

На правах рукописи

КЛЫКОВА

Марина Викторовна

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММА
PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS VSK-26A3 В КАЧЕСТВЕ
ПРОДУЦЕНТА АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

03.02.03– микробиология

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Оболенск-2016

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель:

Дунайцев Игорь Анатольевич, кандидат биологических наук

Научный консультант:

Коломбет Любовь Васильевна, доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Нугманова Татьяна Алексеевна – доктор технических наук, профессор, академик РАЕН, Общество с ограниченной ответственностью «Биоин-Ново», Москва, генеральный директор

Соколов Михаил Сергеевич – академик РАН, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии», Московская обл., п. Большие Вяземы, научный консультант

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», Санкт-Петербург, г. Пушкин

Защита состоится «___» _____ 2016 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, кор. №1, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

С каждым годом возрастает техногенная нагрузка на почву, что оказывает отрицательное влияние на её функционирование. Интенсификация производства продуктов питания предполагает широкое применение пестицидов и агрохимикатов, что приводит к появлению устойчивости возбудителей болезней растений, насекомых к химическим препаратам. И как следствие, вызванные этими факторами - рост заболеваемости растений, снижение урожайности, вынуждают увеличивать дозы используемых препаратов, вводить все новые химические средства, а это приводит к загрязнению сырья, пищевых продуктов и окружающей среды химическими и биологическими (микотоксины) соединениями. Все это далее раскручивает спираль химизации [Гагкаева и др., 2011; Соколов и др., 2010; Thrane et al., 2004]. Среди важных факторов, воздействующих на отрасль растениеводства, продовольственную и экологическую безопасность – выделяются высокие темпы исчерпания мировых запасов фосфорного сырья, дороговизна производства удобрений, деградация почв и общее ухудшение экологии [Дунайцев, 2010; Захарченко и др., 2009; Vance et al., 2001; Vassilev et al., 2006]. Заражение и потери урожая стали чрезвычайно актуальны даже в зимний период для озимых культур, поражаемых психрофильными грибными патогенами, в частности *Microdochium nivale* (снежная плесень) [Андреева и др., 1987; Горьковенко и др., 2009]. Повсеместное широкое применение антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве приводит к снижению их эффективности, и, как следствие, к распространению устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, что повышает актуальность поиска новых антимикробных средств [Смирнов и др., 1990].

В настоящее время одними из наиболее перспективных становятся биотехнологические способы решения этих задач. Решение указанных проблем может быть достигнуто за счет поиска и селекции эффективных продуцентов, разработки на их основе новых продуктов, обладающих несколькими различными полезными свойствами.

Степень разработанности темы исследования

Возможность применения биологических средств для защиты растений изучается уже давно. К настоящему времени накоплен большой научный материал по применению бактерий-антагонистов в сельском хозяйстве, на основе которого ведутся разработки технологий производства биопрепаратов с использованием микроорганизмов [Павлюшин и др., 2010; Новикова и др., 2005; Сулейманова, 2007; Berg et al., 2005; Stockwell et al., 1997]. В это же время, биологическое разнообразие микроорганизмов остается недооцененным ресурсом для решения этих проблем. Таким ресурсом могут служить фосфатрастворяющие микроорганизмы, часто выделяемые из бедных экологических ниш с высокой конкуренцией в биоценозе. Для этих культур возможна комбинация таких полезных свойств, как: обогащение почвы фосфором, ростостимуляция и высокая

антагонистическая активность против патогенов, в том числе при низких температурах. Бактерии рода *Pseudomonas* являются типичными представителями почвенного биоценоза, способны быстро и успешно колонизировать ризосферу растения-хозяина [Артамонова и др., 2013; Беззубенкова и др., 2012; Феклистова и др., 2009; Thomashow et al., 1995]. Представители этой группы микроорганизмов являются не только антагонистами почвенных патогенов, - за счет синтеза широкого спектра антимикробных метаболитов, антибиотиков и сидерофоров, - но и могут значительно стимулировать развитие растений благодаря синтезу регуляторов роста и улучшения фосфорного питания растений.

Цель исследования - поиск нового психрофильного штамма-антагониста бактериальных и грибных патогенов и обоснование возможности его применения в качестве продуцента антимикробных препаратов для использования в борьбе с фитопатогенами и возбудителями болезней человека и животных.

Задачи исследования:

1. Провести скрининг коллекции фосфатрастворяющих микроорганизмов для выбора наиболее активного психрофильного штамма-антагониста как потенциального продуцента антимикробного препарата. Проверить активность выбранного штамма в отношении патогенов растений, человека и животных.

2. Изучить культурально-морфологические и биохимические свойства, таксономическую принадлежность отобранного штамма. Проверить выбранный штамм на безопасность по отношению к растениям и теплокровным животным.

3. Выявить способность отобранного штамма к мобилизации фосфора из фосфатного сырья. Провести испытания отобранного штамма на совместимость с пестицидами в лабораторном эксперименте.

4. Выявить и охарактеризовать основные физико-химические и биологические свойства активных метаболитов отобранного штамма, ответственных за антагонистическую активность.

5. Подобрать состав питательных сред и условия культивирования отобранного штамма с целью повышения выхода биомассы и синтеза активных метаболитов.

6. Изготовить экспериментальные образцы препарата на основе отобранного штамма и/или его метаболитов и испытать их эффективность в полевых условиях.

Научная новизна

Впервые выделен новый штамм *Pseudomonas chlororaphis ssp. chlororaphis* Vsk-26a3, проявляющий высокие фосфатрастворяющие, ростстимулирующие, антибактериальные и антигрибные свойства, в том числе, при пониженных температурах (5 ± 3) °C, что делает его перспективным продуцентом для препарата, применяемого против психрофильных фитопатогенов. Штамм *P. chlororaphis* Vsk-26a3 способен к одновременному синтезу нескольких различных по структуре антимикробных соединений при выращивании на минеральных питательных средах. Основной механизм мобилизации фосфора из нерастворимого минерального сырья в присутствии *P. chlororaphis* Vsk-26a3 связан с синтезом

штаммом группы глюконовых кислот. Установлено, что штамм *P. chlororaphis* Vsk-26a3 совместим с большой группой традиционных агрохимикатов, применяемых при выращивании сельскохозяйственных культур.

Практическая значимость и внедрение результатов

Отобран активный психрофильный штамм Vsk-26a3 с фосфатрастворяющими, ростостимулирующими и антимикробными свойствами и депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов «ГКПМ - Оболенск» как *Pseudomonas chlororaphis* ssp. *chlororaphis* (справка о депонировании №7427 от 9 сентября 2013). Получено положительное решение о выдаче патента на штамм (от 21.09.2016 по заявке №2015152834 RU) (Федеральный уровень внедрения).

Разработан лабораторный технологический регламент ЛР 78095326-153-2015 на получение препарата комбинированного действия на основе штамма Vsk-26a3 (Учрежденческий уровень внедрения). Результаты 4 независимых полевых испытаний в течение 2012-2015 гг. на базе Рязанского Государственного Агротехнического университета им. П.А. Костычева и ГНУ «Рязанский НИИ сельского хозяйства» экспериментальных образцов биопрепарата на основе штамма Vsk-26a3 в качестве стимулятора роста, альтернативы применению химических фунгицидов и минеральных фосфорных удобрений оформлены актами производственных испытаний, утвержденными руководителями указанных организаций (Межучрежденческий уровень внедрения).

Методология и методы исследования

Методология исследований соответствовала поставленным задачам. Предметом исследования явился поиск нового природного штамма-антагониста бактериальных и грибных патогенов, обладающего и фосфатрастворяющими свойствами.

Штаммы микроорганизмов. Для поиска штамма-антагониста использовали коллекцию фосфатрастворяющих микроорганизмов (ФРМ), состоящую из более 700 изолятов, созданную на базе ФБУН ГНЦ ПМБ отделом биологических технологий. У отобранных перспективных изолятов изучили культурально-морфологические и биохимические свойства, устойчивость к антибиотикам. Изоляты идентифицировали с помощью стандартных микробиологических методов, биохимических тестов Enterotest, Nefermtest (Pliva-Lachema, Чехия), API 50 CH (BioMerieux, Франция), а также с помощью программно-аппаратного комплекса для быстрой идентификации микроорганизмов по рибосомальным белкам MALDI Biotyper, (Bruker Daltonics, Германия). Для определения антагонистической активности ФРМ в качестве тест-объектов использовали 30 штаммов микофильных грибов, относящихся к родам *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Candida*, *Trichophyton* и 63 штамма бактериальных патогенов родов *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Erwinia*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria*, *Klebsiella* и др.

Микробиологические методы. Грибные штаммы выращивали на картофельно-глюкозном агаре (КГА) в течение 5÷7 сут при 28 °С. Штаммы ФРМ

культивировали на чашках Петри с МПА и ГРМ-агаром (производства ФБУН ГНЦ ПМБ «Питательные среды», п. Оболенск) при температуре 28 °С в течение двух суток. Глубинное культивирование проводили на качалочных колбах и в ферментёре на минеральных средах.

Проверку фосфатрастворяющих (ФР) свойств отобранного штамма Vsk-26a3 осуществляли по накоплению растворимого фосфата при культивировании в жидкой минеральной среде, содержащей в качестве единственного источника фосфора нерастворимый трикальций фосфат - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (ТКФ) или фосфатные руды. Изучали биодоступность 9 образцов фосфатных руд различного состава и происхождения: апатиты, фосфориты желваковые, шельфовые, ракушечные и др.

Для определения антагонистических свойств Vsk-26a3 использовали методы встречных культур, диффузии в агар, метод минимальных ингибирующих и бактерицидных концентраций (МИК). Выявление антимикробной активности разделённых активных компонентов проводили биоавтографическим методом на чашках с МПА или КГА по присутствию и размеру зон подавления роста патогена на агаре над пластинками Sorbfil (ТСХ), погружёнными в агар.

Совместимость штамма Vsk-26a3 с химическими пестицидами определяли, оценивая рост клеточной массы микроорганизма на плотной питательной среде, содержащей пестицид. Пестициды использовали в дозах, рекомендуемых регламентом применения.

Биотехнологические методы. Посевную культуру выращивали в колбах на термостатируемой качалке IRC-1-U Adolf Kunner G (Швейцария). Процесс культивирования вели в ферментере Sartorius Biostat B-plus (Германия) с рабочим объёмом 8 литров. Для оптимизации питательных сред и условий культивирования применяли стандартные методики подбора питательных сред и условий глубинного культивирования микроорганизмов. Для анализа процесса культивирования применяли IMMD программное обеспечение (интегрированная математическая модель развития). Разделение культуральной жидкости на клеточную массу и фугат осуществляли на центрифугах MiniSpin (Eppendorf, Германия) и J2-21C (Beckman Coulter Instruments, США). Окончательное отделение клеток из фугата проводили на фильтрующих системах Corning 1L Filter System (Corning, США). Концентрирование целевых продуктов проводили на вакуум-выпарной установке Laborota 4000 (Heidolph, Германия). Для получения сухих экспериментальных образцов биопрепарата на основе штамма использовали сублимационную сушилку Virtis BenchTop-4k (США).

Биохимические методы. Для определения биохимических свойств штамма, использовали мультисистемы Enterotest 24, Nefermtest 24 и API 50CH по стандартным инструкциям и программному обеспечению, прилагаемых к данным тестам фирмами-производителями. Устойчивость к антибиотикам определяли по зонам подавления роста штамма Vsk-26a дисками с антибиотиками.

Оценка безвредности штамма. Фитотоксичность оценивали по морфометрическим показателям (длина корней, листьев и масса проростков) при

обработке семян пшеницы сорта Иволга и Московская 56 суспензиями клеток штамма Vsk-26a3 и бесклеточным фильтратом культуральной жидкости (БФ КЖ) в течение 2 ч с последующим проращиванием при 28 °С в течение 4 сут. Безвредность штамма Vsk-26a3 для животных проверяли в экспериментах *in vivo* на беспородных белых мышах.

Физико-химические методы. Для исследования влияния физико-химических факторов на антимикробную активность штамма Vsk-26a3 изучали влияние повышенной температуры на БФ КЖ, чувствительность к трипсину, определяли срок хранения, влияние процедуры диализа.

Разделение активных метаболитов штамма Vsk-26a3 проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах Sorbfil (Краснодар, Россия), сорбент - силикагель на алюминиевой подложке, размер зерна 100 мкм.

Определение активных метаболитов проводили с помощью газовой хроматографии. Хроматографирование пер-триметилсилильных эфиров определяемых веществ проводили на хроматографе HP5890 (Hewlett-Packard, США) при использовании колонки с полидиметилсилоксановой фазой SPB-1 и пламенно-ионизационного детектора. Определение состава и структуры основного антимикробного метаболита проводили на хроматомасс-спектрометре TSQ 8000 фирмы Thermo Scientific с газовым хроматографом Trace 1310.

Биологические методы. Оценку эффективности применения экспериментальных образцов на основе штамма Vsk-26a3 выполняли на базе Рязанского Государственного Агротехнического университета им. П.А. Костычева и ГНУ “Рязанский НИИ сельского хозяйства”. В экспериментах использовали основные методики и схемы, общепринятые в селекционных, научно-исследовательских учреждениях и при Государственном сортоиспытании.

Для обработки семян использовали сухой препарат на основе штамма Vsk-26a3 в дозе 0,25÷1,0кг/т. Для оценки в полевых условиях биологической эффективности экспериментальных образцов для борьбы с возбудителем снежной плесени озимой пшеницы создавали искусственный инфекционный фон внесением на почву 30 г на 1 м² зерна, зараженного *Microdochium nivale*.

Статистическая обработка результатов. Обработку результатов осуществляли стандартными общепринятыми методами. 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 STATISTICA и Excel.

Положения, выносимые на защиту

1. Вновь выделенный штамм *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 способен к подавлению широкого спектра бактериальных и грибных возбудителей болезней растений, человека и животных, в том числе, при пониженных положительных температурах.

2. Способность штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 к подавлению микробных патогенов определяется одновременным синтезом нескольких активных метаболитов.

3. Активная мобилизация фосфора из нерастворимого минерального сырья под действием штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 происходит за счет синтеза группы глюконовых кислот.

4. Экспериментальные образцы препарата на основе штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 обеспечивают повышение урожайности растительных культур в полевых условиях, в том числе при искусственном заражении возбудителем снежной плесени.

Степень достоверности и апробация работы

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

Материалы диссертации представлены на девяти российских и международных научных семинарах и конференциях: 34-м Международном Семинаре Япония/Россия «Biotechnologies in Russia/CIS» (17 Июня 2005 г., Tokyo, Japan); 3-м Московском Международном Конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (14-18 марта 2005 г., Москва, Россия); 3-м Международном Симпозиуме «Phosphate Dynamics in Soil-Plant Continuum» (14-19 мая 2006 г., Uberlandia, Brazil); 10-й Международной Конференции «Soil-Water Systems Consoil-2008» (03-06 июня 2008 г., Milano, Italy); Юбилейном Международном Симпозиуме МОББ «Биоценоотическая регуляция. Основы современных фитосанитарных технологий» (21-25 мая 2007 г., Санкт-Петербург, Россия); 2-м Международном Экологическом Форуме «Окружающая среда и здоровье человека» (01-04 июля 2008 г., Санкт-Петербург, Россия); научно-практических школах-конференциях молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «Современные технологии обеспечения биологической безопасности», (20-21 мая 2008 г. и 31 мая-02 июня 2011 г., Оболенск); на 3-м Съезде микологов (10-12 октября 2012 г., Москва).

Работа выполнена в отделе биологических технологий ФБУН ГНЦ ПМБ в рамках отраслевых программ: «Научные аспекты обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в Российской Федерации» (2006 - 2010 гг.) и «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (на 2011-2015 гг.), а также двух международных проектов МНТЦ: №2336п «Разработка технологии производства и применения микробиологической субстанции, на основе которой возможно создание препарата для защиты пшеницы и других зерновых культур от фузариоза колоса» (2003-2005

гг.) и №3107 «Прямая микробиологическая мобилизация фосфатов из фосфатного сырья: использование для сельского хозяйства и нужд промышленности» (2004-2008 гг.).

Тема диссертации была утверждена на заседании Ученого совета ФБУН ГНЦ ПМБ 26 декабря 2014 г., протокол УС № 11.

Публикации. Основное содержание работы отражено в 18 научных публикациях, включая 9 статей в реферируемых научных журналах (в том числе 5 в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки РФ и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени), и 2 патента Российской Федерации на изобретения.

Личный вклад соискателя. Планирование, организация и проведение всех этапов исследований: выделение активного психрофильного штамма, исследование его антимикробных, ростостимулирующих и фосфатрастворяющих свойств, выявление механизмов противомикробного действия и фосфатрастворения, подбор питательных сред и условий культивирования, культивирование штамма и изготовление на его основе экспериментальных образцов биопрепаратов, статистическая обработка полученных данных и их интерпретация проведены лично автором под руководством к.б.н. Дунайцева И.А. и д.б.н. Коломбет Л.В. Все изложенные в диссертации материалы получены непосредственно самим соискателем или при его участии (кроме полевых испытаний). Результаты, представленные в отдельных главах, получены совместно с сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ: к.х.н. Жиглецовой С.К., к.х.н. Ариповским А.В., Кондрашенко Т.Н., Суриным А.К., Бойко А.С., сотрудницей ГНУ Рязанского НИИСХ к.с.-х.н. Антошиной О.А.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 168 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 128 работ отечественных и 85 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 41 рисунком и 40 таблицами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск нового активного психрофильного штамма-антагониста, как потенциального продуцента для использования в антимикробном препарате

Из коллекции фосфатрастворяющих микроорганизмов на антагонистическую способность в отношении 93 актуальных возбудителей болезней человека, животных и растений проверили 116 наиболее перспективных изолятов.

В результате выбрали 3 изолята, проявивших высокую антибактериальную и антифунгальную активность. Изоляты идентифицировали как *Bacillus megaterium* Lhv-98a, *Geobacillus thermoglucosidasius* Lhv-97, и *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3.

Проведенный комплекс дополнительных исследований (активность в отношении возбудителя фузариоза колоса зерновых культур (грибы р. *Fusarium*) и патогена, вызывающего «снежную плесень» озимых культур (*Microdochium nivale*), антимикробные свойства на патогенах теплокровных и авирулентность по отношению к животным) позволил выбрать для дальнейших исследований изолят Vsk-26a3.

Изучение культурально-морфологических, биохимических свойств и биобезопасности штамма Vsk-26a3

На основе изучения культурально-морфологических, биохимических свойств, а также данных по определению рибосомальных белков с использованием программно-аппаратного комплекса MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия) изолят Vsk-26a3 определили как *Pseudomonas chlororaphis ssp. chlororaphis*.

При проращивании на влажной подложке зерен пшеницы, обработанных суспензией клеток штамма Vsk-26a3 и водными растворами его БФ КЖ, обнаружили выраженный ростостимулирующий эффект при концентрации клеток 10^3 КОЕ/мл и разбавлении БФ КЖ 1:4 (рис. 1).

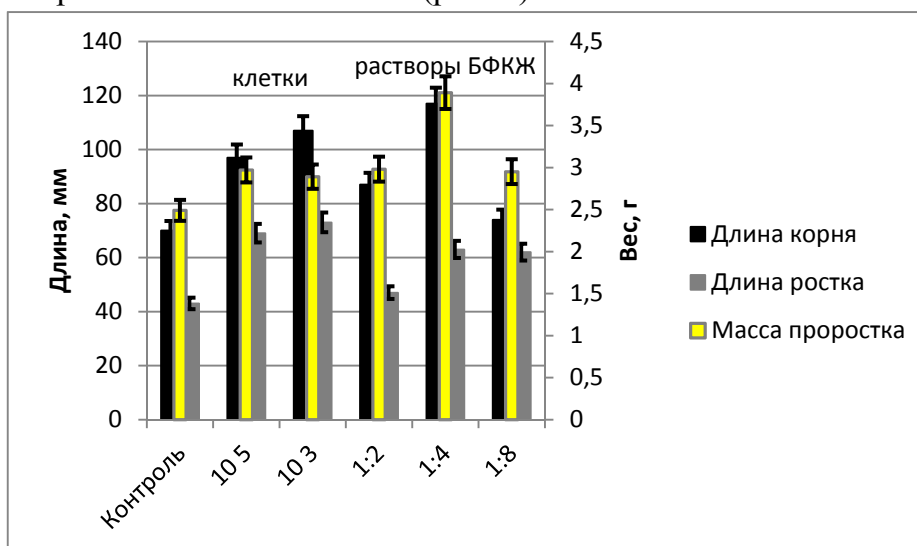
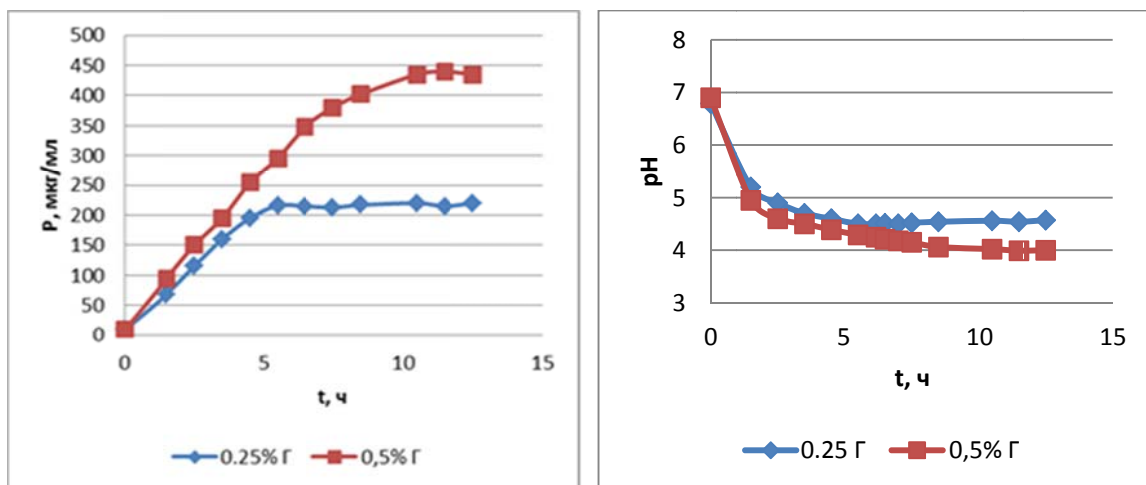


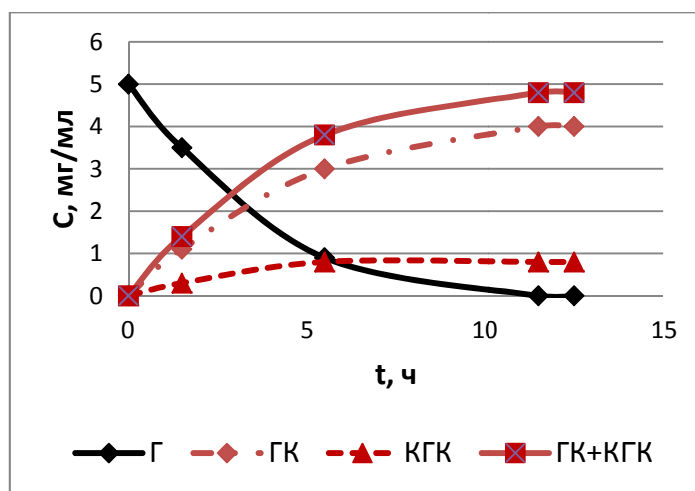
Рисунок 1 - Морфометрические показатели проростков семян пшеницы после обработки суспензией клеток штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3 (10^3 , 10^5 КОЕ/мл) и растворами БФ КЖ Vsk-26a3 (в разведении 1:2, 1:4, 1:8)

С учетом возможного применения это штамма в качестве основы биопрепарата, сочетающего антибактериальную (антифунгальную) и фосфатрастворяющую активность, изучили процесс высвобождения этим штаммом фосфатов, находящихся в нерастворимом состоянии. В экспериментах в качестве единственного источника фосфора использовали модельное сырье - трикальций фосфат. Динамика накопления фосфора в растворе под действием Vsk-26a3 соответствует динамике снижения рН и практически совпадает с накоплением суммы глюконовых кислот (рис.2).



а

б



в

Рисунок 2 – Динамика параметров, свидетельствующих о способности штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3 к мобилизации фосфора: растворения фосфатов (а); величины рН (б) и изменения концентраций глюкозы (Г), глюконовой (ГК), кетоглюконовой (КГК) и суммы этих кислот (ГК+КГК) (в)

При испытаниях природных фосфатных руд различного состава установили, что штамм высвобождает фосфаты из руд соизмеримо или лучше, чем запатентованные ранее ФРМ: *Pseudomonas sp.* 181a (патент РФ № 2451069), *Acinetobacter sp.* 305 (патент РФ № 2451068), но обладающие более низкими фунгицидными свойствами. Наиболее активный фосфатмобилизующий штамм из выделенных в мире до настоящего времени *Bulkholderia cepacia* E-37 (Goldstein et al., 1993) вообще не обладает антагонистической активностью. При этом, штамм Vsk-26a3 показал лучшие результаты на руде океанического шельфового фосфорита из Намибии и зернистого фосфорита из Иордании.

В сравнении с продуцентами биопрепаратов с антигрибными свойствами, такими, как *Bacillus subtilis* ИПМ-215 и *Trichoderma asperellum* 16, штамм Vsk-26a3 обладает более высокой ФР активностью; если уровень ее принять за 100%, то фосфатмобилизующая активность известных из литературы бактериальных

штаммов-продуцентов биопрепаратов не превышает 50 % [Hwangbo et al., 2003]. а, например, у штамма *B. subtilis* ИПМ 215 составила около 20 %.

Если рассматривать штамм Vsk-26a3 в качестве продуцента нового биопрепарата, необходимо оценить возможность его комбинации с современными агрохимическими средствами. Изучили совместимость Vsk-26a3 с 12 современными агрохимикатами различной химической природы - протравителями семян (Максим, Виал траст, Дивидент стар), фунгицидами (Амистар трио, Альто супер, Фоликур), гербицидами (Зерномакс, Линтур), инсектицидами (Арриво, Тантрэк ВРК, Шарпей) в лабораторных условиях (*in vitro*). Оказалось, что штамм совместим со всеми исследованными агрохимикатами.

Исследование активности штамма Vsk-26a3 в отношении патогенов растений, животных и человека

Антагонистическую активность штамма Vsk-26a3 исследовали в отношении 30 грибных и 63 бактериальных патогенов растений, животных и человека. Типичная картина проявления антагонизма штамма Vsk-26a3 (по отношению к *Candida albicans* и *Trichophyton terrestre*) представлена на рис. 3. На фото видно, что Vsk-26a3 практически полностью подавил рост грибных патогенов в отличие от штамма Lhv-71b.

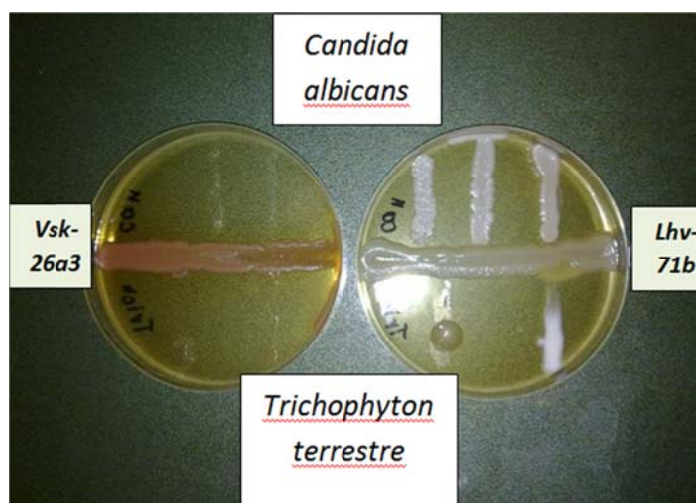


Рисунок 3 – Проявление антагонизма клеток штаммов *P. chlororaphis* Vsk-26a3 (левая чашка Петри) и Lhv-71b (правая чашка Петри). Штрихи ниже экватора чашки Петри – *T. terrestre*, выше экватора – *C. albicans*

Для того, чтобы определить, выделяются ли во внешнюю среду субстанции, обеспечивающие антагонистическую активность штамма, исследовали активность бесклеточного фильтрата (и его концентрата) культуральной жидкости (БФ КЖ, КБФ КЖ) Vsk-26a3 методом диффузии в агар. Средние выборочные значения результатов измерений зон подавления патогенов представлены в сводной табл. 1. Проверка антибактериальной активности бесклеточного концентрата выявила, что живые клетки и бесклеточный концентрат для большинства бактериальных патогенов обладают соизмеримым уровнем антимикробной активности.

Таблица 1 - Антагонизм штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3 и фильтрата КЖ к патогенам

№	Наименование патогена	Размер зон подавления, мм		
		клетки Vsk-26a3	БФ КЖ	КБФ КЖ
1	<i>Alternaria brassicicola</i> MF-P156011	2±0	-	-
2	<i>A. porri</i> MF-P176011	2±0	-	-
3	<i>A. solani</i> MF-P048011	10±1	-	-
4	<i>A. tenussina</i> MF-P127012	5±0	-	-
5	<i>A. adicina</i> MF-P196011	7±0	-	-
6	<i>Candida albicans</i> I	10±1	4±0	4±0
7	<i>Fusarium culmorum</i> №23	7±1	(10±1)*	-
8	<i>F. culmorum</i> №36	5±0	2±0	5±0
9	<i>F. moniliforme</i> №5	3±0	(5±1)*	3±0
10	<i>F. oxysporum</i> B-329	10±1	-	-
11	<i>F. poae</i>	4±0	(4±1)*	8±1
12	<i>F. sporotrichioides</i>	5±0	2±0	4±0
13	<i>F. proliferatum</i>	4±0	(5±0)*	-
14	<i>F. graminearum</i> VL-1735	8±1	(5±0)*	9±1
15	<i>Microdochium nivale</i> 4995	8±1	3±0	-
16	<i>M. nivale</i> Ряз	10±1	7±1	10±1
17	<i>Penicillium commun</i>	3±0	-	-
18	<i>P. morfensii</i> №26	3±0	-	-
19	<i>Trichophyton terrestre</i> AS-496	20±1	-	-

Примечание : (*) – угнетение; (-) – нет данных

Исследование антибактериальной активности БФ КЖ Vsk-26a3 проводили в чашках Петри на питательной среде МПА методом встречных культур. Изолят Vsk-26a3 проявил различную степень активности по отношению к 53 из 63 использовавшихся штаммов бактериальных патогенов (табл. 2).

Таблица 2 – Антагонизм штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3 в отношении бактериальных патогенов

№	Патоген	Размер зон подавления клетками Vsk-26a3, мм
1	2	3
1	<i>Acinetobacter baumannii</i> 1005	15±1
2	<i>A. lwoffii</i> 54	5±0
3	<i>Bacillus coagulans</i> 1959	25±1
4	<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	1±0
5	<i>Erwinia cancerogena</i>	8±1
6	<i>E. carotovora</i> 567	11±1
7	<i>E. herbicola</i>	3±0
8	<i>Esherihia coli</i> , 4 шт.	3÷25

1	2	3
9	<i>Haemophilus influenza</i> 411	30±1
10	<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 13883	5±0
11	<i>Listeria monocytogenes</i> 766/1	3±0
12	<i>Micrococcus luteus</i> , 2 шт	(25÷30)±2
13	<i>Morganella morganii</i>	7±1
14	<i>Mycobacterium smegmatis</i> 53/55	22±1
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 3 шт.	(2÷15)±1
16	<i>Salmonella enteritidis</i> , 2 шт	(2÷20)±1
17	<i>S.typhimorium</i> , 3 шт	(3÷30)±1
18	<i>Shigella dysenteriae</i> I 1361	2±0
19	<i>S. sonnei</i> S-форма	5±1
20	<i>Staphylococcus aureus</i> , 7 шт.	(15÷25)±1
21	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043	3±0
22	<i>Xantomonas phaseoli</i> , 2 шт	(5÷17)±1
23	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> 693	6±1

Оказалось, что КБФ КЖ обладает соизмеримым с живыми клетками уровнем антимикробной активности. В отношении бактериальных патогенов, выделенных из клинического материала. КБФ КЖ активен против *Staphylococcus aureus* 194R в разведениях выше 1:31 и соизмерим по активности с цефазолином и цефалексином в разведении 1:1; активен против *Pseudomonas aeruginosa* в разведениях выше 1:11 и соизмерим в титрах 1:5-1:2 с активностью меропенема. Результаты представлены на рис. 4.

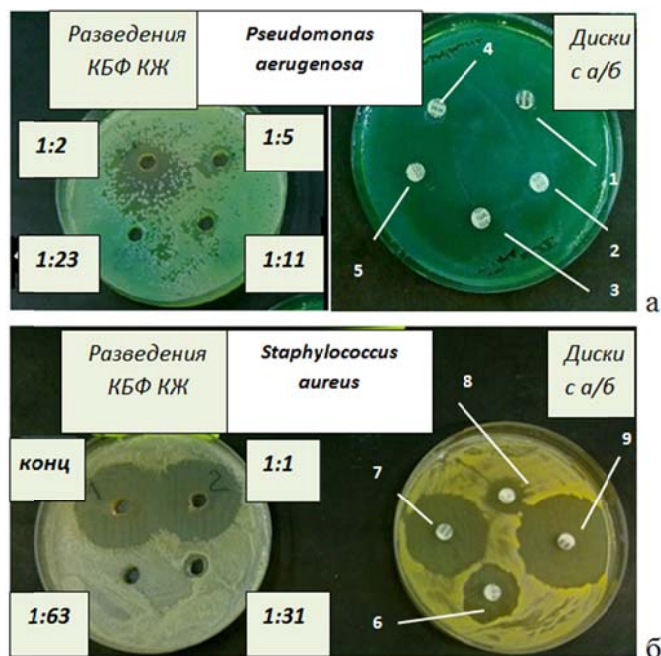


Рисунок 4 - Антибактериальная активность БКФ КЖ штамма *P. chlororaphis* по отношению к клиническим изолятам *P. aeruginosa* (а) и *S. aureus* 194R (б). Слева: I фракция сухого концентрата КЖ в растворе с H₂O дист. в различных разведениях, внесённая в лунки; справа: диски с антибиотиками (а) 1-цефтазидим, 2-амикацин, 3-цефепим, 4-имепенем и 5-меропенем и (б) 6-ванкомицин, 7-цефазолин, 8-оксациллинол и 9-цефалексин.

При совместном глубинном культивировании штамма Vsk-26a3 с клетками грибных патогенов (*C. albicans* и *F. culmorum*) обнаружили, что Vsk-26a3 способен к адгезии на поверхности патогенов (рис. 5).

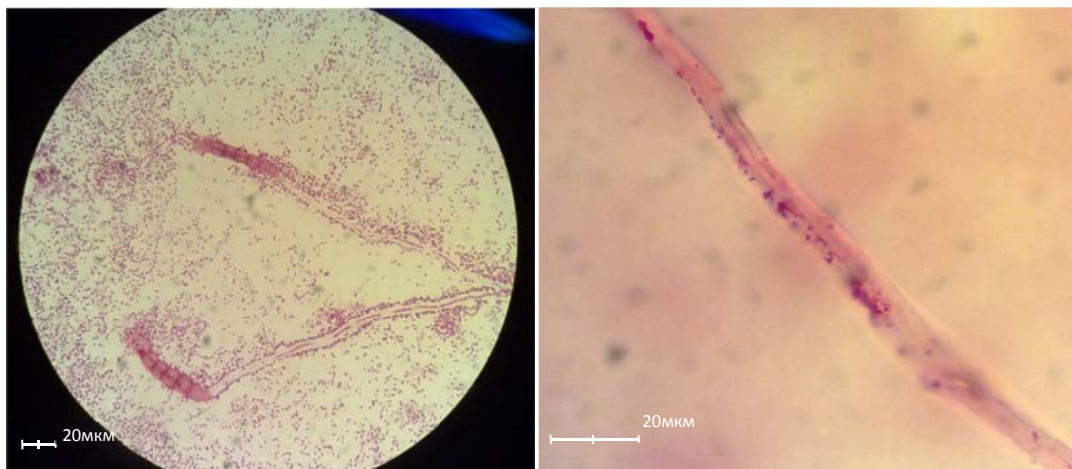


Рисунок 5 - Микроскопия мазка КЖ при совместном глубинном культивировании *P. chlororaphis* Vsk-26a3 и *F. culmorum* №23

Антагонистическая активность Vsk-26a3 в отношении патогенов, вызывающих заболевания сельскохозяйственных растений, оказалась на уровне известных продуцентов средств защиты растений *B. subtilis* ИПМ-215, *B. subtilis* 26Д и *P. fluorescens* P469, однако эти штаммы оказались активными только при температуре культивирования 28 °С, в условиях же низких температур (2÷8 °С) активным в отношении фитопатогена, вызывающего «снежную плесень» при выращивании озимой пшеницы (гриб *M. nivale*) оказался только Vsk-26a3 (таб. 3).

Таблица 3 – Активность штаммов-продуцентов биопрепаратов в отношении бактериальных и грибных фитопатогенов

Штамм-продуцент	Степень подавления фитопатогена						
	<i>F. graminearum</i> №32	<i>M. nivale</i>	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>Micrococcus luteus</i> МГУ-4	<i>Xantomonas phaseoli</i>	<i>Erwinia carotovora</i>
	28 °С	8 °С	28 °С	28 °С	28 °С	28 °С	28 °С
<i>P. chlororaphis</i> Vsk-26a3	+++	+++	++	++	+++	+++	+++
<i>B. subtilis</i> ИПМ-215 (бактофит)	+++	+	++	+	++	+	++
<i>P. fluorescens</i> P469 (пат. РФ 2235771)	+++	0	++	++	+	+	+++
<i>B. subtilis</i> 26Д (фитоспорин)	++	0	-	-	-	-	-

Примечание: (-) – нет данных, (0) - отсутствие зон, (+) - наличие зоны угнетения роста патогена, (++) - наличие зоны лизиса, (+++) – наличие обширной зоны лизиса между штаммами

Таким образом, новый штамм *P. chlororaphis* Vsk-26a3 обладает фосфатрастворяющими свойствами и антагонистической активностью по отношению к возбудителям бактериальной и грибной природы, причем и в условиях пониженных температур. Антагонистическая активность присутствует как у клеток штамма, так и в бесклеточных фильтратах культуральной жидкости.

При изучении устойчивости антимикробных метаболитов к температуре оказалось, что они не теряют своей антимикробной активности после обработки при температуре до 100 °С в течение 30 мин, устойчивы к действию трипсина при 37 °С в течение 4 ч, сохраняют активность при хранении при (5±3) °С в течение 2-х лет. Это свидетельствует о небелковой природе этих соединений. Методом диализа установили, что размер молекул активных метаболитов менее 1 кДа.

Далее изучали механизм, обеспечивающий проявление антагонистической активности штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3. Для выделения активных метаболитов с целью их дальнейшего разделения проводили экстракцию КБФ КЖ штамма Vsk-26a3 хлороформом, т.к. в нём проходила наилучшая экстракция. Антагонистическую активность полученных упаренных экстрактов проверяли методом диффузии в агар. Выявили, что наибольшим антимикробным действием обладает хлороформный экстракт (ХЭ).

Для разделения активных метаболитов использовали метод тонкослойной хроматографии (ТХС). Для оптимизации процесса разделения компонентов использовали разные системы элюентов. На рис.6 представлены пластины после обработки двумя разными системами растворителей для разделения фракций ХЭ КБФ КЖ. И визуально, и при УФ облучении (при длине волны 254 и 365 нм) на пластинах наблюдали пятна различной интенсивности окрашивания.

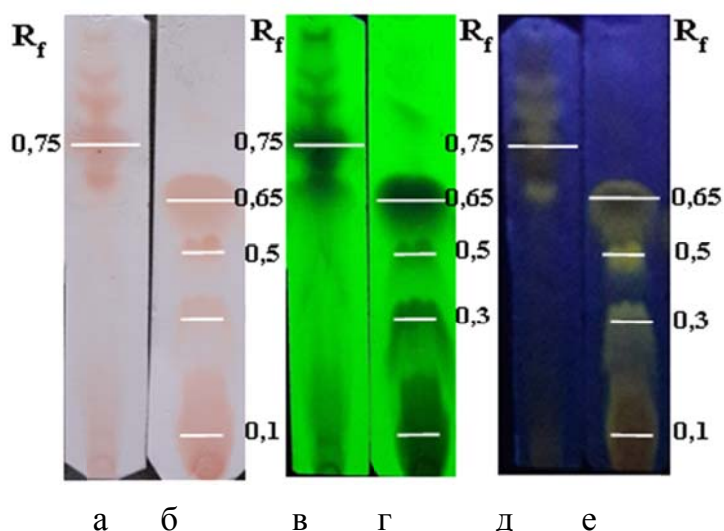


Рисунок 6 - Хроматограммы хлороформного экстракта БКФ КЖ штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3 при видимом свете (а,б) и при УФ облучении (в,г - 254 нм; д,е - 365 нм) после элюирования в смеси хлороформа с ледяной уксусной кислотой 9:1 (а, в, д) и хлороформа с этилацетатом 15:1 (б, г, е)

Для выявления антимикробной активности компонентов, разделённых на хроматографических пластинах, применяли биоавтографический метод (рис. 7).

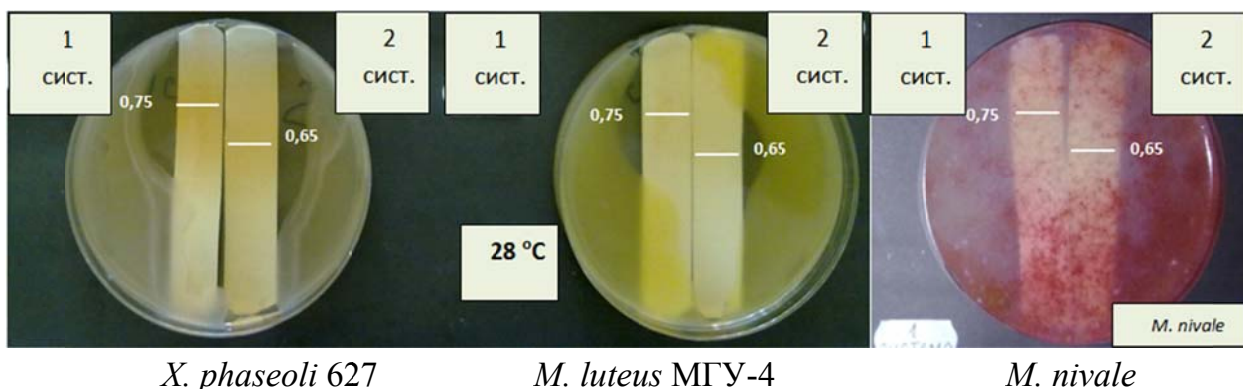


Рисунок 7 - Биоавтографическое выявление активных компонентов хлороформного экстракта БКФ КЖ штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3 в отношении *X. phaseoli* 627, *M. luteus* МГУ-4, *M. nivale*: в каждой чашке левая пластинка обработана смесью хлороформа с ледяной уксусной кислотой 9:1 (1 система), правая – смесью хлороформа с этилацетатом 15:1 (2 система).

Из сопоставления рис. 6 и рис. 7 видно, что наибольшие зоны подавления соответствуют наиболее темным пятнам в УФ области на пластине.

Экстракцией отдельных пятен на ТСХ пластинах выявили, что штамм Vsk-26a3 одновременно продуцирует не менее 7 антимикробных метаболитов, не менее четырёх из которых экстрагируются хлороформом (рис. 8).

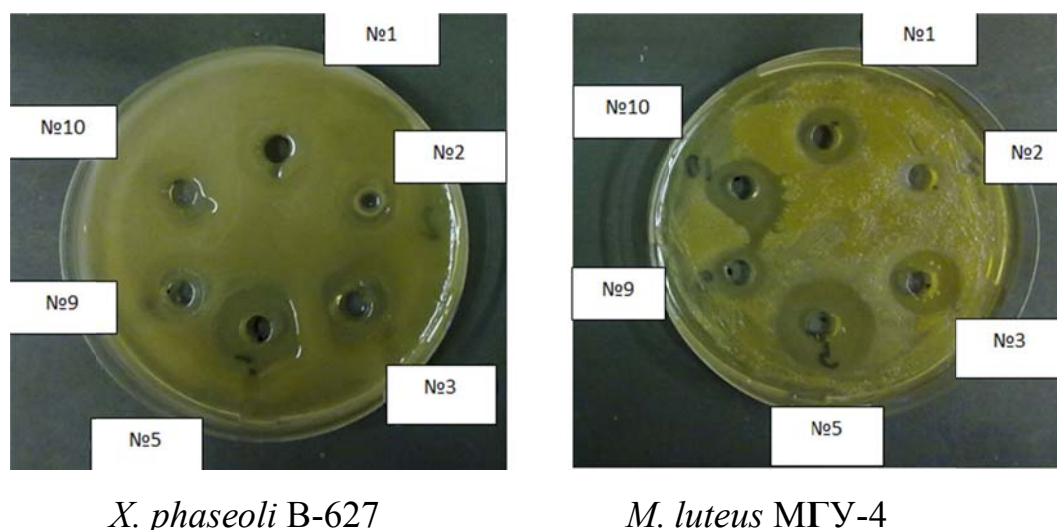


Рисунок 8 – Антибактериальная активность различных фракций ХЭ БКФ КЖ штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3, выделенных с хроматографических пластин: №1 - $R_f = 0,5$, №2 - $R_f = 0,3$, №3 - $R_f = 0,1$, №5 - $R_f = 0,65$; №9 - $R_f = 0,1$ (фильтрат) и №10 - $R_f = 0,65$ (фильтрат)

С помощью газовой хроматографии определили основную антимикробную фракцию (№5 с $R_f = 0,65$) как 2,4-диацетилфлороглюцин (2,4-ДАФГ), антибиотик широкого спектра действия, эффективный против бактерий, грибов, вирусов и нематод [Смирнов, 1990; Боронин, 1998].

Показали, что штамм Vsk-26a3 продуцирует антимикробные пигменты - производные 2-оксифеназина. Окраска пятен на хроматограммах усиливалась

после обработки формалином (рис. 9), что определенно указывает на присутствие 2-оксифеназинов в составе антимикробного комплекса [Thomashow, 1992].

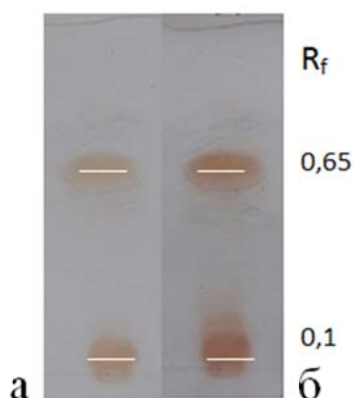


Рисунок 9 – Хроматограмма хлороформного экстракта БКФ КЖ штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3: а – до обработки формалином; б – после обработки формалином, для определения присутствия 2-оксифеназина

Таким образом, показали, что штамм Vsk-26a3 синтезирует одновременно не менее 7 антимикробных компонентов. Основным метаболитом, обеспечивающим антимикробную активность его, является 2,4-диацетилфлороглюцин. Кроме того, штамм Vsk-26a3 также продуцирует пигменты - производные 2-оксифеназина.

Получение экспериментальных образцов препаратов на основе штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3 и его метаболитов

Чтобы оценить технологические возможности культуры Vsk-26a3 как потенциального продуцента биопрепарата – на следующем этапе проводили оптимизацию состава питательных сред и условий культивирования для увеличения выхода биомассы и антимикробных продуктов. В сериях экспериментов подобрали оптимальные параметры процессов культивирования: источники углерода, азота, рН среды и длительность культивирования. Оптимальную температуру для синтеза биомассы, равную 25 °С, определяли по максимальной удельной скорости роста. Процесс культивирования контролировали отбором промежуточных и заключительных проб, подсчётом концентрации клеток и определением их антимикробной активности на тестовых культурах, на патогенах человека и растений (*M. luteus*, *X. campestris* sp. *phaseoli* ВКМ-627, *C. albicans*, грибах рода *Fusarium*, *M. nivale*).

Оказалось, что штамм Vsk-26a3 имеет такую же противомикробную активность при 28 °С через 24 ч культивирования, как и при 15 °С, если увеличить время культивирования до 35 ч (рис. 10). Этот факт объясняет наличие антимикробной активности штамма при пониженных температурах.

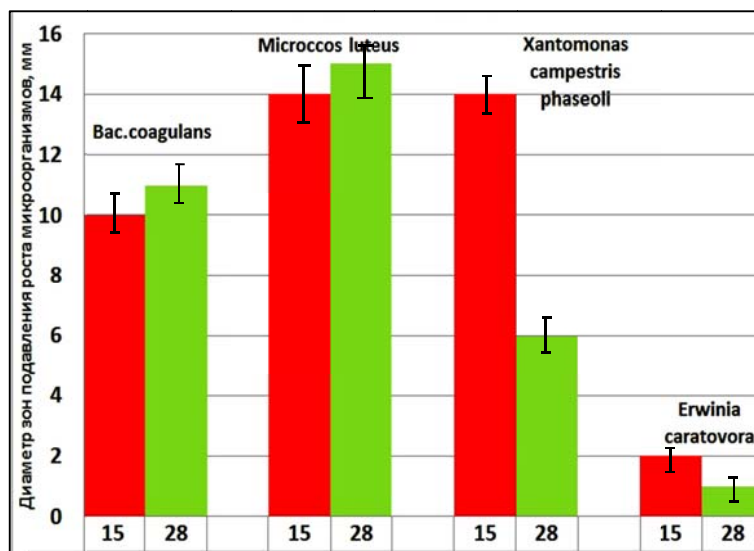


Рисунок 10 – Влияние температуры культивирования штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3 на величину зоны подавления роста патогенов: *B. coagulans*, *M. luteus*, *X. campestris* и *E. caratovora*

Для решения задачи по оптимизации среды и условий культивирования использовали программное обеспечение IMMD (интегрированная математическая модель развития) [Клыков, 2009, 2011]. На рис. 11 представлен график динамики выхода биомассы штамма Vsk-26a3 при глубинном культивировании, полученный с помощью IMMD. Математическая модель прогнозирует дальнейший небольшой прирост биомассы (синяя пунктирная линия) при условии дополнительной подачи лимитирующих процесс компонентов питательной среды.

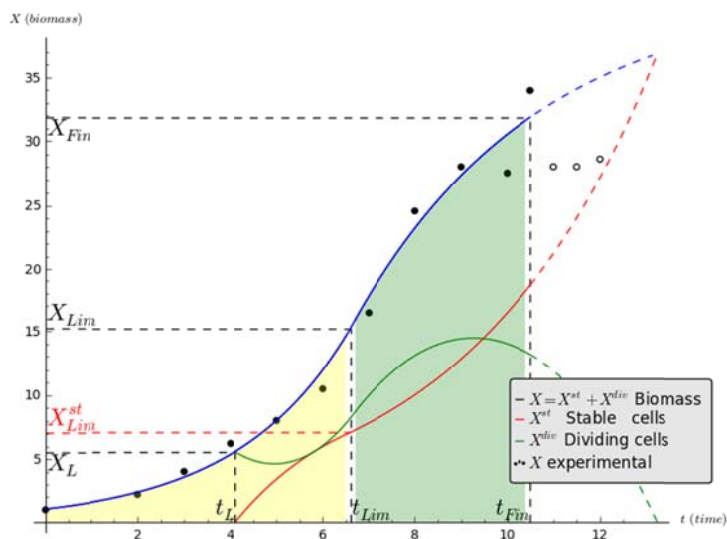


Рисунок 11 - Динамика выхода биомассы штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3 при глубинном культивировании

По результатам проведенных исследований предложили 2 рецептуры минеральных питательных сред для глубинного культивирования продуцента в ферментерах: среда №1 для культивирования с оптимальным количественным

соотношением биомассы и антимикробных метаболитов (таб. 4) и среда №2 для обеспечения максимального синтеза активных метаболитов (таб. 5).

Таблица 4 - Состав питательной среды №1 для наработки биомассы и метаболитов штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3

№	Компонент	Концентрация, г/л
1	Глицерин	10,0
2	Хлорид аммония	6,0
3	Калия фосфат 1-замещённый	3,0
4	Калия фосфат 2- замещённый	6,0
5	Магния сульфат	0,5
6	Дрожжевой экстракт	4,0
7	Натрия хлорид	4,0
8	Микроэлементы	10,0 мл
9	Вода	До 1 л

pH = 6,5÷7,0

Таблица 5 - Состав питательной среды №2 для максимального получения антимикробных метаболитов штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3

№	Компонент	Концентрация, г/л
1	Сульфат аммония	2,0
2	Калия фосфат 1-замещённый	1,5
3	Калия фосфат 2- замещённый	3,0
4	Магния сульфат	0,5
5	Цитрат натрия х7 Н ₂ О	0,25
6	Микроэлементы	10,0 мл
7	Глицерин	10,0
8	Вода	До 1 л

pH = 6,5÷7,0

Сравнительный анализ антагонистической активности БФ КЖ штамма Vsk-26a3 выращенного на среде №2 и классических питательных средах для псевдомонад: средой LB и модифицированной средой Кинга В, показал большую эффективность среды №1 и №2 (таб. 6).

Таблица 6 – Сравнение различных сред культивирования на выход биомассы и антагонистическую активность метаболитов штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3 (температура культивирования 28 °С, время -24 ч)

Среда	Выход жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	Размер зон подавления БФ КЖ, мм		
		<i>X. phaseoli</i>	<i>E. carotovora</i>	<i>M. luteus</i>
LB	$1,6 \pm 0,32 \times 10^{10}$	(3±0)*	(3±0)*	(4±0)*
Кинг В	$1,9 \pm 0,39 \times 10^{10}$	1±0	(2±0)*	1±0
Среда №1	$1,6 \pm 0,33 \times 10^{10}$	9±1	2±0	9±1
Среда №2	$1.0 \pm 0,20 \times 10^{10}$	13±1	3±0	14±1

Примечание – (*) – угнетение

Расчет себестоимости сред №1 и №2 по сырью, которая является основной переменной величиной в структуре себестоимости, составил 481,79-1121,64 руб за 100л среды, что в 2,0-7,1 раз дешевле общепринятых сред для псевдомонад (среды LB и Кинг В). Поэтому, разработанные среды являются экономически предпочтительными для использования в промышленном изготовлении препаратов на основе штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3.

Комплексную схему изготовления биопрепаратов на основе предлагаемого продуцента можно представить следующим образом: после стадий биосинтеза и разделения культуральной жидкости, все полученные компоненты используются для получения конечных продуктов. Клеточная масса высушивается, а фугат после микрофилтрации перерабатывается вакуум-выпаркой в жидкий концентрат, или распылительной сушкой - в сухой препарат.

Предложенную технологию использовали при разработке лабораторного регламента на производство комплексного биопрепарата против снежной плесени на основе *P. chlororaphis* Vsk-26a3 (ЛР 78095326-15-153-2015). По этой технологии изготовили экспериментальные образцы в виде сухих порошков с концентрацией $(4\div 6)\times 10^{11}$ КОЕ/г для полевых испытаний.

Испытания экспериментальных образцов препарата в полевых условиях

Экспериментальный образец комплексного биопрепарата (сочетающего фосфатрастворяющую и фунгицидную активность) на основе высушенных клеток штамма Vsk-26a3 испытали в 4 полевых опытах в 2 независимых научно-исследовательских организациях Рязанской области на яровой мягкой пшенице, сое, озимой мягкой пшенице и озимой мягкой пшенице с искусственным инфекционным фоном. Во всех вариантах испытаний применяли предпосевную обработку семян. В вариантах с искусственным инфицированием использовали также обработку растений по вегетации.

На яровой мягкой пшенице применение экспериментального образца в дозе 0,5 кг/т позволило получить достоверную увеличение урожая относительно контроля на 0,69 т/га (23,4%) за счет увеличения полевой всхожести семян и формирования более крупного зерна (таб.7).

Таблица 7 - Урожайность яровой мягкой пшеницы, т/га

НСР₀₅= 0,27

Вариант	Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
Контроль	2,95	-	-0,62	-0,55
Эталон хим	3,57	+0,62	-	+0,07
Эталон-био	3,50	+0,55	-0,07	-
Vsk-26a3 1,0 кг/т	3,45	+0,50	-0,12	-0,05
Vsk-26a3 0,5 кг/т	3,64	+0,69	+0,07	+0,14

В опыте на сое обработка экспериментальным образцом в дозе 1,0 кг/т позволила получить достоверное увеличение урожая относительно контроля на 0,28 т/га (15,8%), относительно химического эталона на 0,23 т/га (12,6%), относительно биологического эталона на 0,26 т/га (14,5%) за счёт массы 1000 семян, выхода массы семян с одного растения, высоты растения.

На озимой мягкой пшенице без искусственного инфицирования применение экспериментального образца в дозе 1,0 кг/т позволило получить достоверное увеличение урожая относительно контроля на 0,78 т/га (23,6%), относительно эталона химического на 0,84 т/га (25,9%), относительно эталона биологического на 0,26 т/га (6,8%) за счет увеличения полевой всхожести семян, лучшей перезимовки и формирования более крупного зерна.

В проведенных опытах результат достигнут за счет ростостимулирования и обогащения почвы фосфором, инфекционный фон был пониженным. Поэтому, прибегли к принудительному инфицированию растений озимой пшеницы возбудителем «снежной плесени» - психрофильным грибом *M. nivale* (рис. 12).

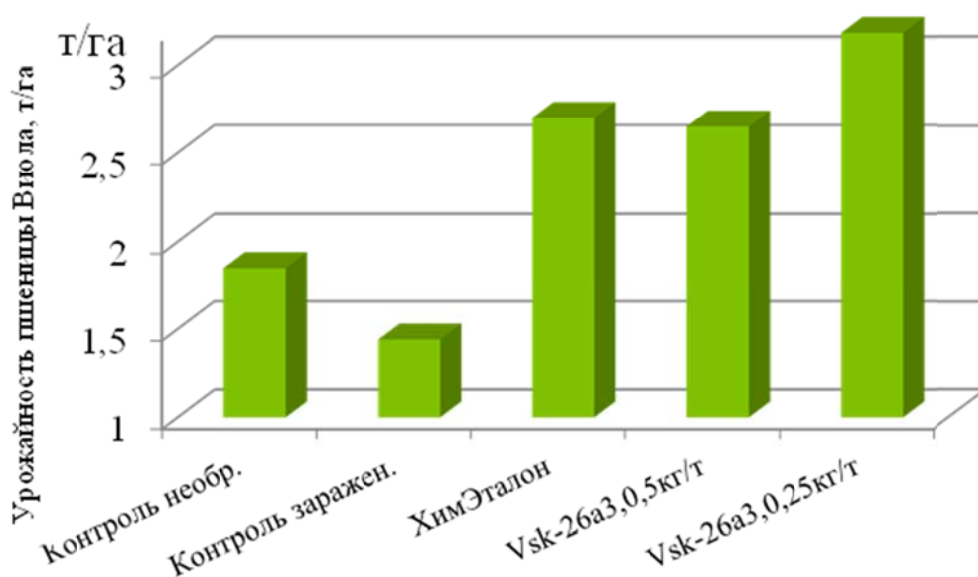


Рисунок 12 - Урожайность озимой мягкой пшеницы сорта Виола при использовании искусственного заражения *M. nivale*, т/га

Применение экспериментального образца штамма Vsk-26a3 в дозе 0,25 кг/т в полевых испытаниях на озимой мягкой пшенице при искусственном заражении возбудителями *M. nivale* позволило получить достоверное увеличение урожая относительно незараженного контроля на 1,33 т/га (71,9%), относительно искусственно заражённого контроля на 1,74 т/га (121%), относительно эталона химического на 0,48 т/га (18%) за счёт увеличения процента перезимовки, высоты растений, длины колоса, числа зёрен с колоса и массы 1000 зёрен.

ВЫВОДЫ

1. Отобран наиболее активный психрофильный штамм и идентифицирован как *Pseudomonas chlororaphis* ssp. *chlororaphis* - антагонист бактериальных и грибных патогенов растений, человека и животных. Изучены его культурально-морфологические и биохимические свойства.

2. Штамм *P. chlororaphis* Vsk-26a3 и его БФ КЖ обладает ростостимулирующими свойствами. Штамм безопасен для животных и не фитотоксичен.

3. Выявлена способность штамма Vsk-26a3 к мобилизации фосфора непосредственно из фосфатных руд. Определён механизм мобилизации фосфатов из нерастворимого минерального сырья за счет синтеза группы глюконовых кислот.

4. Штамм совместим с основными агрохимикатами, применяемыми в растениеводстве.

5. Выявлена различная степень активности штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3 против 83 из 93 исследованных грибных и бактериальных патогенов растений, человека и животных.

6. Доказана антифунгальная активность штамма при низких температурах (2÷8) °С.

7. Штамм Vsk-26a3 синтезирует низкомолекулярные термостабильные антимикробные метаболиты, устойчивые к ферменту трипсин, не теряющие антагонистической активности более чем за 2 года хранения при (5±3) °С.

8. Синтез одновременно нескольких антимикробных метаболитов является основным механизмом антагонистического действия штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3.

9. Штамм Vsk-26a3 синтезирует одновременно не менее 7 антимикробных компонентов. Идентифицирован основной антимикробный метаболит - 2,4-диацетилфлороглюцин. Показано, что штамм Vsk-26a3 также продуцирует антимикробные пигменты - производные 2-оксифеназина.

10. Предложен состав питательных сред и условия культивирования штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3 с целью получения биомассы и синтеза антимикробных метаболитов. Разработан лабораторный регламент на производство комплексного биопрепарата против снежной плесени на основе *P. chlororaphis* Vsk-26a3 ЛР 78095326-153-2015.

11. Полученный экспериментальный образец биопрепарата на основе *P. chlororaphis* Vsk-26a3 показал эффективность в полевых испытаниях на культурах сои, яровой, озимой пшениц, в том числе при искусственном инфицировании возбудителем снежной плесени.

12. На основании результатов проведенных испытаний штамм *P. chlororaphis* Vsk-26a3 может быть рекомендован, как продуцент антимикробных веществ, а также для создания на его основе биопрепаратов с ростостимулирующими, антимикробными, фосфатрастворяющими свойствами.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

а) статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Дунайцев, И.А. Фосфатмобилизующие микроорганизмы – антагонисты фитопатогенов / И.А. Дунайцев, Л.В. Коломбет, С.К. Жиглецова, Е.В. Быстрова, С.Г. Бесаева, **М.В. Клыкова**, Т.Н. Кондрашенко // Микология и фитопатология.- 42, вып. 3.- 2008.- С. 264-269.

2. Дунайцев, И.А. Эффективность экспериментальных образцов микробиологических фосфорных удобрений на ячмене. / И.А. Дунайцев, А.А. Старшов, В.В. Перелыгин, **М.В. Клыкова**, Т.Н. Кондрашенко. // Агро XXI.- 2008. - №1-3. - С. 35-36.

3. Жиглецова, С.К. Высвобождение фосфатов из нерастворимого минерального сырья грибами рода *Trichoderma* - антагонистами фитопатогенов. С.К. Жиглецова, А.А. Старшов, И.А. Дунайцев, Т.Н. Кондрашенко, **М.В. Клыкова**, А.В. Ариповский, Л.В. Коломбет // Иммунопатология, аллергология, инфектология.-2009.- № 1.- С. 81-82.

4. Жиглецова, С.К. Совместное использование микроорганизмов с фосфатрастворяющими и фунгицидными свойствами для повышения урожайности и защиты зерновых культур от фузариозов / С.К. Жиглецова, А.А. Старшов, **М.В. Клыкова**, Т.Н. Кондрашенко, О.А. Антошина, И.А. Дунайцев, Л.В. Коломбет // Агрехимия.- 2015.- № 7.- С. 49-57.

5. Дунайцев, И.А. Эффективность использования фосфатрастворяющих микроорганизмов в составе гранулированных биоудобрений с фосфатной рудой. / И.А. Дунайцев, А.Н. Сомов, С.Н. Вирясов, А.А. Старшов, Т.Н. Кондрашенко, **М.В. Клыкова**, С.К. Жиглецова // Политем. сетевой эл. научн. ж-л Кубанского государственного аграрного университета [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2016. – №03(117). – IDA [article ID]: 1171603014. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2016/03/pdf/14.pdf>. - 18с.

б) патенты:

6. Патент РФ № 2451068. Фосфатрастворяющий штамм *Acinetobacter species* 305 с фунгицидными свойствами. / И.А. Дунайцев, **М.В. Клыкова**, Т.Н. Кондрашенко, А.А. Старшов, С.К. Жиглецова, А.С. Бойко, И.А. Дятлов // Бюл. № 14. – 2012.

7. Патент РФ 2451069. Фосфатрастворяющий штамм *Pseudomonas species* 181a с фунгицидными свойствами. / И.А. Дунайцев, **М.В. Клыкова**, Т.Н. Кондрашенко, А.А. Старшов, А.Н. Сомов, Р.С. Аитов, И.А. Дятлов // Бюл. № 14. – 2012.

в) статьи в других рецензируемых журналах

8. Дунайцев, И.А. Солюбилизация фосфатов микроорганизмами-супрессорами фитопатогенов. / И.А. Дунайцев, С.К. Жиглецова, С.Г. Бесаева, **М.В. Клыкова**, А.В. Ариповский, Т.Н. Кондрашенко, Л.В. Коломбет // Межд. организация по биол. борьбе с вредными животными и растениями.- Инф. Бюллетень 38.- Санкт-Петербург, 2007.- С. 120-123.

9. Dunaitsev, I.A. Solving of ecological problems by using of direct microbial phosphate mobilization from phosphate containing wastes [Электронный ресурс] /

I.A. Dunaitsev, S.K. Zhigletsova, R.S. Aitov, **M.V. Klykova**, T.N. Kondrashenko, A.A. Starshov, A.S. Boiko, I.A. Dyatlov // Journal of International Scientific Publications: Ecology & Safety.– 2012. – V.6, Part 1. - P. 226-232. – Режим доступа: www.scientific-publications.net/download/ecology-and-safety-2012-1.pdf .

10. Zhigletsova, S.K. Development of microbiological phosphate fertilizer with fungicidal activity [Электронный ресурс] / S.K. Zhigletsova, I.A. Dunaitsev, L.V. Kolombet., **M.V. Klykova**, T.N. Kondrashenko, A.A. Starshov, O.A. Antoshina, O.V. Gladysheva, N.S. Larina // Journal of International Scientific Publications: Ecology & Safety. – 2012. – V.6, Part 2. - P. 100-108. - Режим доступа: www.scientific-publications.net/download/ecology-and-safety-2012-2.pdf.

11. **Клыкова, М.В.** Влияние различных факторов на биосинтез штаммом *Pseudomonas sp.* метаболитов, активных в отношении грибных патогенов. / **М.В. Клыкова**, И.А. Дунайцев, И.О. Лев, С.К. Жиглецова, Т.Н. Кондрашенко // Успехи медицинской микологии.- 2014.- Т. 12.- С. 410-412.

г) тезисы докладов на научных конференциях:

12. Дунайцев, И.А. Разработка микробных препаратов для решения задач экологической и продовольственной безопасности. / И.А. Дунайцев, С.К. Жиглецова, Л.В. Коломбет, С.Г. Бесаева, **М.В. Клыкова**, Т.Н. Кондрашенко.// Материалы 2-го Межд. экол. форум «окружающая среда и здоровье человека», С-Пб, 1-4 июля 2008, // Вестник Рос. Воен.-Мед. Академии, 2008.- 3 (23).- прил. 2.- С. 311.

13. Жиглецова, С.К. Высвобождение фосфатов из нерастворимого минерального сырья грибами рода *Trichoderma* - антагонистами фитопатогенов / С.К. Жиглецова, А.А. Старшов, И.А. Дунайцев, Т.Н. Кондрашенко, **М.В. Клыкова**, А.В. Ариповский, Л.В. Коломбет // Иммунопатология, аллергология, инфектология. Труды междисциплинарного микологического форума. - 2009. - №1. - С. 81-82.

14. Жиглецова, С.К. Определение механизма высвобождения фосфора из различных видов фосфатных руд под действием штамма №16- GJS 03-35 *Trichoderma asperellum* - антагониста фитопатогенов / С.К. Жиглецова. И.А. Дунайцев, Т.Н. Кондрашенко, А.В. Ариповский., **М.В. Клыкова**, А.А. Старшов, Л.В. Коломбет // Иммунопатология, аллергология, инфектология. Труды междисциплинарного микологического форума. - 2010. - №1. - С. 249.

15. Ларина, Н.С. Исследование ростстимулирующей активности штаммов-антагонистов фитопатогенов, обладающих одновременно фосфатрастворяющими свойствами. / Н.С. Ларина, А.И. Векшин, А.А. Старшов, **М.В. Клыкова**, И.А. Дунайцев, С.К. Жиглецова // В кн.: Современные технологии обеспечения биологической безопасности III научно-практическая школа-конференция молодых ученых и специалистов: материалы конференции. ФБУН ГНЦ ПМБ.- 2011.- С. 278-281.

16. **Клыкова, М.В.** Поиск штаммов микроорганизмов потенциально активных в отношении бактериальных и грибных патогенов сельскохозяйственных культур /

М.В. Клыкова, И.А. Дунайцев, С.К. Жиглецова, А.А. Старшов, Н.С. Ларина, Т.Н. Кондрашенко // В кн.: Современная микология в России 3-й съезд микологов России.- 2012.- С. 341.

17. Старшов, А.А. Использование фосфатрастворяющих и фунгицидных свойств микроорганизмов для улучшения фосфорного питания и защиты зерновых культур от фузариоза колоса. / А.А. Старшов, Л.В. Коломбет, И.А. Дунайцев, С.К. Жиглецова, **М.В. Клыкова**, Т.Н. Кондрашенко, О.А. Антошина, О.В. Гладышева // В сб.: Современная микология в России 3-й съезд микологов России.- 2012.- С. 354-355.

18. **Клыкова, М.В.** Скрининг микроорганизмов-антагонистов, активных в отношении бактериальных и грибных патогенов / **М.В. Клыкова**. И.А. Дунайцев, И.О. Лев, Н.С. Ларина, С.К. Жиглецова // Проблемы медицинской микологии. 2013.- Т. 15.- № 2.- С. 87.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

БФ КЖ	бесклеточный фильтрат культуральной жидкости
ГНЦПМБ	Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
ГРМ	гидролизат рыбной муки
ГК	глюконовая кислота
ГХ	газовая хроматография
2,4-ДАФГ	2,4-диацетилфлороглюцин
КГА	картофельно-глюкозный агар
КГК	кетоглюконовая кислота
КЖ	культуральная жидкость
КОЕ	колониеобразующие единицы млрд/мл, млрд/г
КБФ КЖ	бесклеточный концентрат фильтрата культуральной жидкости
МПА	мясопептонный агар
НИИСХ	научно-исследовательский институт сельского хозяйства
НСР ₀₅	наименьшая существенная разница при 5%-ном уровне значимости
ОП	оптическая плотность
ТСХ	тонкослойная хроматография
ФРМ	фосфатрастворяющие микроорганизмы
ХЭ	хлороформенный экстракт
pH	водородный показатель активности ионов водорода, количественно отражающий кислотность среды
R _f	отношение расстояния от старта до центра пятна при ТСХ к расстоянию, пройденному линией фронта растворителя