,165.

2. Шляхов, В.А. Вирус огуречной мозаики в Астраханской области / В.А. Шляхов, **Л.Н. Григорян** // Защита и карантин растений. – 2014. - № 10. - С. 11-13. РИНЦ, ИФ=0,398.

3. Шляхов, В.А. Вирусные болезни картофеля в Астраханской области / В.А. Шляхов, **Л.Н. Григорян** // Картофель и овощи. – 2014. - №10. - С. 27-29. РИНЦ, ИФ=0,35.

4. **Григорян, Л.Н.** Микробиологический состав засоленных почв аридных территорий / **Л.Н. Григорян**, Ю.В. Батаева, Л.В. Яковлева, В.А. Шляхов // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия «Естественные и технические науки». - 2018. - № 12. - С. 6-14. РИНЦ, ИФ=0,164.

5. **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 // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия «Естественные и технические науки». – 2018. - № 12. - С. 14-22. РИНЦ, ИФ=0,164.

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

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

8. **Grigoryan, L.N.** Study of the component structure of the metabolites of bacteria *Nocardiopsis 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 // Russian Journal of General Chemistry. 2020 - N 90 (13). - P. 2531–2541. РИНЦ, ИФ=0,716, Web of Science, Scopus, Q3. CrossRef. Количество цитирований: 0. <https://doi.org/10.1134/S1070363220130010>.

### Публикации в других изданиях:

1. 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/СТАТУИ/2020/2/st\\_219.pdf](http://agroecoinfo.narod.ru/journal/СТАТУИ/2020/2/st_219.pdf).

2. **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: экология, развитие. - 2020. – Т. 15. - № 2. - С. 103-112. РИНЦ, ИФ=0,423, Scopus, Q4. Количество цитирований: 1.

3. **Григорян, Л.Н.** Оценка эффективности применения почвенных актинобактерий на томатах в аридной зоне / **Л.Н. Григорян, Ю.В. Батаева** // Проблемы агрохимии и экологии. – 2021. - № 1. - С. 27-31. РИНЦ, ИФ=0,303.

4. **Григорян, Л.Н.** Влияние суспензии и экстрактов штамма *Streptomyces carpaticus* RСAM04697 на жизнеспособность насекомых-вредителей / **Л.Н. Григорян, Ю.В. Батаева, Е.Д. Андреева, З.О. Тураева, Д.Х. Закарьяева, Л.В. Яковлева** // Теоретические и прикладные проблемы АПК. – 2021. - № 1. - С. 16-22. РИНЦ, ИФ=0,165.

#### **Патенты на изобретения:**

1. 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. Дзержинская**; заявитель и патентообладатель **Л.Н. Григорян, Ю.В. Батаева, В.А. Шляхов**. – № 2018113688; заявл. 13.04.2018; опубл. 22.07.2019; Бюл. № 21.

#### **Базы данных:**

1. База данных РФ № 2020620186, от 30.01.2020. Влияние штаммов актиномицетов на вирусные болезни овощебахчевых культур и картофеля в аридной зоне Северного Прикаспия / **Григорян Л.Н., Батаева Ю.В.** – Правообладатели: **Григорян Л.Н., Батаева Ю.В.**

#### **В сборниках трудов и материалов научных конференций:**

1. **Григорян, Л.Н.** Исследование стрептомицетов в почвенных экосистемах аридной зоны / **Л.Н. Григорян, Ю.В. Батаева** // Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов: Всероссийский симпозиум с международным участием. г. Москва / МАКС Пресс. - Москва, 2014. - С. 67-68. РИНЦ.

2. **Григорян, Л.Н.** Биологические инсектициды на основе актиномицетов, выделенных из почвенных экосистем аридной зоны / **Л.Н. Григорян, Е.Д. Андреева, З.О. Тураева, Д.Х. Закарьяева, Ю.В. Батаева, В.А. Шляхов** // Социально-экономические и экологические аспекты развития Прикаспийского региона: сборник материалов всерос. науч. конф. с междунар. участием. – г. Элиста / ФГБОУ ВО «КГУ», 2019. – С. 259-261. РИНЦ.