

**Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации
Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека**

**Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»**

На правах рукописи

КЛЫКОВА

Марина Викторовна

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММА
PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS Vsk-26a3 В КАЧЕСТВЕ ПРОДУЦЕНТА
АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Специальность:

03.02.03 – микробиология

03.01.06 – биотехнология

(в том числе бионанотехнологии)

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: кандидат биологических наук И.А. Дунайцев

Научный консультант: доктор биологических наук Л.В. Коломбет

Оболенск – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Поиск новых средств борьбы с патогенами растений.....	16
1.2. Свойства бактерий рода <i>Pseudomonas</i> как потенциальных продуцентов биологически активных веществ для использования в сельском хозяйстве, экологии и медицине.....	21
1.2.1. Бактерии рода <i>Pseudomonas</i> как симбионты растений.....	21
1.2.2. Прямое положительное воздействие псевдомонад на растения.....	23
1.2.3. Опосредованное воздействие бактерий рода <i>Pseudomonas</i> на растения.....	24
1.2.4. Основные механизмы антагонистического воздействия псевдомонад на патогены.....	25
1.2.5. Формирование резистентности к фитопатогенам.....	30
1.2.6. Использование Quorum Sensing систем для медицины и сельского хозяйства.....	31
1.3. Разработка биопрепаратов на основе бактерий рода <i>Pseudomonas</i>	32
1.3.1. Скрининг микроорганизмов-антагонистов...	32
1.3.2. Культивирование псевдомонад и биосинтез ими антимикробных метаболитов.....	33
1.4. Использование антимикробных свойств бактерий рода <i>Pseudomonas</i> для создания готовых форм биопрепаратов.....	34
1.4.1. Практические аспекты применения биопрепаратов на основе псевдомонад в сельском хозяйстве.....	34
1.4.2. Применение псевдомонад для решения экологических проблем.....	37
1.4.3. Возможности использования псевдомонад в медицине.....	39
1.5. Заключение по обзору литературы.....	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1. Штаммы микроорганизмов и среды культивирования.....	43

2.2.	Биологические свойства штамма <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3.....	44
2.2.1.	Изучение культурально-морфологических, биохимических свойств.....	44
2.2.2.	Определение фитотоксичности фосфатрастворяющих штаммов	44
2.2.3.	Оценка безвредности штамма Vsk-26a3.....	45
2.3.	Определение способности штамм <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3 к мобилизации фосфора.....	45
2.4.	Определение активности штамма <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3 в отношении патогенов растений, животных и человека.....	50
2.5.	Оценка штамма <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3 на совместимость с современными пестицидами в лабораторном эксперименте.....	52
2.6.	Исследование устойчивости антимикробной активности <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3 к различным факторам.....	53
2.7.	Определение механизмов антагонистического действия штамма <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3.....	54
2.7.1.	Способность к адгезии штамма Vsk-26a3 по отношению к патогенам растений	54
2.7.2.	Разделение и определение антимикробных метаболитов штамма Vsk-26a3 методом ТСХ.....	55
2.7.3.	Биоавтографический метод выявления антимикробной активности компонентов, разделённых методом ТСХ.....	56
2.7.4.	Газохроматографическое определение активных метаболитов.....	57
2.8.	Оптимизация состава питательных сред на колбах.	58
2.9.	Периодическое культивирование <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3 в ферментере с целью получения биомассы и антимикробных метаболитов.....	59
2.10.	Методы получения экспериментальных образцов биопрепаратов на основе <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3.....	60
2.11.	Методики деляночных полевых испытаний экспериментальных образцов препарата на основе штамма <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3.....	60

2.11.1.	Деляночные полевые испытания на яровой мягкой пшенице.....	61
2.11.2.	Деляночные полевые испытания на сое.....	62
2.11.3.	Деляночные полевые испытания на озимой пшенице без искусственного инфицирования.....	63
2.11.4.	Деляночные полевые испытания на озимой мягкой пшенице при искусственном заражении возбудителями снежной плесени.....	64
ГЛАВА 3.	ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	67
3.1.	Поиск нового активного психрофильного штамма-антагониста как потенциального продуцента для использования в антимикробном препарате.....	67
3.1.1.	Оценка антагонистических свойств фосфатрастворяющих микроорганизмов...	67
3.1.2.	Изучение активности отобранных штаммов-антагонистов при пониженных температурах.....	71
3.1.3.	Определение фитотоксичности штаммов-антагонистов.....	71
3.1.4.	Определение безопасности штаммов-антагонистов для теплокровных животных	72
3.1.5.	Заключение по разделу 3.1.....	72
3.2.	Изучение культурально-морфологических, биохимических свойств и биобезопасности штамма <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3.....	73
3.2.1.	Культурально-морфологические и биохимические свойства штамма Vsk-26a3	73
3.2.2.	Определение фитотоксичности штамма Vsk-26a3	74
3.2.3.	Выявление способности штамма Vsk-26a3 к мобилизации фосфора из минеральных источников сырья.....	75
3.2.4.	Исследование совместимости штамма Vsk-26a3 с современными пестицидами в лабораторных условиях (<i>in vitro</i>).....	78
3.2.5.	Заключение по разделу 3.2.....	79
3.3.	Исследование активности штамма <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3 в отношении патогенов растений, животных и человека.....	80
3.3.1.	Изучение антифунгальной активности штамма Vsk-26a3.....	80
3.3.2.	Изучение антибактериальной активности	

	штамма Vsk-26a3.....	83
3.3.3.	Определение чувствительности некоторых бактерий к антимикробным метаболитам штамма Vsk-26a3.....	85
3.3.4.	Сравнение антимикробной активности штамма Vsk-26a3 с другими известными штаммами-антагонистами.....	87
3.3.5.	Изучение влияния активных метаболитов на исходный штамм Vsk-26a3.....	88
3.3.6.	Заключение по разделу 3.3.....	89
3.4.	Исследование стабильности антимикробной активности штамма <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3 под влиянием различных факторов.....	90
3.5.	Исследование механизмов антагонистического действия штамма Vsk-26a3	92
3.5.1.	Конкуренция штамма Vsk-26a3 за питательный субстрат.....	97
3.5.2.	Определение гиперпаразитизма штамма Vsk-26a3 по отношению к патогенам	98
3.5.3.	Исследование состава антимикробных метаболитов штамма <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk- 26a3.....	94
3.5.3.1	Разделение активных метаболитов	94
3.5.3.2	Определение состава наиболее активной антимикробной фракции БКФ КЖ штамма Vsk-26a3.....	98
3.5.3.3	Определение других антимикробных метаболитов штамма Vsk-26a3.....	101
3.5.4.	Заключение по разделу 3.5.....	105
3.6.	Разработка методов получения экспериментальных образцов препаратов на основе штамма <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3 и его метаболитов.....	106
3.6.1.	Оптимизация состава питательных сред и условий глубинного культивирования.....	106
3.6.2.	Оптимизация глубинного культивирования с целью производства биомассы.....	113
3.6.3.	Оптимизация глубинного культивирования с целью синтеза активных метаболитов.....	114
3.6.4.	Изготовление экспериментальных образцов биопрепаратов.....	120
3.6.5.	Заключение по разделу 3.6.....	122

3.7. Испытания экспериментальных образцов препарата в полевых условиях.....	123
3.7.1. Заключение по разделу 3.7.....	131
3.8. Рекомендации по использованию штамма Vsk- 26a3 с целью повышения урожайности зерновых и бобовых культур.....	131
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	132
ВЫВОДЫ.....	138
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	139
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	140
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	158

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

АГЛ	–	ацетил-гомосеринлактоны
биоПАВ	–	ПАВ биологического происхождения
БСТФА	–	бис-(N,O-триметилсилил)-трифторацетамид
БФ КЖ	–	бесклеточный фильтрат культуральной жидкости
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения
ГИСК	–	Государственный институт стандартизации и контроля лекарственных средств им. Л.А. Тарасевича
ГНЦПМБ	–	Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
ГОСТ	–	государственный общероссийский стандарт
ГРМ	–	гидролизат рыбной муки
ГК	–	глюконовая кислота
ГХ	–	газовая хроматография
2,4-ДАФГ	–	2,4-диацетилфлороглюцин
д.в.	–	действующее вещество
ДЭ	–	дрожжевой экстракт
КБФ КЖ	–	концентрат бесклеточного фильтрата культуральной жидкости
КГА	–	картофельно-глюкозный агар
КГК	–	кетоглюконовая кислота
КЖ	–	культуральная жидкость
КОЕ	–	колониеобразующие единицы млрд/мл, млрд/г
МИК	–	минимальная ингибирующая концентрация
МПА	–	мясопептонный агар
НАФ	–	наиболее активная фракция
НИИСХ	–	научно-исследовательский институт сельского хозяйства
НСР ₀₅	–	наименьшая существенная разница при 5%-ном уровне значимости

ОП	– оптическая плотность
2-ОФК	– 2-оксифеназин-1-карбоновая кислота
ПАВ	– поверхностно-активное вещество
ПАУ	– полициклические ароматические углеводороды
РГАТУ	– Рязанский государственный агротехнологический университет им. П.А. Костычева
СЗР	– средства защиты растений
с.п.	– смачивающийся порошок
ТКФ	– трикальций фосфат
ТСХ	– тонкослойная хроматография
УФ	– ультрафиолет, ультрафиолетовый
ФК	– фузариоз колоса
ФР	– фосфатрастворение, фосфатрастворяющ(ий)ие
ФРА	– фосфатрастворяющая активность
ФРМ	– фосфатрастворяющие микроорганизмы
ФТ	– фузариотоксины
ХЭ	– хлороформенный экстракт
PGPR	– Plant Growth-Promoting Rhizobacteria - ризобактерии, способствующие росту растений
pH	– водородный показатель активности ионов водорода, количественно отражающий кислотность среды
pO ₂	– показатель парциального давления растворённого в среде кислорода
R _f	– отношение расстояния от старта до центра пятна к расстоянию, пройденному линией фронта растворителя

ВВЕДЕНИЕ

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» (2006-2008 гг.).

Актуальность проблемы.

С каждым годом возрастает техногенная нагрузка на почву, что оказывает на неё отрицательное влияние. Интенсификация производства продуктов питания предполагает широкое применение удобрений и пестицидов, что приводит к загрязнению почвы и, как следствие, загрязнению продукции растениеводства [65, 68, 66, 69, 71, 95, 126, 128]. Высокие темпы исчерпания мировых запасов фосфорного сырья, дороговизна производства удобрений и ухудшение экологии - это только часть проблем сельскохозяйственной отрасли. В настоящее время, одними из наиболее перспективных становятся биотехнологические способы решения таких задач, как повышение производства высококачественных экологически чистых продуктов за счет современных подходов в восстановлении плодородия почв, экологичных методов защиты урожая от болезней и вредителей, поиска продуцентов новых, более эффективных и безопасных антимикробных средств. Актуальным является вопрос о повышенной устойчивости многих возбудителей заболеваний растений к химическим препаратам, антибиотикам, а также как следствие, накопление в зерне, мясе,

готовых продуктах опасных концентраций микотоксинов, продуцируемых различными грибными патогенами [22, 46, 63, 86]. Стремительно возрастают зараженность полей и вследствие этого потери урожая озимых культур, вызванных поражением психрофильными грибными патогенами *Microdochium nivale* (снежная плесень) [1, 24]. Поиск средств и создание технологий для решения каждой из перечисленных задач требует больших материальных, временных и финансовых затрат. Решение указанных проблем может быть достигнуто за счет поиска и селекции эффективных природных продуцентов, разработки на их основе новых биопрепаратов, безопасных для человека и окружающей среды.

Биологическое разнообразие организмов остается недооцененным ресурсом. Одним из решений задачи по разработке новых антимикробных средств является поиск и выделение продуцентов из природных ниш, отличающихся высокой конкуренцией в биоценозе. В этой связи, большой интерес представляют бактерии семейства *Pseudomonodaceae*, известные как промышленные продуценты, и способные синтезировать широкий спектр разнообразных антибактериальных и антигрибных соединений [6, 9, 15, 54, 53, 100]. Обнаружены и исследованы разнообразные метаболиты псевдомонад (пиоцианины, феназины, триглицеропептиды, бактериоцины и др.), активные в отношении различных возбудителей инфекций человека, животных и растений.

Бактерии рода *Pseudomonas* являются типичными представителями почвенного биоценоза, способны быстро и успешно колонизировать ризосферу растения-хозяина [8, 1, 27, 40, 47, 49, 65, 97]. Представители этой группы микроорганизмов являются не только антагонистами почвенных патогенов, - за счет синтеза широкого спектра антимикробных метаболитов, антибиотиков и сидерофоров, - но и могут оказывать стимулирующее действие на развитие растений благодаря синтезу регуляторов роста и улучшения фосфорного питания растений.

Возможность применения биологических средств для защиты растений изучается уже давно. К настоящему времени накоплен огромный научный

материал по применению бактерий-антагонистов в сельском хозяйстве, на основе которого ведутся широкомасштабные разработки технологий производства биопрепаратов с использованием микроорганизмов [14, 28, 50, 63, 66-68, 71, 95, 106].

Способность ризосферных бактерий растворять труднодоступные почвенные фосфаты является важным механизмом положительного действия на фосфорное питание растений [157, 189]. В то же время известно, что некоторые ФРМ могут проявлять высокую антимикробную активность [83, 84]. В последнее время остро стоит вопрос по поиску психрофильного штамма-антагониста в связи с широким распространением психрофильных возбудителей болезней в растениеводстве.

В настоящей работе исследуются свойства нового психрофильного штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 и возможности его применения в качестве продуцента комбинированного биопрепарата - альтернативы минеральным фосфорным удобрениям и химическим фунгицидам для повышения урожайности, а также для борьбы с возбудителями актуальных болезней человека и животных.

В отделе биологических технологий ФБУН ГНЦ ПМБ накоплен опыт разработки биопрепаратов различного применения с антимикробными свойствами, создана рабочая коллекция фосфатрастворяющих микроорганизмов, выделенных из различных конкурентных экологических ниш, в том числе из бедных и эрозионных минеральных пород, ризосферной зоны растений, где особенно велика доля микроорганизмов-антагонистов.

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 работы:

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 *Pseudomonas 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

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

Практическая значимость и внедрение результатов работы:

Депонирован в коллекции ГКПМ психрофильный штамм *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 с фосфатрастворяющими, ростстимулирующими, антибактериальными и фунгицидными свойствами и подана заявка на патент. Разработан лабораторный технологический регламент на получение препарата комбинированного действия на основе нового психрофильного штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3. Штамм Vsk-26a3 высвобождает фосфаты непосредственно из природного минерального фосфорного сырья, что может быть использовано для изготовления препаратов биоудобрений и утилизации бедных фосфорных руд и отходов фосфорной индустрии. Получены положительные заключения в серии независимых полевых испытаний экспериментальных образцов препарата на основе штамма Vsk-26a3 в качестве стимулятора роста, альтернативы применению химических фунгицидов и минеральных фосфорных удобрений.

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, преобладающим из которых является антибиотик из класса производных флороглюцина.

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.

Апробация работы:

Результаты работы подготовлены и доложены на девяти российских и международных научных семинарах и конференциях: 34-м Международном Семинаре Япония/Россия «Biotechnologies in Russia/CIS» (17 Июня 2005 г., Токуо, 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 «Биоценотическая 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).

Публикации:

Основное содержание работы отражено в 18 научных публикациях, включая 9 статей в научных журналах (5 статей в журналах, рекомендованных в списке ВАК) и 2 патента.

Объем и структура диссертации:

Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста (не включая Приложения) 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 таблицей.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Поиск новых антимикробных средств для борьбы с патогенами растений

В настоящее время с распространением устойчивости микроорганизмов к антибиотикам поиск новых антимикробных средств становится всё более актуальным. Инфекционные болезни, которые считались побеждёнными, становятся сильны как никогда. Эффективные сейчас антибиотики со временем теряют свою силу. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) в 2014 году заявила, что бактериальные инфекции - это главнейшая угроза общественному здоровью каждого человека независимо от возраста и страны. Существует три главных предпосылки устойчивости к антибиотикам – чрезмерное использование антибиотиков в медицине, растущее применение в сельском хозяйстве и недостаток новых лекарственных средств. Антибиотики в огромных количествах применяют при выращивании скота, птицы, рыбы.

Интенсификация возделывания сельскохозяйственных культур приводит к сдвигу баланса между микроорганизмами в сторону патогенов. Одной из главных причин заболеваний растений является нарушение их питания из-за снижения плодородия почв, которое существенно зависит от состояния почвенной биоты [95, 191]. Глобальное нарушение экологического равновесия в природе и появление патогенов, толерантных к большинству современных химических средств защиты растений, требуют разработки биологических препаратов на основе ризосферных микроорганизмов – естественных антагонистов фитопатогенных бактерий и грибов [14, 95, 153, 204]. Известно, что грибы-фитопатогены занимают первое место по нанесению ущерба в растениеводстве среди других возбудителей болезней [20, 24, 176, 196, 210]. К ним принадлежат патогены - *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. gibbosum*, *F. sporotrichiella*, *Microdochium nivale* (снежная плесень), *Alternaria sp.* и др. Например, томаты подвержены таким болезням как фитофторозное увядание (*Phytophthora infestans*), сухая гниль или фузариоз (*Fusarium sp.*), сухая

пятнистость или альтернариоз (*Alternaria sp.*). При возделывании рапса проявляются заболевания: белая гниль (*Sclerotinia sclerotiorum*), коричневая пятнистость листьев (*Leptosphaeria maculans*), сухая пятнистость (*Alternaria sp.*), сухая гниль (*Verticillium sp.*), серая гниль (*Botrytis sp.*), черная ножка (*Rhizoctonia solani*), желтуха листьев (*Fusarium avenaceum*).

Одной из наиболее распространенных и вредоносных болезней озимых зерновых культур является «снежная плесень» [24, 96], что связано с отличительной способностью возбудителя болезни *Microdochium nivale* развиваться на пораженных растениях при околонулевых положительных температурах. Болезнь распространена повсеместно в северных широтах Европы, Азии, Америки, ее присутствие отмечено также в Африке и Австралии. Эта проблема очень актуальна в южных регионах России. Однако в последние годы, вследствие потепления климата этот вопрос стоит остро и в условиях Нечерноземной зоны, т.к. озимые культуры дают здесь более стабильные и высокие урожаи среди зерновых культур. Грибной патоген *M. nivale* сохраняется в почве на органических остатках и с осени начинается заражение озимых культур. Болезнь развивается ранней весной сразу после таяния снега и даже под снегом. Установлено, что гриб в той или иной степени поражает и сахарную свеклу, кукурузу, подсолнечник. Особенно высокая вредоносность *M. nivale* отмечена в посевах озимой пшеницы. Поражение посевов в отдельные годы достигает 100 %, что приводит к полной потере урожая. Гриб поражает подземные, надземные вегетативные и генеративные органы растения [1, 24]. В зависимости от погодных условий, прежде всего зимнего периода, заболевание протекает по типу «корневая гниль – снежная плесень». На интенсивность поражения влияют зимы с оттепелями и ранние, влажные, с частым возвратом пониженных температур весны, что повсеместно наблюдается в Европейской части РФ в последние годы. Жизнеспособность спор возбудителя снежной плесени, заразивших озимые еще с осени, не теряется даже при температуре – 35°C и патоген продолжает развиваться под снегом. Обычно рост гриба *Microdochium nivale* наблюдается в очень широких температурных границах от 0

до +32°C. Но наиболее активно он развивается при температуре от 0 до +5°C и замедляется при +15÷25°C. В связи с этим можно утверждать, что гриб *M. nivale* является одним из наиболее вредоносных заболеваний озимых зерновых. Паразитируя на живых тканях пшеницы в осенне-зимний и весенний период гриб значительно ослабляет растения и, как следствие, приводит к снижению урожайности.

Во всем мире остро стоит проблема загрязнения пищевых продуктов фузариозными микотоксинами [92, 95, 200, 209]. Пшеница, кукуруза и ячмень, составляющие две трети мирового производства злаковых, подвержены заболеванию фузариозами [125, 141, 101]. Возбудителями фузариозов колоса и зерна пшеницы, а также початков кукурузы являются, в основном, грибы рода *Fusarium*. Повсеместное распространение фитопатогенных грибов рода *Fusarium* и способность поражать все органы злаковых культур могут приводить к потерям урожая до 20-50 % [52, 139, 177, 180]. Фузариоз зерна ухудшает посевные качества семян, пищевые достоинства зерна и продуктов его переработки и поэтому во всем мире рассматривается как одно из наиболее вредоносных заболеваний сельскохозяйственных культур [16, 45, 101, 177].

Важнейшая бобовая культура соя также поражается грибными и бактериальными болезнями. В нашей стране особой вредоносностью отличаются болезни всходов и увядания растений, одним из возбудителей которых является *Fusarium* spp. На посевах сои фузариоз встречается повсеместно [39, 48, 57, 91].

Однако наибольшую опасность при фузариозном заражении представляет загрязнение зерна и продуктов его переработки фузариотоксинами, такими как дезоксиниваленол (ДОН) и его производные, а также Т-2 токсин, фумонизины, зеараленон и др. [44, 180, 202]. Фузариотоксины представляют серьезную опасность для теплокровных животных и человека. Токсины накапливаются не только в зерне, но и во всех частях растения, поэтому они не могут использоваться на корм скоту [22, 52, 180, 200].

Опасность фузариотоксинов для здоровья человека и животных признана во всем мире [45, 67, 141, 180]. Известны произошедшие в разных странах случаи

массового отравления грибными метаболитами людей и животных, приведшие к смертельному исходу. Хроническая интоксикация токсинами нарушает работу внутренних органов и приводит к серьёзным заболеваниям центральной нервной системы, понижает иммунитет.

Фузариотоксины могут накапливаться в зерне в высоких концентрациях. Их высокая термоустойчивость исключает детоксикацию заражённого зерна прогревом. Животные, которых кормили поражённым зерном, давали мясо, молоко, яйца содержащие токсины [45, 180]. Ветеринарной службой России регулярно регистрируются многочисленные отравления крупного рогатого скота и свиней кормами, при изготовлении которых использовано фузариозное зерно, а также массовые хронические интоксикации поголовья промышленной сельскохозяйственной птицы.

Кроме грибных болезней зерновые и овощные культуры поражаются и бактериальными инфекциями. Например, пшеница подвержена таким инфекциям, как чёрный бактериоз, базальный бактериоз, бактериальный ожог, белая пятнистость, бурый бактериоз, бактериальная мозаика, бактериальная пятнистость, бактериальная гниль и др. Их вызывают возбудители - *Xanthomonas translucens undulosa*, *Xanthomonas translucen cerealis*, *Pseudomonas syringae atrofaciens*, *Bacillus megaterium cerealis*, *Erwinia rhapontici*, бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, а также рода *Serratia*. Показано, что вредная бактериальная микрофлора сахарной свеклы, представленная возбудителями родов *Enterobacter*, *Klebsiella*, снижала её урожайность на 21-49 % [26, 35].

Так как фитопатогены могут передаваться через посевной материал, необходима обязательная предпосевная обработка семян, т.к. качество посевного материала часто бывает достаточно низким. [19, 35, 85].

В настоящее время в сельском хозяйстве защита от фитопатогенов проводится различными способами. Одним из наиболее распространённых является применение химических средств защиты, которые приводят к загрязнению окружающей среды и попадают в сельхозпродукцию. Для химических фунгицидов характерно селективирующее действие, т.е. уничтожение

более чувствительных особей, что приводит к понижению чувствительности к препарату всей популяции патогена. В результате этого растения остаются практически незащищёнными, и как следствие, наблюдается резкий всплеск заболеваемости. Поэтому для достижения положительного результата приходится увеличивать дозы препаратов, что значительно ухудшает экологическую обстановку. Химических фунгицидов, способных эффективно предохранять от воздействия патогена, немного. Как правило, наибольшая эффективность современных препаратов оценивается не выше 60 - 70% снижения видимых симптомов заболевания в поле [14, 22].

Биологические препараты на основе живых природных микробов-антагонистов при своей специфичности и высокой эффективности позволяют избежать многих нежелательных изменений в биоценозах, устранить загрязнения окружающей среды, они безвредны для растений, животных и человека [13]. Так, ризобактерии вытесняли вредную микрофлору с поверхности корней и уменьшали на 21-72% количество грибов родов *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* и др. При обработке ризобактериями семян сахарной свеклы их количество достигало 10^5 КОЕ/см корней. В необработанных бактериями семенах эти цифры составляли 90-600 КОЕ/см. Сходные данные получены на картофеле, пшенице и других сельскохозяйственных культурах [135, 136, 188, 193]. Использование биопрепаратов на основе ризобактерий позволило повысить урожаи картофеля на 5-33 %, сахарной свеклы - на 15 %, пшеницы - на 26-29 %, риса - на 3-16 %.

Стратегия биологического метода защиты растений от болезней не ставит задачу полного уничтожения вредных организмов, а ориентируется на регулирование популяции патогена на уровне ниже экономического порога вредности [146]. Кроме того, продуценты в биологических СЗР часто синтезируют гормоны роста, которые стимулируют быстрое развитие растений и повышает их устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды. Велика их роль и в солюбилизации фосфора. Все эти факты говорят о

комплексном положительном воздействии биопрепаратов на растения [37, 83, 84].

1.2. Свойства бактерий рода *Pseudomonas* как потенциальных продуцентов биологически активных веществ для использования в сельском хозяйстве, экологии и медицине

1.2.1. Бактерии рода *Pseudomonas* как симбионты растений

Микроорганизмы, ассоциированные с растениями, в последние годы стали объектами активных исследований [2, 8, 18, 130, 143, 169, 184, 211]. Устойчивость растений к заболеваниям, вызываемым почвенными фитопатогенами, во многом определяется результатами взаимодействия между корневой системой растений и разнообразными микроорганизмами. Активная секреция клетками корня различных веществ обеспечивает питательными субстратами и микроэлементами микроорганизмы, образующие с ним прочные ассоциации как внутри корневых тканей, так и на корневой поверхности (ризоплане), а также в почве, непосредственно окружающей корни (ризосфере). Наибольший интерес для исследований экосимбиозов с микроорганизмами представляет ризосфера – узкая область почвы вдоль поверхности корней. В ризосферу из корней активно поступают сложные смеси легкодоступных органических источников энергии и углерода, что обуславливает ее высокую микробиологическую активность и образование специфических ризосферных микробных сообществ. Одним из типичных представителей почвенных микроорганизмов является широко известный род *Pseudomonas*. Бактерии *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. corrugate* и др. относятся к ризобактериям, бактериям способствующим значительному улучшению роста и развития растений и играющим ключевую роль в биологической борьбе с фитопатогенами [2, 4, 8, 9, 27, 47, 134, 151, 155]. Достаточно давно продолжаются исследования этой группы бактерий, перспективной для практического применения в сельском хозяйстве, медицине, экологии и др. Однако подробные механизмы, лежащие в основе взаимовыгодного сосуществования *Pseudomonas* и растений, синтеза антимикробных веществ до сих пор до конца не изучены.

Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas* являются наиболее интересными потенциальными объектами агробиотехнологии. На их основе разрабатываются биологические средства защиты растений от фитопатогенов и биопрепараты, стимулирующие рост и повышающие продуктивность сельскохозяйственных растений. Вторичные метаболиты вносят существенный вклад в молекулярную экологию и обеспечивают важнейшими активными соединениями биологические препараты от болезней растений. Их применение позволяет успешно дополнить или даже заменить химические удобрения и пестициды. Эти бактерии являются составной частью комплексных средств защиты растений, в которых используется более низкая доза агрохимикатов [54, 47, 49, 66, 68, 135, 153, 175, 207]. Важной особенностью ризосферных *Pseudomonas* является способность положительного воздействия при колонизации ими корней растений, которые обеспечивают *Pseudomonas* питательными субстратами и образуют с ними прочные ассоциации [8, 14, 18, 49, 107, 120, 172, 195, 197, 212]. В ответ *Pseudomonas* способны ингибировать развитие почвенных фитопатогенов за счёт синтеза более 300 антифунгальных и антибактериальных метаболитов, конкуренции за питательные субстрат [15-17, 53, 56, 104, 112-114, 123, 130, 152]. Поэтому использование псевдомонад в качестве средств защиты растений для повышения урожайности целесообразно внесение живых микроорганизмов в ризосферу почвы и/или проведение предпосевной обработки посевного материала: семян, клубней, луковиц. Позднее применяется и аэрозольная обработка биопрепаратами листьев и стеблей [21, 50, 55].

Каждый год сельскохозяйственные посевные площади сокращаются на 1-2 % из-за засоленности почв. Ризосферные бактерии *Pseudomonas chlororaphis* могут контролировать заболеваемость растений и способствуют их росту даже в условиях засоления почв и засухи, что позволяет сохранить эти почвы в севообороте [151].

Всё вышеизложенное показывает, что псевдомонады, в том числе бактерии *Pseudomonas chlororaphis*, являются успешными симбионтами растений и перспективны для применения в сельском хозяйстве и экологии.

1.2.2. Прямое положительное воздействие псевдомонад на растения

Механизмы положительного влияния ризобактерий можно условно разделить на два типа: 1) прямая или непосредственная стимуляция роста растений; 2) опосредованная стимуляция роста растений.

Прямое положительное воздействие ризосферных *Pseudomonas* происходит за счёт синтеза регуляторов роста растений [61, 122, 109, 113, 147], улучшения фосфорного питания, фиксации атмосферного азота [30, 157, 189, 195].

В сельскохозяйственной практике многих стран используются бактерии-продуценты гормонов, стимулирующих рост растений, а также чистые фитогормоны – продукты микробиологического синтеза. К ним относятся ауксины - стимуляторы роста плодов, корневой системы растений, [9, 114, 174]. Наиболее известный ауксин - индолилуксусная кислота. Другим представителем группы ростстимулирующих веществ являются цитокинины – класс гормонов растений 6-аминопуринового ряда, стимулирующих деление клеток (цитокинез) и участвующих во многих других физиологических процессах растений [100, 114].

К группе гормонов растений, регулирующих рост и процессы развития такие как: удлинение стебля, прорастание семян, цветение, проявление пола относятся гиббереллины. Кроме того, они защищают растения от стрессов (засоление, затопление) [100, 114];

Активность ферментов растений стимулируют также лектины - бактериальные гликопротеины. [100,114] .

Фосфатрастворение

Фосфор - важнейший элемент, обеспечивающий высокую продуктивность растений в сельском хозяйстве. Способность ризосферных бактерий растворять труднодоступные почвенные фосфаты давно рассматривается как важный механизм положительного действия на фосфорное питание растений [157, 189]. Эти бактерии способны к эффективному растворению фосфорных соединений

органических фосфатов под действием фосфатаз и к растворению минеральных фосфатов преимущественно за счёт синтеза органических кислот [32, 83, 84, 133, 189, 205, 207].

Фиксация атмосферного азота

К настоящему времени известно немного азотфиксирующих штаммов псевдомонад, и нет строгих доказательств того, что осуществляемый ими процесс азотфиксации вносит какой-либо существенный вклад в стимуляцию роста растений. Тем не менее, роль бактерий *Pseudomonas* в процессах ассоциативной азотфиксации активно обсуждается, поскольку такие штаммы способны к непосредственной стимуляции роста растений. Отмечается, что в холодных климатических зонах в ризосфере растений азотфиксирующие псевдомонады доминируют над представителями других таксономических групп азотфиксаторов. Несмотря на ограниченную информацию о роли азотфиксации в стимуляции роста растений псевдомонадами и слабую интенсивность этого процесса, можно заключить, что ризобактерии *Pseudomonas* наряду с другими диазотрофами могут играть существенную роль, как в ассоциативных, так и в симбиотических азотфиксирующих сообществах [9, 205].

1.2.3. Опосредованное воздействие бактерий рода *Pseudomonas* на растения

Бактерии в природе существуют в виде сообществ в структурах, называемых биопленками, и конкурируют друг с другом. Биопленки имеют свойство повышенной устойчивости к воздействию вредных агентов, таких, как тяжёлые металлы, антибиотики и поверхностно-активные вещества (ПАВ), и позволяют клеткам выполнять функции, как правило, не свойственные вне пределов биопленки [178]. Бактерии, связанные с растениями, могут образовывать биопленки на поверхности или внутри растительных тканей. Ассоциации между растениями и микроорганизмами могут включать полезные, нейтральные, вредные и патогенные бактерии. Влияние патогенных микроорганизмов на растения может быть нейтрализовано наличием бактерий, которые снижают воздействие патогена на растение. Многие из этих полезных

бактерий производят вторичные метаболиты, которые ингибируют рост патогенов и стимулируют рост растений. Вторичные метаболиты являются химическими соединениями, которые не участвуют непосредственно в развитии или воспроизведении растений. Таким образом, синтез вторичных метаболитов – важнейший фактор растительно-микробных взаимодействий, который способствует здоровью растений [7, 9, 15, 53, 54, 137].

1.2.4. Основные механизмы антагонистического воздействия псевдомонад на патогены

Основными механизмами антагонистического воздействия псевдомонад на патогены являются: синтез антибактериальных и антигрибных метаболитов, таких как, антибиотики, бактериоцины, конкуренция за питательный субстрат, за счёт производства триглицеридов, сидерофоров и гиперпаразитизм [17, 41, 53, 100, 104, 111, 113, 114, 123, 140, 166]. Эффективность синтеза антибиотиков псевдомонадами в защите растений от фитопатогенов непосредственно в почве была доказана работами Thomashow [199].

Синтез антибиотиков. Бактерии рода *Pseudomonas* способны продуцировать широкий спектр антибиотиков. Наиболее хорошо изученными антибиотиками являются антибиотики группы феназинов, флороглюцинов, пиолотеорин, пирролнитрин и оомицин А [18, 100]. Исходя из их химического строения создана классификация антибиотических веществ, синтезируемых бактериями рода *Pseudomonas*.

У бактерий рода *Pseudomonas* широко распространена способность к синтезу ациклических антибиотиков. К ним в первую очередь относится антифунгин, активный по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям и грибам в концентрации 10 мкг/мл. Существенным отличием антифунгина является то, что он представляет собой комплексный препарат, содержащий смесь уксусной, пропионовой, масляной, валериановой, капроновой и салициловой кислот. Наиболее активный компонент смеси - н-капроновая кислота - угнетающая рост фитопатогенов растений.

Другой ряд антибиотических веществ – рамнолипиды. Например, гликолипиды, синтезируемые *P. aeruginosa*, способны угнетать *in vitro* грамположительные бактерии, микоплазмы и некоторые вирусы [164].

Микроорганизм *Pseudomonas cocovenenans* – является продуцентом бонгкрековой кислоты. Этот антибиотик обладает значительной фунгицидной активностью, угнетает как рост многих микроскопических грибов, так и прорастание спор [208].

Из штамма *P. fluorescens* получен активный антибиотик названный псевдомоновой кислотой. По химическому строению она не имеет сходства с другими антибиотическими веществами, применяемыми в клинике. Спектр антимикробной активности *in vitro* включает стафилококки и стрептококки, в том числе штаммы, устойчивые к антибиотикам [154].

Штамм *Pseudomonas species A* является продуцентом антибиотика алифатической природы. Отличительной особенностью этих бактерий было образование желто-бурого пигмента, диффундирующего в питательную среду. Высокая антагонистическая активность продуцента обусловлена его пигментным комплексом, а также неокрашенными антибиотическими веществами, выделяемыми в среду одновременно с пигментом, обладающими избирательной активностью в отношении стафилококков [167].

Фрагин - антибиотик, полученный из *P. fragi*, представляет собой N-2N-нитрозогидроксил-амино-3-метил-бутил (каприламид). Он обладает антимикробными, противоопухолевыми и противовирусными свойствами. Антибиотик действует на *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces cerevisiae*, угнетает *in vitro* клетки саркомы Йошида и размножение некоторых вирусов [181].

Антибиотики ацетиленового ряда, сепацины А и В, выделены из штамма *P. seracia* ATCC 39356, активны в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий [183].

Низкомолекулярные антибиотики - флюопсины выделены из *P. fluorescens*. Флюопсины проявляют высокую активность в отношении многих

грамположительных и грамотрицательных бактерий, действуют *in vitro* на клетки HeLa, саркомы 180 и аденокарциномы Эрлиха [192].

К антибиотическим веществам относится 2-амино-4-метокси-транс-3-бутеновая кислота, образуемая *P. aeruginosa* и действующая на грамположительные и грамотрицательные бактерии [100].

Антибиотики ароматического строения. Продуцентами простейшего антибиотика ароматической структуры – салициловой кислоты, являются штаммы *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*. Салициловая кислота — широко применяемое в медицинской практике и пищевой промышленности как антисептическое средство.

Из *Pseudomonas species* выделили новый антибиотик ароматического строения 2-н-гексил-5-н-пропилрезорцин. Этот препарат активен против грамположительной флоры, микобактерий, дрожжей и грибов [168].

Обнаружен противоопухолевый антибиотик бактоболлин, выделенный из *Pseudomonas species* VMG 13-A 7. Он воздействует также на грамположительные и грамотрицательные бактерии [171].

Комплекс антибиотиков ароматической структуры выделен из штаммов вида *P. aurantiaca*. Они обладают высокой антибиотической активностью и широким спектром антимикробного действия. Антимикробное действие 2,4-диацетилфлороглюцина проявляется в отношении грамположительных бактерий - бацилл, стафилококков и стрептококков, коринебактерий и микобактерий. Антибиотик подавляет рост кишечной палочки и протей, *Erwinia aroidea*, *Candida albicans*. Флорацетофенон оказался наиболее активным в отношении вируса гриппа А. Установлена способность 2,4-диацетилфлороглюцина и флорацетофенона стимулировать образование эндогенного интерферона. Установлено присутствие ещё 2 антибиотиков в этом комплексе, но уступающих по активности первым двум [93].

Антибиотики феназинового ряда. Феназиновые антибиотики - один из важнейших типов вторичных метаболитов, ингибирующих рост патогенов. Способность бактерий рода *Pseudomonas* к их синтезу, является отличительной

особенностью. Основа молекулы всех феназинов состоит из трёх ароматических колец. Многие из них открыты уже давно [100].

Один из наиболее известных антибиотиков - *пиоцианин* - сине-зелёный пигмент *P. aeruginosa*. По химическому строению представляет собой 9-N-метил-1-оксифеназин. Он активен по отношению ко многим грамположительным и грамотрицательным бактериям, грибам родов *Trichophyton* и *Microsporium*, тормозит рост *Candida albicans* и микроскопических грибов. Известны противовирусные свойства пиоцианина и других феназиновых пигментов *P. aeruginosa*, а также их действие на фитопатогенные бактерии [100].

Желтый пигмент *гемипиоцианин* (1-оксифеназин) обладает антифунгальным действием.

Хлорографин - изумрудно-зеленый пигмент группы феназина, свойственный для *P. chlororaphis* подавляет *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi* [165].

Отдельные штаммы *P. chlororaphis* образуют желтый пигмент *оксихлорографин*, являющийся амидом феназин-1-карбоновой кислоты. Он обладает умеренной антибиотической активностью в отношении различных видов бактерий и грибов, угнетает репродукцию вируса гриппа А2 в опытах *in vivo* [165].

Некоторые штаммы *P. chlororaphis*, *P. aeruginosa*, *P. putida* способны к синтезу значительных количеств феназин-1-карбоновой кислоты в виде жёлто-зелёных кристаллов. Интенсивность её биосинтеза непосредственно связана со степенью антагонистической активности продуцента. Она угнетала рост *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium B5*, *Candida albicans*, *Fusarium avenaceum*. Феназин-1-карбоновая кислота мало токсична для животных, но обладает значительной токсичностью по отношению к некоторым растениям [11].

2-Оксифеназин-1-карбоновая кислота и 2-оксифеназин, содержащие оксигруппу при втором углеродном атоме феназинового ядра, являются пигментами, специфическими для *P. aureofaciens* как вида. Эти соединения дают

характерное для 2-оксифеназинов красно-фиолетовое окрашивание при опрыскивании формалином колоний бактерий. Наиболее сильным антибиотиком является 2-оксифеназин-1-карбоновая кислота [100, 114].

Йодинин - это пурпурный, с медным блеском пигмент, относящийся к оксипроизводным феназина, действует на стрептококки, бациллы, коринебактерии и дрожжи рода *Candida*, на стафилококк, слабее угнетает рост энтеробактерий [100, 114].

Как правило, один вид бактерий *Pseudomonas* продуцирует одновременно несколько разных феназинов [114]. Например, бактерии *P. chlororaphis* продуцируют 2 типа феназинов, *P. aeruginosa* – 6 типов [203]. Широкое распространение феназиновых пигментов у бактерий рода *Pseudomonas* и высокая активность их биосинтеза свидетельствуют о важной и пока окончательно не выясненной роли их в жизнедеятельности бактерий-продуцентов.

Другие антибиотики гетероциклической природы, производные хинолина, подавляют стафилококки. Антибиотик токсофлавин, образуемый *P. cocovenenans* угнетает рост грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Антибиотик пиолотеорин, выделенный из *P. aeruginosa* угнетает грамположительные бактерии и простейших, но не действует на грибы и дрожжи [100].

Пирролнитрин - является одним из самых мощных антифунгальных агентов, выделенных из бактерий рода *Pseudomonas*. Пирролнитрин угнетает рост *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Chlorella vulgaris* и *Euglena gracilis*, а также представителей родов *Proteus* и *Salmonella*.

Отдельную группу гетероциклических хинонов составляют сафрацины - антибиотики широкого спектра действия, образуемые штаммами *P. fluorescens* SC 12695 и A 222. Показано, что сафрацины идентичны сафрамицинам — противоопухолевым антибиотикам из *Streptomyces lavendulae*. Угнетая рост грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, антибиотики действуют также на хламидии [81, 100].

Псевдомонады являются одними из немногочисленных родов бактерий, из которых получены к настоящему времени антибиотики, относящиеся к группе β-лактонов: сульфазецин, обафлюорин.

Синтез сидерофоров. Эти антимикробные вещества имеют различную химическую структуру. Сидерофоры флуоресцирующих псевдомонад имеют более высокое сродство к трёхвалентному железу, за счёт чего псевдомонады выигрывают в конкурентной борьбе с фитопатогенами за такой жизненно важный элемент, как железо, что также приводит к угнетению роста фитопатогенов [137, 148].

Синтез триглицеридов. Триглицериды - новая группа антигрибных низкомолекулярных метаболитов почвенных бактерий *Pseudomonas*, способных к комплексообразованию с экссудатными выделениями корней растений: углеводами, органическими кислотами, аминокислотами, а также с ионами тяжелых металлов [53, 120, 150]. Установлено, что процесс комплексообразования триглицеридпептидов и компонентов экссудатов растений является одним из механизмов, ограничивающих развитие фитопатогенов в ризосфере сельскохозяйственных растений.

Таким образом, к настоящему времени из бактерий рода *Pseudomonas* выделено большое количество антимикробных веществ самого разнообразного химического строения - от простых соединений до сложных молекул, представляющих собой новые классы органических соединений. Многие из полученных антимикробных веществ являются антагонистами патогенов растений.

1.2.5. Формирование резистентности к фитопатогенам

Ризосферные *Pseudomonas* могут оказывать положительное действие на растение только при успешной колонизации ими его ризосферы. Рассмотренные выше механизмы антагонизма ризосферных псевдомонад и фитопатогенов являются основными, но не единственными механизмами формирования резистентности к фитопатогенам. Часто биологический контроль фитопатогенов ризосферными псевдомонадами представляет собой комплексное воздействие

различных механизмов, включающих синтез сидерофоров, антибиотиков и других вторичных метаболитов, так и простую конкуренцию ризобактерий, способствующих росту растений (PGPR) и фитопатогенов за источники азотного и углеродного питания [8, 9, 14].

1.2.6. Использование Quorum Sensing систем для медицины и сельского хозяйства

В последние 15-20 лет большое внимание учёных обращено на такое явление, как Quorum Sensing, представляющее собой тип регуляции экспрессии генов, зависящий от плотности популяции бактерий. Он основан на действии низкомолекулярных сигнальных молекул различной природы, которые накапливаются с повышением титра бактерий. Продуцируемые сигнальные молекулы в чрезвычайно низких концентрациях определяют процессы таксиса, узнавания, регуляции роста и развития организмов. К числу таких соединений относятся различные фенольные соединения, флавоноиды и др. С их помощью происходит передача информации между клетками бактерий, принадлежащих к одному или разным видам, родам, семействам. С помощью Quorum Sensing бактерии могут контролировать экспрессию генов во всём сообществе. Примером аутоиндукторов грамотрицательных бактерий, являются ацил-гомосеринлактоны (АГЛ). Большой интерес имеет изучение Quorum Sensing систем у ризосферных бактерий, в частности у *Pseudomonas chlororaphis*, применяемых в сельском хозяйстве для защиты растений от фитопатогенных бактерий и грибов. У штаммов *Pseudomonas chlororaphis*, выделенных в различных географических областях и продуцирующих АГЛ, идентифицированы гены двух Quorum Sensing (QS) систем *phzI*, *phzR*, *csaI*, *csaR*. Глобальная система регуляции *GacA-GacS* положительно регулирует синтез всех типов АГЛ, феназиновых антибиотиков, экзопротеаз, антагонистическую активность в отношении фитопатогенных грибов и практически не влияет на липазную и фосфатазные активности. Исследование Quorum Sensing систем регуляции и их роли в метаболизме и взаимодействии бактерий, имеют большое прикладное значение для борьбы с

бактериальными инфекциями человека, животных и растений, производстве продуктов питания, косметических средств и др.[173].

1.3. Разработка биопрепаратов на основе бактерий рода *Pseudomonas*

1.3.1. Скрининг микроорганизмов-антагонистов

За последнюю четверть века почти не появилось новых антибиотиков: основные препараты, которыми лечат больных сегодня, разработаны до 1980 года. Химики и микробиологи ведут постоянный поиск новых антибактериальных веществ. Долгое время грибы являлись основными продуцентами антибиотиков. Но главный источник для поиска антибиотиков – сами бактерии, т. к. на протяжении миллионов лет они конкурировали между собой, отвоёвывая друг у друга пространство для жизни. Антибиотики – это оружие, которое используют бактерии в этой борьбе. В США учёными Рокфеллеровского университета запущен гражданский проект для сбора и обработки образцов почв со всей страны для создания карты биосинтетического разнообразия почвенных микробов. Почва - одна из трёх самых населённых бактериями сред обитания, характеризующаяся высоким разнообразием видов микроорганизмов с самыми различными свойствами [145, 179].

Исследования в течение последних двух десятилетий морских бактерий также показали огромный потенциал этих микроорганизмов в качестве источника новых биологически активных вторичных метаболитов [182].

В ГНЦ ПМБ исследовали на наличие антагонистической активности коллекцию фосфатслюбилизирующих микроорганизмов, состоящая из более 700 штаммов. Эта коллекция была создана экспедиционным поиском и скринингом наиболее активно высвобождавших фосфор штаммов, выделенных из образцов почв различных экологических ниш, привезённых сотрудниками института из экспедиций в заповедники Кавказа, Дальнего Востока, Крыма и многих других регионов [30]. В результате этой работы запатентовали 2 перспективных штамма (ещё 2 проходят процесс патентования), обладающих высокой антагонистической активностью и показавших свою эффективность в составе экспериментальных

образцов в условиях полевых испытаний. Однако эти штаммы, на настоящее время, еще не применяются для промышленного производства биопрепаратов.

1.3.2. Культивирование псевдомонад и биосинтез ими антимикробных метаболитов

Возможность применения в сельском хозяйстве биологических СЗР, в том числе и на основе бактерий р. *Pseudomonas*, изучается на протяжении десятков лет. Но только в последнее время, когда был накоплен огромный исследовательский материал по успешному применению бактерий-антагонистов в сельскохозяйственной практике, начались реально широкомасштабные разработки технологий получения биопрепаратов различного назначения на основе этих микроорганизмов [14, 28, 50, 63, 66, 67, 71, 88, 95, 105].

Псевдомонады являются продуцентами большого числа биологически активных соединений, таких как пигменты, антибиотики, аминокислоты, полисахариды, токсины, витамины. Уровень синтеза их в значительной степени зависит от условий культивирования клеток-продуцентов: состава среды, степени аэрации, температуры, рН. Состав микро- и макроэлементов, как в природной среде, так и в питательной культуральной, является одним из необходимых факторов синтеза бактериями вторичных метаболитов. Адаптация к новой среде культивирования может изменить качественный и количественный состав продуцируемых метаболитов. Питательные среды на основе растительного сырья обеспечивают типичный рост представителей почвенной микрофлоры, стабильность сохранения их морфофизиологических, культуральных и биохимических свойств. Но необходимо отметить, что при производстве биопрепаратов на основе бактерий рода *Pseudomonas* для практического использования в агробiotехнологии одной из главных проблем является высокая стоимость питательной среды. В связи с этим актуальными являются работы по поиску новых доступных и экономически оправданных компонентов, использование которых позволит усовершенствовать имеющиеся и разработать новые эффективные питательные среды для культивирования микроорганизмов и синтеза их метаболитов. Решение проблемы возможно за счет использования в

качестве компонентов питательных сред минерального и вторичного сырья, например, автолизата отработанных пивных дрожжей [15, 119, 123].

Изучение свойств бактерий родов *Pseudomonas* при культивировании на искусственных питательных средах вызывает большой интерес микробиологов. Эти исследования выявляют перспективы получения высокоэффективных препаратов с высокой фунгицидной и ростстимулирующей активностью [5-7]. Учитывая, что потребность сельского хозяйства в средствах защиты растений увеличивается с каждым годом, проблема усовершенствования технологий производства средств биологической защиты растений становится всё более актуальной.

1.4. Использование антимикробных свойств бактерий рода *Pseudomonas* для создания готовых форм биопрепаратов

1.4.1. Практические аспекты применения биопрепаратов на основе псевдомонад в сельском хозяйстве

В последнее десятилетие происходит увеличение производства биопестицидов. Чаще всего биологический контроль фитопатогенов представляет собой комплексное действие механизмов антагонизма: синтез широкого спектра антибиотиков, конкуренция за питательный субстрат, за счёт производства триглицеридов и сидерофоров, гиперпаразитизм [108]. Препаративные формы биопрепаратов, содержащие живые культуры микроорганизмов, должны обеспечивать условия для жизнедеятельности и активности штаммов-продуцентов в процессе длительного хранения и применения в сельском хозяйстве. Состав готовой формы определяет качество биопрепарата: возможность живым культурам развиваться в окружающей среде, определяет сроки хранения, способы и эффективность применения. Современные биопрепараты выпускают в основном в виде сухих смачивающихся порошков, пастообразных продуктов, гранул или в таблетированной форме. Для изготовления последних используют метод иммобилизации микроорганизмов путём адсорбции на различных носителях. Как сорбент применяют природные органические (торф, древесина, хитин и тд.) и неорганические (песок, глина и тд.) компоненты,

искусственные неорганические вещества (керамика и т.д.) и синтетические полимеры (полиуретан, полиэтилен и т.д.) [71].

Зачастую для производства биопрепаратов используются совместимые бактерии различных таксономических групп, с обязательным включением в состав ризосферных *Pseudomonas* [102, 213]. Кроме них в активные комбинации могут входить бациллы, полезные как биофунгициды и биоинсектициды: *B. licheniformis*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. lactis* и мн. др., а также грибы (*Trichoderma* и т.д.), дрожжи, вирусы. Также применяют и вторичные метаболиты (регуляторы роста, антибиотики, витамины и т.д.) и некоторые другие. Эти композиции составлены и запатентованы в качестве биопестицидов. Состав композиций определяется в зависимости от выявленных проблем, вызванных теми или иными фитопатогенами [123, 158].

Составляются композиции живых бактерий и совместно с химическими пестицидами, что даёт возможность значительно снижать дозы применения химических пестицидов при производстве сельскохозяйственной продукции. На основе всех этих композиций создаются коммерческие биопрепараты и широко используются для выращивания зерновых, овощных культур, табака и др. [127]. В полевых условиях доказана эффективность таких композиций.

Зapatентованы композиции антимикробных вторичных метаболитов почвенных *Pseudomonas* для защиты от порчи фруктов и овощей при хранении. Обработка клубней картофеля культуральной жидкостью перед закладкой увеличивает его сохранность до 30 % [42, 191].

На основе бактерий рода *Pseudomonas* в России выпускается несколько биопрепаратов: Ризоплан, Бизар, Планриз, Псевдобактерин, Гаупсин и др., проявляющих антагонистическую активность к широкому спектру фитопатогенов родов *Erwinia*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Botritis*, *Pythium*, *Verticillium*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Ascohyta*. В течение многих лет для защиты растений применяется препарат Планриз, спектр действия которого достаточно широк: на зерновых против корневых гнилей, помидорах и огурцах против бактериоза, фузариоза, вертицилеза, риктониоза, корневых гнилей, на капусте против черной

ножки, бактериозов; в садах против парши. На основе бактерий *Pseudomonas aureofaciens* создан биопрепараты Агат, Бизар, Псевдобактерин, применение которых в агроэкосистемах снижает пораженность зерновых, овощных, сахарной свеклы возбудителями грибных и бактериальных болезней и повышает в среднем урожайность картофеля на 15,5-45 ц / га, сахарной свеклы — на 23 -35 ц / га, зерновых — 1,5-5,5 ц / га [25, 73].

Бактериальный инсекто-фунгицидный препарат Гаупсин, содержащий жизнеспособные клетки бактерий *Pseudomonas aureofaciens* и остатки компонентов питательной среды, эффективен против вредителей и болезней семечковых плодовых культур (гусениц яблонной плодожорки, парши, плодовых гнилей), а также гнилей овощных культур в закрытом грунте. Применение Гаупсина снижает пораженность плодов яблони грибными заболеваниями на 94-96 %, а по рентабельности не уступает химическим препаратам.

На основе бактерий рода *Pseudomonas* производится достаточно много биопрепаратов проявляющих антагонистическую активность, но нет ни одного биопрепарата обладающего фунгицидными и почвоудобрительными свойствами, способного к эффективной работе и при пониженных температурах.

Проводились исследования влияния биопрепаратов, в том числе и на основе *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* на состояние микробоценоза почвы, а также сравнение действий экспериментальных биопрепаратов и химического препарата на количественный состав микробного пула почвы. Таким образом, можно заключить, что биопрепараты на основе бактерий семейства *Pseudomonas* благотворно влияют на микробиологическую активность почвы, т.е. не нарушают экологической целостности микробоценоза [118].

Система применения микроорганизмов для защиты растений от фитопатогенов начал разрабатываться достаточно давно, а с 80-х годов интерес к этой проблеме резко усилился, т.к. с развитием биотехнологии и получением новых биопрепаратов появилась возможность конкуренции с химическими средствами защиты растений. Среди всех фунгицидов доля биологических препаратов в защите растений увеличивается: так, в США и Канаде эта величина

уже достигает около 40 %, в Европе - 20 % [131]. В РФ эта цифра составляет менее 10 % [25].

Проблемы разработки новых биопрепаратов для сельского хозяйства.

Исследователи на пути создания нового биопрепарата сталкиваются с большими трудностями. Это и отсутствие корреляции между *in vitro* и тестированием *in vivo*, и непостоянство защитного действия препаратов на основе микроорганизмов, а также сложности, связанные с технологией производства и сохранением биологических свойств препарата в процессе хранения.

Широкомасштабное использование в сельском хозяйстве биопрепаратов, в том числе и на основе ризосферных бактерий рода *Pseudomonas*, сдерживается отсутствием стандартных технологий их производства. Так же одной из главных проблем является высокая стоимость питательной среды для культивирования микроорганизмов и, как следствие, высокая цена на эти препараты. Однако, несмотря на это, использование свойств продуцентов *Pseudomonas*: ростстимулирующих, антимикробных, фосфатрастворяющих является весьма перспективным. Применение препаратов на основе псевдомонад позволит кроме прямого повышения количества и качества урожая также оздоровить ризосферную зону растений.

1.4.2. Применение псевдомонад для решения экологических проблем

Интенсификация производства продуктов питания предполагает широкое применение удобрений и пестицидов, что приводит к загрязнению почвы и, как следствие, загрязнению продукции растениеводства и животноводства [187, 201].

Развитие промышленности, интенсификация объёмов добычи полезных ископаемых, их транспортировка и переработка так же приводят к глобальным экологическим загрязнениям. Почва и вода способны к естественному самовосстановлению, но этот процесс является очень медленным. Без проведения широкомасштабных и эффективных мероприятий ситуация будет только ухудшаться. Поэтому необходима модернизация существующих и разработка новых высокоэффективных и безопасных методов очистки окружающей среды от загрязнений. Жизнедеятельность микроорганизмов является одним из главных

факторов, способствующих естественной очистке почв и водоёмов, а сами микроорганизмы - промышленные продуценты и их консорциумы – ключевой инструмент в создании и функционировании промышленных экологических систем очистки от загрязнений [38, 142].

Способность псевдомонад и их консорциумов с другими микроорганизмами (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Xantomonas spp.*, *Rhodococcus spp.*) к утилизации и/или деградации различных загрязнителей известна давно и продолжает активно изучаться [2, 88, 99, 103]. Их активно используют:

- для уменьшения загрязнений стоячей воды в прудах и озёрах;
- очистки почвы от углеводов, пестицидов и других опасных веществ;
- очистки городских и промышленных сточных вод;
- дезактивации отходов жизнедеятельности сельскохозяйственных животных;
- обеззараживания воды и почвы в результате стихийных действий;
- поддержания экологии почвы, для ускорения прорастания семян и увеличения урожайности;
- составления полезных композиций для применения в гидропонике, аквакультурах;
- разложения полимеров.

Комплексное загрязнение почв органическими поллютантами и металлами является в настоящее время серьезной проблемой. Почвы с загрязнением полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ) и мышьяком встречаются в местах разработки нефтяных месторождений, в сельскохозяйственных почвах, растениях которые длительное время обрабатывались мышьяксодержащими пестицидами, гербицидами и дефолиантами. При комплексном загрязнении почвы уменьшается количество ризосферных бактерий, изменяется состав микробных популяций, увеличивается количество фитопатогенных грибов и бактерий. В качестве одной из стратегий борьбы с комплексными загрязнениями почв рассматривается возможность использования ризосферных бактерий рода *Pseudomonas*, стимулирующих рост

растений, совмещающих в одном штамме такие свойства, как резистентность к мышьяку, способность деградировать ароматические углеводороды, стимулировать рост растений, защищать их от почвенных патогенов [82, 88, 99]. Так, например, комплексный биопрепарат "Нафтокс" состоящий из высокоактивных живых аэробных нефтеокисляющих бактерий (*Pseudomonas* и др.) широко применяется в нефтяной промышленности, сельском хозяйстве, экологии и может быть использован для биологической очистки почв и поверхностных вод от нефтезагрязнений [72]. Изучение характеристик таких препаратов, может быть полезным при разработке стратегии биоремедиации почв.

Одним из важнейших механизмов утилизации углеводов и других слабо- и нерастворимых в воде загрязнений, является синтез *Pseudomonas* и некоторыми другими микроорганизмами биоПАВ [132]. Они способствуют солубилизации углеводов и образованию мелкодисперсных эмульсий, что облегчает контакт бактерий с гидрофобным субстратом. Отсюда - их возможность применения в сельском хозяйстве, текстильной и пищевой промышленности, вторичной добыче нефти. В настоящее время биоПАВ привлекают к себе большой интерес. Их огромное преимущество перед синтетическими ПАВ заключается в низких токсичности и высокоэффективности, а главное они биodeградебельны [88]. Благодаря этим свойствам биоПАВ широко используются не только для восстановления почв от различных загрязнений, но и находят своё применение в пищевой, косметической, фармацевтической промышленности [132].

1.4.3. Возможности использования псевдомонад в медицине

Бактериоцины бактерий рода *Pseudomonas* представляют собой обширную и разнообразную группу веществ. Существуют перспективы использования бактериоцинов для профилактики и терапии бактериальных инфекций.

БиоПАВ, относящиеся к рамнолипидам, обладающие антимикробным действием, против G⁺ бактерий, могут стать альтернативой антибиотикам и

применяться для профилактики и лечения сельскохозяйственных животных и птиц. Кроме того установлено действие микробных ПАВ на раковые клетки и вирус иммунодефицита, что может иметь важное значение в борьбе с этими смертельными болезнями [129, 194, 190].

Ещё один важный продукт метаболизма ризосферной *Pseudomonas chlororaphis* – пептид купредоксин (*cupredoxin*), который входит в состав композиций для лечения рака, СПИД, малярии.

Антибиотик мупироцин, полученный из штамма *P. fluorescens* NCIB 10586- высокоэффективное лечебное средство при первичных и вторичных кожных инфекциях. Он даёт прекрасные результаты при санации носоглотки в борьбе с носительством метициллиноустойчивых стафилококков, вызывающих вспышки госпитальной инфекции. Лекарственная форма мупироцина, представляющая собой 2 %-ный раствор литиевой соли антибиотика в полиэтиленгликоле, под названием «Бактробан» применяется в клинической практике. Этот малотоксичный и высокоэффективный препарат для местного применения не даёт перекрестной устойчивости к используемым в клинике антибиотикам; устойчивость к мупироцину развивается слабо и не достигает высоких уровней.

Антибиотик АЛ-87, продукт штамма *Pseudomonas species* угнетает полирезистентные к антибиотикам клинические штаммы стафилококков, протей, полученных из онкологических и хирургических отделений, малотоксичен.

Другой метаболит *Pseudomonas chlororaphis* антибиотик *пирролнитрин* выпускается фармацевтической промышленностью и используется для лечения дерматомикозов в качестве противогрибкового средства.

Антибиотик *сульфазецин* – продукт метаболизма *P. acidophila*, проявил высокий химиотерапевтический эффект при инфекциях, вызванных грамотрицательными микроорганизмами, например, *E. coli* 0-111, и низкую токсичность.

1.5. Заключение по обзору литературы

В последние десятилетия возрастает интерес к биотехнологическим

способам решения таких задач, как повышение производства сельскохозяйственной продукции за счёт экологичных методов восстановления плодородия почв, защиты урожая от болезней, выявлению новых антимикробных средств. Для этих целей проводится широкий поиск штаммов-продуцентов новых высокоэффективных антимикробных средств и организуется производство на их основе биопрепаратов. По итогам анализа литературных источников, можно сделать заключение, что бактерии рода *Pseudomonas* представляют большой интерес, как промышленные продуценты широкого спектра антибактериальных и антигрибных соединений, активных в отношении различных возбудителей инфекций человека, животных и растений.

Несмотря на то, что производится большое количество биопрепаратов, в том числе на основе бактерий *Pseudomonas*, до сих пор не решена актуальная проблема разработки биологического препарата для подавления одной из наиболее распространенных и вредоносных болезней озимых зерновых и декоративных культур - снежной плесени.

Таким образом, цель данной работы заключалась в поиске нового психрофильного штамма-антагониста бактериальных и грибных патогенов и обоснование возможности его применения в качестве продуцента антимикробных препаратов для использования в борьбе с фитопатогенами.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

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.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1. Штаммы микроорганизмов и среды культивирования

Скрининг микроорганизмов, обладающих антагонистической активностью, осуществляли в коллекции фосфатрастворяющих микроорганизмов, созданной в отделе биологических технологий ГНЦ ПМБ. Коллекция содержит более 700 изолятов бактериальных культур.

Бактериальные культуры микроорганизмов выращивали в течение 1÷2 сут. на плотных питательных средах следующего состава:

- ГРМ агар, г/л: кислотный гидролизат рыбной муки – 20,0; глюкоза – 10,0; агар – 15,0 (производство ФБУН ГНЦ ПМБ);

- Мясо-пептонный агар (МПА), г/л: пептон сухой ферментативный – 10,0; экстракт мясной – 11,0; NaCl – 5,0; агар – 15,0, глюкоза, – 10,0; вода дистиллированная (производство ФБУН ГНЦ ПМБ).

Культуры микромицетов выращивали 5÷7 сут. на картофельно-глюкозном агаре (КГА), – 400 г картофеля, глюкоза 20 г, агар 20 г, вода дист. 1 л.

Чувствительности микроорганизмов к антимикробным средствам определяли на среде Мюллер-Хилтон, г/л: мясной настой 300,00; гидролизат казеина 17,50; крахмал 1,50; агар-агар 17,00; вода дистиллированная (HiMedia Laboratories).

Сравнивали подобранные среды со средами LB и модифицированной средой Кинга В (ФБУН ГНЦ ПМБ). Состав среды LB, г/л: пептон – 10, дрожжевой экстракт – 5, натрий хлористый – 10, вода водопроводная до 1 л. Состав среды Кинга В, г/л: пептон – 20, глицерин – 10, K₂HPO₄ - 1,5, MgSO₄•7H₂O - 1,5, вода дистиллированная до 1 л.

Для оценки супрессивной активности микроорганизмов использовали возбудители болезней человека, животных и растений - штаммы родов *Bacillus*, *Xantomonas*, *Erwinia*, *Micrococcus*, *Staphilococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Esherihia*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Shigella*, *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Yersinia*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Micobacterium*, *Pasteurella* (Приложение 2). Все штаммы-патогены получены из коллекции Государственного научного центра прикладной

микробиологии и биотехнологии «ГКПМ-Оболенск». Для изучения психрофильных свойств использовали 2 штамма *Microdochium nivale*: из музея ГосНИИ Генетики и штамм, выделенный нами ранее из поражённых патогеном озимых зерновых посевов в Рязанской области. Бактериальные патогены культивировали на классических питательных средах ГРМ агаре, МПА, грибные патогены - на КГА.

2. 2. Биологические свойства штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3

2.2.1. Изучение культурально-морфологических, биохимических свойств штамма Vsk-26a3

Культурально-морфологические свойства штамма Vsk-26a3 изучали с помощью общепринятых микробиологических методов – фиксировали цвет, размер, консистенцию колоний на плотной среде, гладкость краёв, прозрачность, проводили окрашивание мазков по Граму, оценивали подвижность клеток в препарате «раздавленная капля».

Изолят идентифицировали с помощью общепринятых микробиологических методов, биохимических тестов Enterotest, Nefermtest, API 50 CH и прилагаемых к ним каталогов/программ идентификации, а также с помощью MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия) [47, 100].

Устойчивость к антибиотикам определяли по зонам подавления роста штамма Vsk-26a дисками с антибиотиками. Для этого суспензией клеток изолята сплошным газом засеивали чашки Петри средой ГРМ и раскладывали на поверхность агара диски с антибиотиками. Через 24 часа культивирования в термостате при 28 °С фиксировали результаты эксперимента [34].

2.2.2. Определение фитотоксичности фосфатрастворяющих штаммов

Фитотоксичность штамма Vsk-26a3 оценивали по морфометрическим показателям проростков на семенах пшеницы сорта Иволга и Московская 56, используемых в средней полосе РФ. Семена предварительно обеззараживали 70 %-ным раствором этилового спирта в течение 1,5-2 мин, затем промывали дистиллированной водой и высушивали в ламинарном шкафу. Обеззараженные

семена замачивали в течение 2 час в суспензиях клеток исследуемого штамма, приготовленных из выращенной на ГРМ суточной культуры при температуре 28°C в течение 24 час, путем разведения в стерильном физрастворе до титров $10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7$ и 10^8 КОЕ/мл по стандарту мутности МакФарланда (McFarland Standard BioMerieux, Франция). Семена замачивали так же и в растворах бесклеточного фильтрата культуральной жидкости (БФ КЖ) в разбавлениях 1:2, 1:4, 1:8. В контрольном варианте семена выдерживали в дистиллированной воде. В каждом варианте использовали по 50 семян. После обработки семена раскладывали на увлажненную дистиллированной водой фильтровальную бумагу, выдерживали в термостате при температуре 28 °С, постоянно увлажняя. В другом варианте семена углубляли в агаризованную среду ГРМ. Через сутки оценивали всхожесть семян, а через 4 суток проростки морфометрировали, измеряя длину корней и ростков.

2.2.3. Оценка безвредности штамма Vsk-26a3

Безвредность штаммов-антагонистов по отношению к теплокровным животным изучали в лаборатории биологических испытаний ГНЦ ПМБ в экспериментах на лабораторных животных. Безвредность штамма Vsk-26a3 проверяли в экспериментах *in vivo* на беспородных белых мышах (самцы/самки, 20 ± 1 г) в группе из 5 шт. Из ночной агаровой культуры штамма готовили суспензию для заражения, содержащую 1×10^{10} КОЕ/мл. Мышей заражали подкожно по 0,2 мл бактериальной взвеси в область верхней трети левого бедра. Срок наблюдения за животными - 14 суток. В течение этого срока ежедневно проводили мониторинг здоровья заражённых животных.

2.3. Определение способности штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 к мобилизации фосфора

Оценку фосфатрастворяющих (ФР) свойств штамма проводили с помощью двух общепринятых методов: по образованию зоны просветления вокруг колоний на агаре с минеральной средой, содержащей нерастворимый фосфат, и по накоплению растворённого фосфора при культивировании в жидкой среде,

содержащей нерастворимый фосфат, в качестве которого использовали трикальций фосфат (ТКФ) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ или фосфатные руды.

При определении ФР свойств на плотной среде суточную культуру Vsk-26a3 наносили петлёй в виде капли на поверхность селективной среды следующего состава, г/л: NH_4Cl – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,6; глюкоза – 10,0; ТКФ – 6,0; раствор микроэлементов – 20 мл/л; агар-агар – 20,0; pH 6,8. Состав раствора микроэлементов, г/л: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,01. Чашки инкубировали при температуре 28 °С. Через 1-3 суток определяли диаметр наблюдавшейся зоны просветления на агаре.

Для определения фосфатрастворяющей активности (ФРА) в жидкой среде клетки штамма Vsk-26a3 вносили в стерильную минеральную среду следующего состава, г/л: NH_4Cl – 1,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; ТКФ – 9,0 или фосфатная руда с тем же содержанием фосфора; глюкоза – 20,0; микроэлементы – 20 мл/л. Состав раствора микроэлементов, г/л: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,01. Посевная доза во всех случаях составляла 3,0 мл суспензии культуры Vsk-26a3, приготовленной из выращенной на ГРМ суточной культуры при температуре 28 °С в течение 24 ч, путем разведения в стерильном физрастворе до конечного титра 1×10^9 КОЕ/мл по стандарту мутности МакФарланда.

Инкубирование вели в колбах вместимостью 750 мл с объемом среды 100 мл на качалке IRC-1-U Kuhner (Швейцария) при скорости вращения 170-180 об/мин при температуре 28 °С в течение 11 сут, отбирая пробы объемом 2,5-3 мл для измерений pH, определения концентрации клеток Vsk-26a3 в КОЕ/мл и содержания фосфатов. Величину pH измеряли на pH-метре ThermOrion 710 (Orion, США).

Перед определением содержания фосфора в растворе пробу центрифугировали на микрофуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) в течение 5 мин при 8000 об/мин. В полученном супернатанте количество растворенного фосфора определяли на спектрофотометре СФ-26 (Россия) с помощью одностадийного метода по интенсивности окраски его молибденового комплекса с твином 80 при

длине волны 350 нм (Пупышев, 1991). Измерение фосфора в растворе проводили в трех повторностях. Каждый опыт повторяли дважды.

В работе использовали фосфатсодержащие руды различного происхождения и состава из коллекции отдела биологических технологий ГНЦПМБ. Их характеристики представлены в таблице 2.1 [30].

Из образцов всех исследованных руд на ситах выделяли фракции от 40 до 100 мкм и использовали в дозах, эквивалентных по фосфору стандартной дозе ТКФ при исследованиях ФРА в жидкой среде, составлявшей 9,0 г/л.

Таблица 2.1 – Характеристика образцов фосфатного сырья

Месторождение	P ₂ O ₅	CaO	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	CO ₂	SO ₃	SiO ₂	K ₂ O	Na ₂ O	MgO	F	Cl	Орг. вещества и др.	Основные и характерные минералы
1	2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ковдорское, РФ	37,55	53,68	0,16	0,29						2,44	0,93		0,18	Апатит, магнетит, бадалейт, форстерит, флогопит, пироксен, диопсид
Новопоплавское, Украина	33,47	52,93	0,44	0,0	8,53	0,0		0,05	0,32	1,02	2,46		н.о.	Апатит, гидрослюда, полевой шпат
Шельф Японского моря	26,3	43,4	3,1	1,9	3,8	2,5	7,9		1,2	0,9	2,8		9,10	Фосфат (фторкарбонапатит-курскит), карбонатно-глинистые и кремнистые минералы, пирит
Шельф Намибии	25,62	38,64	1,79	3,31	3,80	S _{общ} 1,19	12,3	0,89	2,2	1,6	2,55		1,00	Фосфориты со дна океана позднечетвертичные конкреции

Продолжение таблицы 2.1

1	2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Вятско-Камское, РФ	23,5	36,3	4,6	2,3	4,7		16,0		0,8	1,8	2,5		10,4	Фосфат, глауконит, кварц, кальцит, пирит, гидрооксиды, гидрослюда
Егорьевское, РФ	20,0	33,1	7,5	3,7	5,5		19,0		0,8	1,3	2,2		11,7	Фосфат, глауконит, кальцит, кварц, сидерит, гипс, пирит, гидроокислы железа
Кабала, Эстония	28,45	43,53	0,96	0,78	5,23	1,05	15,18	0,07	0,49	1,7	2,58	0,97	6,31	Фосфат (франколит), доломит, кальцит, гипс, пирит, глауконит
Кингисеппское, РФ	27,4	43,7	0,91	0,6	5,8		13,2		0,6	2,2	2,8		7,33	Фосфатизированные раковины, кварц с ожелезением, доломит, пирит, глауконит
Озерское, РФ	35,7	51,5	1,0	1,1	1,2	1,2			0,2		3,3		2,96	Фосфат, вавелит, кальцит, кварц

2.4. Определение активности штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 в отношении патогенов растений, животных и человека

Для выявления антифунгальной и антибактериальной активности клеток штамма, бесклеточного фильтрата культуральной жидкости (БФ КЖ) и концентрата бесклеточного фильтрата культуральной жидкости (КБФ КЖ) использовали метод встречных культур и метод диффузии в агар.

Метод встречных культур. Для исследования готовили суспензию штамма антагониста и суспензии бактериальных патогенов плотностью 10^8 КОЕ/мл, смывая клетки с бактериального газона стерильным раствором 0,9 % хлористого натрия. Суспензии фитопатогенных грибов готовили, смывая мицелиальную и споровую массу с газонов грибов на КГА. По диаметральной линии чашки Петри с ГРМ, МПА или КГА сплошной чертой засеивали суспензию штамма антагониста и перпендикулярно к этой линии, немного не доходя до неё - штрихом суспензии анализируемых бактериальных и грибных культур. Чашки инкубировали при 28 °С и через 1÷2 сут для бактерий и через 3÷5 сут для грибов визуально оценивали наличие зоны подавления роста патогенов. Опыты проводили в трех повторностях. При использовании другого варианта этого метода, 0,1мл суспензии патогенов равномерно распределяли шпателем по чашке Петри с ГРМ или КГА до полного впитывания суспензии, затем микробиологической петлёй наносили небольшое количество испытуемого изолята диаметром 0,5мм. После инкубации визуально оценивали наличие зоны подавления роста патогенов.

Для выявления активных психрофильных изолятов из коллекции ФСМ, чашки Петри с нанесёнными на них исследуемыми изолятами вышеописанным методом, инкубировали при 5÷8 °С в камере бытового холодильника и через 7÷10 сут визуально оценивали наличие зоны подавления роста патогенов .

Метод диффузии в агар (метод лунок). Тестирование антагонистической активности Vsk-26a3 проводили в чашках Петри на агаре, оптимальном для роста соответствующего патогена – МПА, КГА. Для этого - наносили на застывший агар 0,1мл суспензии патогена и растирали шпателем до полного впитывания.

Концентрация суспензии тест культур патогенов соответствует титру 1×10^9 КОЕ/мл по стандарту мутности МакФарланда. Затем в агаре вырезали лунки диаметром 5 мм и вносили в них по 0,1 мл БФ КЖ культуры Vsk-26a3 или 0,1 мл КБФ КЖ Vsk-26a3. Чашки инкубировали при 28°C в течение 1-5 сут, в зависимости от патогена, и измеряли величину (ширину) зоны подавления роста патогенов от края лунки в мм.

Приготовление образцов для анализа. БФ КЖ – фильтрат культуральной жидкости после центрифугирования КЖ на микрофуге Minispin (Eppendorf, Германия) в течение 8 мин при скорости вращения 9000 об/мин и далее пропущенный через фильтр с диаметром пор 0,22 мм. КБФ КЖ – это БФ КЖ, сконцентрированный в 6-7 раз на вакуум-выпарной установке Laborota 4000 (Heidolph, Германия) при температуре 65 °C и вакууме 0,1 атм. Т.к. КБФ КЖ при хранении имел тенденцию к расслоению на 2 фракции (рыхлый осадок и надосадочная жидкость), анализировали обе фракции.

Проводили сравнение активности КБФ КЖ с дисками с антибиотиками для *Staphylococcus aureus*: ванкомицин 30 мкг, цефазолин 30 мкг, оксациллинол 1 мкг и цефалексин 30 мкг, на с *Pseudomonas aeruginosa*: цефтазидим 30 мкг, амикацин 30 мкг, цефепим 30 мкг, имепенем 10 мкг и меропенем 10 мкг (антибиотики к которым известна чувствительность данных патогенов). Сравнение проводили на чашках Петри с плотной средой Мюллер-Хилтон (п.2.1.), предназначенной для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным средствам.

Определение ингибирующей активности культуральной жидкости штаммов-антагонистов. Для определения активности БФ КЖ и КБФ КЖ по отношению к патогенам применяли метод минимальных ингибирующих концентраций (МИК). Для этого готовили ряд двукратных разведений БФ КЖ и КБФ КЖ в дистиллированной воде. В чашку Петри с плотной средой Мюллер-Хилтон (п.2.1.) вносили по 0,1 мл суспензии исследуемых бактериальных патогенов с титром 1×10^8 КОЕ/мл по стандарту мутности МакФарланда и растирали шпателем по всей площади чашки. Затем в агаре вырезали лунки диаметром 5мм и вносили в них полученные разведения по 0,1 мл. Чашки

инкубировали в зависимости от патогена при 28÷37 °С в течении 24 час. Результаты опыта оценивали, измеряя зоны подавления роста патогена вокруг лунки. Последняя лунка без зоны подавления патогена указывала на содержание в ней МИК БФ КЖ или КБФ КЖ.

Оценка антагонистической активности штамма в отношении фитопатогенов на семенах пшеницы. Предварительно семена обеззараживали 70 %-ным раствором этилового спирта в течение 1,5-2 мин, затем промывали дистиллированной водой и высушивали в ламинарном шкафу. На обеззараженные семена наносили суспензию фитопатогена *Fusarium graminearum* VL-1735 (музей ФБУН ГНЦ ПМБ). Для получения суспензии штамм культивировали на КА в чашках Петри. Через 14 суток культивирования при 28 °С газон *F. graminearum* смывали физраствором. Суспензия содержала обрывки мицелия, макро- и микро-конидии (титр 3×10^5 КОЕ/мл). После обработки фитопатогеном семена подсушивали на фильтровальной бумаге в ламинарном шкафу. На следующий день после инфицирования семена обрабатывали суспензиями клеток потенциальных антагонистов. Контролем служила обработка семян химическим протравителем «Виал ТТ» (Производитель: «Август», Россия). Химический протравитель Виал ТТ брали из расчета 0,04 мл на 100 г семян. Обработанные семена помещали на поверхность КГА в чашках Петри, которые далее инкубировали в термостате при температуре 28 °С. Антагонистические свойства исследуемых штаммов определяли по отсутствию признаков роста фитопатогена на поверхности агара вокруг зерен.

Проверку отобранных штаммов-антагонистов на антигрибную активность при пониженных температурах проводили в чашках Петри на КГА методом встречных культур (п.2.4.) при температуре 5 °С.

2.5. Оценка штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 на совместимость с современными пестицидами в лабораторном эксперименте

Для оценки на совместимость штамма Vsk-26a3 с пестицидами осуществляли посев штамма петлей в центр чашки Петри с ГРМ-агаром, в который добавляли пестицид в рекомендованной для применения концентрации.

Чашки инкубировали при 28 °С в течение 2 суток. Совместимость микроорганизма оценивали по интенсивности его роста в сравнении с контролем (вариант суспензии микроорганизма на среде без химического пестицида). Характеристики исследованных пестицидов представлены в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Характеристики исследованных пестицидов

N	Название	Назначение	Действующее начало	Концентрация в агаре, %
1	Максим	Протравитель семян	Флудиоксонил	0,03
2	Максим экстрим	Протравитель семян	Флудиоксонил + ципроконазол	0,03
3	Виал траст	Протравитель семян	Тебуконазол + тиабендазол	0,03
4	Дивиденд стар	Протравитель семян	Дифеноконазол + ципроконазол	0,33
5	Амистар трио	Фунгицид	Пропиконазол + азоксистробин + ципроконазол	0,33
6	Альто супер	Фунгицид	Пропиконазол + ципроконазол	0,16
7	Фоликур	Фунгицид	Тебуконазол	0,33
8	Зерномакс	Гербицид	2-этилгексилловый эфир 2,4-Дкислоты	0,27
9	Линтур	Гербицид	Дикамба+триасульфурон (производные бензойной кислоты + сульфонилмочевины)	0,06
10	Арриво	Инсектицид	Циперметрин	0,8
11	Танрек ВРК	Инсектицид	Имидоклоприд	0,05
12	Шарпей	Инсектицид	Циперметрин	0,1

2.6. Исследование устойчивости антимикробной активности *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 к различным факторам

Термоустойчивость

Для исследования на термостабильность образцы БФ КЖ объемом 5 мл в пробирках прогревали в течение 30 мин на водяной бане при 60, 80 и 100 °С.

Затем проверяли уровень их антимикробной активности на фитопатогенах методом лунок (раздел 2.4.).

Устойчивость к протеолитическому ферменту трипсину

Во флакон с 0,5 мл БФ КЖ штамма Vsk-26a3 вносили 10 мг трипсина, и выдерживали при 37 °С в течение 4 ч. Далее контролировали антимикробную активность методом лунок (раздел 2.4.)

Влияние диализного разделения на метаболическую активность

Для выявления размера молекул активных метаболитов штамма Vsk-26a3 применяли метод диализа - очистки коллоидных растворов и субстанций высокомолекулярных веществ от растворённых в них низкомолекулярных соединений при помощи полупроницаемой мембраны. В диализатор, представляющий собой мешочек из коллодия, помещали 2 мл БФ КЖ и погружали в трис - HCl буфер (pH=7,4). Для исследований использовали диализные мешочки фирмы Sigma с диаметрами пор 1 кДа, 2,5 кДа и 12 кДа. Процесс проводили при температуре 8 °С, периодически меняя растворитель, в течение 24 час. По окончании диализа отбирали содержимое мешочков и определяли его антимикробную активность методом лунок (раздел 2.4.).

Устойчивость при хранении

БКФ КЖ хранили в холодильнике при 2-8 °С. Активность метаболитов штамма при хранении БКФ КЖ после приготовления и через 12 и 15 месяцев контролировали методом лунок (раздел 2.4.).

2.7. Определение механизмов антагонистического действия штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk- 26a3

2.7.1. Способность к адгезии штамма Vsk-26a3 по отношению к патогенам

Для стимулирования синтеза активных метаболитов Vsk-26a3 против *Candida albicans* (ФБУН ГНЦ ПМБ) использовали метод смешанного посевного материала. Для получения стимулирующего эффекта синтеза метаболитов Vsk-26a3 в жидкой питательной среде, использовали посевной материал, состоящий

из 2 культур: Vsk-26a3 и *Candida albicans*. Соотношения штаммов Vsk-26a3 и *Candida albicans* составляло 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, соответственно. Для посева использовали суспензии, приготовленные из выращенных на МПА суточных культур, путем разведения в стерильном физрастворе до конечного титра 1×10^9 КОЕ/мл по стандарту мутности МакФарланда. Контролем служила колба, засеянная только Vsk-26a3. Посевной материал вносили в качалочные колбы со стерильной средой следующего состава, г/л: NH_4Cl – 1,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; глюкоза – 10,0; KH_2PO_4 - 3,0; K_2HPO_4 - 6,0; NaCl -0,5; раствор микроэлементов– 10 мл/л. Инкубирование вели в колбах вместимостью 750 мл с объемом среды 100 мл на качалке (Kuhner, США) при скорости вращения 170-180 об/мин при температуре 28 °С в течение 20 час. По окончании культивирования определяли антимикробный эффект БФ КЖ всех вариантов против *Candida albicans* методом лунок (раздел 2.4.)

2.7.2. Разделение и определение активных метаболитов штамма Vsk-26a3 методом ТСХ

Разделение активных метаболитов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). На первом этапе пробы БКФ КЖ экстрагировали хлороформом в соотношении 2:1. После отстаивания получали хлороформный экстракт и водную фазу. Каждую часть выпаривали досуха при 50 °С на песчаной бане. Затем остаток растворяли в 2 мл этилацетата. Полученные растворы использовали для нанесения на пластины Sorbfil (Краснодар, Россия) для ТСХ (сорбент силикагель на алюминиевой подложке, размер зерна 100 мкм). Пластины предварительно промывали в соответствующем элюенте и активировали в сухожаровом шкафу 1 ч при 100 °С. Подготовленные образцы наносили на пластину в количестве 5-10 мкл и осуществляли элюирование в 2 системах: система №1 – (хлороформ + ледяная уксусная кислота) в соотношении 9:1, система №2 – (хлороформ+этилацетат) в соотношении 15:1. После элюирования ($10 \pm 0,5$ см, $40 \div 45$ мин), пластины извлекали и просушивали при комнатной температуре. Полученные треки с разделёнными компонентами

просматривали на облучателе хроматографическом УФС 254/365 (Россия) при облучении УФ с длиной волны 254 и 365 нм.

С целью определения 2-оксифеназинов пластины с разделенными фракциями обрабатывали формалином (37 % водный раствор) с помощью распылителя и просушивали на воздухе.

Для выявления компонентов, содержащих белки, пептиды, аминокислоты и другие соединения с аминогруппами, пластины с разделенными фракциями обрабатывали 0,2 %-ным раствором нингидрина в ацетоне и высушивали при 110 °С в течение 10 мин.

Для выделения отдельных активных фракций каждое пятно на пластинах Sorbfil соскабливали и суспендировали в 1,5 мл 95 % этанола. Для отделения сорбента вытяжку центрифугировали на микрофуге MiniSpin в течение 5 мин при скорости вращения 12000 об./мин. Осветленную вытяжку использовали для получения УФ спектров компонентов на спектрофотометре Genesys 10S (Thermo Scientific, США).

Для использования фракций с целью определения их антимикробной активности этанол выпаривали при комнатной температуре и сухой остаток растворяли в 0,5 мл дистиллированной воды. Полученный таким образом раствор проверяли на активность в отношении патогенов методом лунок (раздел 2.4.).

2.7.3. Биоавтографический метод выявления антимикробной активности компонентов, разделённых методом ТСХ

Для выявления антимикробной активности разделённых компонентов на дно пустой стерильной чашки Петри раскладывали пластины Sorbfil с разделенными компонентами БКФ КЖ, полученными, как описано в предыдущем разделе. Во флаконы объемом 100 мл с расплавленным МПА или КГА и охлаждённым до 50 °С вносили по отдельности суспензии бактериальных и грибных патогенов объемом 5÷7мл, соответствующих титрам 1×10^9 КОЕ/мл и 1×10^6 КОЕ/мл по стандарту мутности МакФарланд. После перемешивания питательный агар с патогеном заливали в подготовленные чашки Петри слоем 3÷5мм, чтобы полностью покрыть им пластины. Чашки инкубировали 24÷74 час

в зависимости от патогена в термостате при $5 \div 7$ °С и 28 °С. Далее учитывали результаты опыта: соответствие зон подавления патогена в агаре и пятен на пластинах Sorbfil в видимом и УФ свете, количество зон подавления патогена и их площадь.

2.7.4. Газохроматографическое определение активных метаболитов штамма Vsk-26a3

Газовую хроматографию применяли для определения метаболитов, обеспечивающих штамм антимикробной и фосфатрастворяющей активностью.

Для определения глюкозы и образующихся из нее кислот, обеспечивающих фосфатрастворяющую активность штамма, к супернатанту КЖ, приготовленному так же, как для определения растворенного фосфора, прибавляли 10 % (по объему) 0,3М раствора оксалата натрия. После удаления осадка оксалата кальция центрифугированием к аликвоте супернатанта, отвечающей приблизительно 200-500 мкг исходной глюкозы, прибавляли 250 мкг маннита (внутренний стандарт) в виде 0,25 %-ного водного раствора. Затем пробу высушивали в вакууме, и остаток силанизировали смесью 150 мкл сухого пиридина и 150 мкл бис(Н,О-триметилсилил)трифторацетамида (БСТФА), содержащего 2 % триметилхлорсилана.

Для определения состава антимикробных компонентов, выделенных с хроматографических пластин, пробы, растворенные в этаноле, высушивали в вакууме и также обрабатывали БСТФА с примесью 1 % триметилхлорсилана (80 °С, 30 мин). Для определения функциональных групп пробы обрабатывали другими реактивами: реактивом ТРИ-СИЛ (смесь гексаметилдисилазана, триметилхлорсилана и пиридина); 15%-ным раствором трехфтористого бора в метаноле (70°С, 40 мин); смесью уксусного ангидрида с пиридином при 80 °С.

Хроматографирование всех полученных производных определяемых веществ проводили на хроматографе HP5890 (Hewlett-Packard, США) при использовании колонки с полидиметилсилоксановой фазой SPB-1 и пламенно-ионизационного детектора. Метод ввода пробы – с делением потока газа-

носителя. Температурная программа: от 100 °С (1 мин) до 290 °С со скоростью 10 °С/мин.

Определение состава и структуры основного антимикробного компонента проводили на хроматомасс-спектрометре TSQ 8000EVO фирмы Thermo Fisher Scientific (США) с газовым хроматографом Trace 1310 (Thermo Fisher Scientific, США). Энергия ионизации – 70 эВ, капиллярная силиконовая колонка типа DB-5 (15м), температурный режим: 50 °С (2 мин) – 10 °С/мин – 280 °С (10 мин), сканируемые массы 29-500 Да.

2.8. Оптимизация состава питательных сред на колбах

Оптимизацию питательных сред и условий культивирования с целью получения биомассы и активных метаболитов проводили в колбах объемом 0,75 л содержащих 100 мл среды на качалке IRC-1-U (Kuhner, США) при 180 об/мин при температуре 28 °С в течение 28 час. В качестве посевного материала использовали суспензию суточной культуры Vsk-26a3 в количестве 3 % от рабочего объёма. Завершающую часть этих исследований проводили на ферментёре Biostat B plus (Sartorius Stedim Biotech, Германия) с рабочим объёмом 8 л.

Для сравнения использовали среды LB и модифицированную среду Кинга В. Оценку противомикробной активности образцов проводили методом диффузии в агар (раздел 2.4.).

Методика расчёта скорости роста. Скорость роста популяции клеток характеризуется удельной скоростью роста (μ). Удельная скорость роста (отношение числа образовавшихся за единицу времени клеток к общему числу клеток) выражается в доле прироста за 1 час. Таким образом, $\mu = dx/dt \cdot x$, где dx – прирост биомассы за единицу времени, dt – промежуток времени, за который определяется dx ; x – общее число клеток на момент времени. Скорость роста, определенная в фазу логарифмического роста, приближается к максимально возможную скорость роста культуры (μ_{\max}) [87].

2.9. Периодическое культивирование *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 в ферментере с целью получения биомассы и антимикробных метаболитов

Оптимизацию условий культивирования проводили в ферментёре Biostat B plus (Sartorius Stedim Biotech, Германия) с рабочим объёмом 8 литров, с использованием подобранных минеральных сред (таб. 3.20, 3.21). Посевной материал для ферментера получали во встряхиваемых колбах объёмом 0,75 л со 100 мл среды. Для засева колб использовали бактериальную суспензию суточной культуры, смытую с чашек Петри из расчета начальной оптической плотности в колбах 1×10^8 КОЕ/мл по стандарту мутности МакФарланд. Процесс выращивания культуры в ферментере вели при соблюдении следующих условий:

- температура культивирования (28 ± 1) °С;
- непрерывная работа мешалки при скорости вращения 200-600 об/мин в зависимости от показателя pO_2 (не ниже 20 %);
- давление воздуха в ферментере 0,04-0,05 МПа;
- удельный расход воздуха в минуту 1,0-1,5 л/л среды.

Отбирали промежуточные и заключительные пробы для микроскопирования мазков, измерения рН, оптической плотности, подсчёта концентрации клеток методом предельных разведений на агаризованной среде ГРМ и определения антимикробной активности на чашках с плотной средой ГРМ и КГА на патогенах человека и растений методом лунок (раздел 2.4.) Для анализа процесса культивирования применяли программное обеспечение IMMD (интегрированная математическая модель развития) [170].

Из контрольно-измерительных приборов использовали датчики рН и pO_2 , ФЭК, весы, термометры. Для отделения клеток использовали центрифугу MiniSpin (Eppendorf, Германия), фильтры с диаметрами пор 0,2 мкм. Для стерилизации питательных сред и других жидкостей использовали автоклав ВК-75 (Россия).

2.10. Методы получения экспериментальных образцов биопрепаратов на основе *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3

Экспериментальные образцы биопрепаратов готовили из КЖ штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 и высушенных клеток. Клеточную массу отделяли из КЖ на центрифуге при 7000 об./мин в течение 20 мин (J2-21C Beckman Coulter Instruments, США). Для окончательного отделения клеток штамма от фугата применяли стерильные фильтрующие системы Corning объемом 1л (США) с порами диаметром 0,22 мкм. Концентрирование целевых продуктов в 6-7 раз проводили на вакуум-выпарной установке Laborota 4000 (Heidolph, Германия) при температуре 65 °С и вакууме 0,1 атм.

Высушивание БФ КЖ проводили на распылительной сушилке Mini Spray Dryer 190 (Buchi, Швейцария). Режим работы: температура на входе 70÷90 °С, температура на выходе 120÷140 °С, среднее время нахождения капли в сушильной камере: 1-3 с, производительность по испарению: 0.2 л/ч.

Экспериментальные образцы препарата для вегетационных испытаний готовили путем смешивания пасты клеток штамма с защитной средой, содержащей 2 % полиглюкина и 7 % лактозы, и дальнейшего лиофильного высушивания в лиофилизаторе Virtis ВТ-4к (США). В результате получали сухой порошок с содержанием клеток $(1\div 8)\times 10^9$ КОЕ/г.

2.11. Методики деляночных полевых испытаний экспериментального образца препарата на основе штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3

Полевые испытания экспериментального образца проводили на базе Рязанского государственного агротехнического университета имени П.А. Костычева и Рязанского научно-исследовательского института сельского хозяйства.

Во всех деляночных полевых испытаниях использовали основные методики и схемы, общепринятые в селекционных, научно-исследовательских учреждениях и при Государственном сортоиспытании. Определение подвижных форм фосфора проводили по методу Кирсанова в модификации ЦИНАО [ГОСТ 26207-91]. Содержание белка в зерне определяли по количеству белкового азота. Массовую

долю клейковины и качество клейковины определяли по ГОСТ 13586.1-68, массу 1000 зерен по ГОСТ 10842-89, влажность зерна по ГОСТ 13586-5-93. Количество и качество клейковины определяли в агрохимической лаборатории Рязанского РГАТУ. Статистическую обработку данных выполняли по Б.А. Доспехову [29].

Предшественником для испытаний на пшенице являлся чёрный пар. Посев осуществили по технологии, рекомендованной для возделывания использованных культур с учетом погодных условий.

2.11.1. Деляночные полевые испытания на яровой мягкой пшенице

Тест культура: яровая мягкая пшеница сорта *Агата*. Сорт создан в Государственном Научном Учреждении Московском Научном Исследовательском Институте Сельского Хозяйства «Немчиновка» совместно с Государственным Научным Учреждением Рязанским Научным Исследовательским Институтом Сельского Хозяйства.

Экспериментальную часть исследований проводили на опытном поле отдела селекции и семеноводства зерновых культур и многолетних трав Рязанского НИИСХ.

Для обработки семян использовали сухой препарат на основе штамма Vsk-26a3, приготовленный как описано в разделе 2.10. Схема опыта представлена в таблице 2.3.

Таблица 2.3 - Схема полевого опыта

№ варианта	Обработка перед посевом
1 - контроль	нет
2 - эталон химический	Виал ТТ 0,4 л/т
3 - эталон биологический	Фитоспорин 0,5 кг/т
4 – препарат двойной дозы	Vsk-26a3 1,0 кг/т
5 - препарат	Vsk-26a3 0,5 кг/т

Эталон химический – Виал ТТ – высокоэффективный системный двухкомпонентный протравитель широкого спектра действия для обработки

семян зерновых культур с антистрессовыми компонентами. Обеззараживание семян Виалом ТТ осуществляли непосредственно перед посевом семян. Протравливание проводили с увлажнением.

Эталон биологический - Фитоспорин (0,5 кг/т) – за 2 часа до посева опудривались увлажненные семена.

Способ внесения: за 2 часа до посева увлажненные семена опудривались сухими порошками экспериментальных препаратов.

Инфекционный фон: естественный, без внесения основного удобрения и без защиты посевов от болезней.

2.11.2 Деляночные полевые испытания на сое

Тест - культура: соя сорта *Касатка* Разновидность: *stabilis* (неполегающая). Очень скороспелый сорт сои северного экотипа с периодом вегетации 76-85 суток.

Экспериментальную часть исследований проводили на опытном поле лаборатории селекции сои Рязанского НИИСХ в селекционном севообороте отдела селекции и первичного семеноводства. Опыты проведены по инновационной технологии возделывания сои для хозяйств Рязанской области.

Полевой опыт проводили по схеме, представленной в таблице 2.5.

Экспериментальные образцы – в виде сухих порошков, приготовлены на основе штамма Vsk-26a3, как описано в разделе 2.10. настоящей главы.

Таблица 2.5 - Схема полевого опыта

№ варианта	Обработка семян перед посевом	Количество препарата на делянку, г
1 – контроль	нет	-
2 – эталон	нитрагин КМ – 80 г/га норму	1,2
3 – эталон био	фитоспорин – 0,5 кг/т	0,75
4 – препарат	Vsk-26a3 – 1,0 кг/т	1,5

Способ внесения: Обработка семян перед посевом полусухим способом. Семена сои в количестве 1,5 кг, первоначально смоченные водой из

пульверизатора (из расчета 2 % от веса семян), сразу же опудрили необходимым количеством сухого препарата и тщательно перемешали вручную.

Инфекционный фон: естественный. Повторность в опытах 4-х кратная, размещение вариантов систематическое, площадь делянки 25,6 м², учетная площадь делянки – 16,3 м².

Фенологические наблюдения, учеты густоты стояния растений, урожайности и ее структуры проводили согласно методике государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. Учет урожая проводили методом сплошного обмолота растений с учетной части делянки. Одновременно с взвешиванием отбирали пробы семян на определение их влажности.

2.11.3. Деляночные полевые испытания на озимой пшенице без искусственного инфицирования

Экспериментальную часть исследований проводили на опытном станции Рязанского Агротехнологического университета РГАТУ в 2013-2014 гг. В качестве тест-культуры использовали озимую мягкую пшеницу сорта *Виола*.

Полевой опыт проводили по схеме, представленной в таблице 2.7.

Таблица 2.7 - Схема полевого опыта

№	Варианта	Обработка перед посевом	Обработка в фазе кущения
1	Контроль	нет	нет
2	Эталон химический	Максим 2 л/т	нет
3	Эталон биологический	Фитоспорин 0,5 кг/т	3 кг/га, 200-300 л/га
4	Препарат Vsk-26a3, двойная доза	Vsk-26a3 1,0 кг/т	3 кг/га, 200-300 л/га
5	Препарат Vsk-26a3	Vsk-26a3 0,5 кг/т	1,5 кг/га, 200 л/га

Максим – фунгицид для предпосевной обработки семян зерновых колосовых и других культур против патогенов, передающихся через семена и почву. Протравливание проводили с увлажнением. Норма обработки 2 л/т.

Экспериментальные образцы – в виде сухих порошков, приготовлены на основе штамма Vsk-26a3, как описано в разделе 2.10 настоящей главы. Способ обработки: за 2 часа до посева увлажненные дистиллированной водой семена опудривались сухими порошками экспериментальных препаратов и биологического эталона. Семена в контроле и в вариантах опыта увлажнялись дистиллированной водой.

Инфекционный фон: естественный, без внесения основного удобрения и без защиты посевов от болезней.

Обработку растений в фазу 2-3 листьев проводили с помощью ручного опрыскивателя.

Структуру урожая анализировали согласно Методике Всесоюзного Института Растениеводства [59]. Для определения структуры урожая использовали модельные снопы с учетных площадок, которые отбирали перед уборкой. При этом учитывали число растений, длину стебля, верхнего междоузлия и колоса, число колосков и зерен в колосе, массу зерна с колоса.

2.11.4. Деляночные полевые испытания на озимой мягкой пшенице при искусственном заражении возбудителями снежной плесени

Испытания проводили на базе ГНУ Рязанский НИИСХ.

Тест-культура: озимая мягкая пшеница сорта *Виола*. Потенциальная урожайность сорта в конкурсном сортоиспытании ГНУ Рязанский НИИСХ в 2006-2013 гг. составила в среднем 7,04 т/га. Сорт включен в Госреестр по Центральному (3) региону в 2013 году. Рекомендован для возделывания в Московской, Рязанской и Тульской областях.

Схема полевого опыта представлена в таблице 2.9.

Таблица 2.9 - Схема полевого опыта

№	Название варианта	Заражение делянки возбудителями снежной плесени	Обработка перед посевом	Обработка в фазе кущения
1	2	3	4	5
1.	Контроль без обработок	нет	нет	нет

1	2	3	4	5
2.	Контроль, зараженный возбудителями снежной плесени	да	нет	нет
3.	Эталон химический	да	Максим экстрим 2 л/т	нет
4.	Препарат Vsk-26a3	да	Vsk-26a3 0,5 кг/т	3 кг/га, 200-300 л/га
5.	Препарат Vsk-26a3	да	Vsk-26a3 0,25 кг/т	1,5 кг/га, 200 л/га

Максим экстрим – комбинированный фунгицидный препарат контактно-системного действия, предназначен для защиты зерновых культур от болезней, вызываемых несовершенными грибами, в том числе из классов аскомицетов (*Ascomycetes*), базидиомицетов (*Basidiomycetes*) и несовершенных грибов.

Экспериментальные образцы – в виде сухих порошков, приготовлены на основе штамма Vsk-26a (раздел 2.10.)

Способ обработки: за 2 часа до посева увлажненные дистиллированной водой семена опудривались сухими порошками экспериментальных препаратов. Семена в контроле и в вариантах опыта увлажнялись дистиллированной водой.

Инфекционный фон: искусственный, с внесением 30 г зараженного зерна на 1 м²

Подготовка инокулюма *Microdochium nivale* (снежная плесень) для создания инфекционного фона. Зерно пшеницы помещали в колбы и увлажняли водой при соотношении вода: зерно (1:1). Колбы заполняли зерном и водой не более 1/3. Далее колбы помещали в автоклав и стерилизовали при давлении 1 атм в течение 40 минут. После автоклавирования содержимое колб встряхивали для предотвращения слеживания и слипания зерновой массы. После того как колбы с зерном остывали, для создания искусственного инфекционного фона в эксперименте, их засеивали двумя штаммами гриба *Microdochium nivale*: штамм 4995, полученный из ГосНИИ Генетики (Москва), и штамм выделенный нами ранее из поражённых зерновых в Рязанской области. Засеянные колбы помещали в холодильную камеру на 3 месяца, поддерживая в ней температуру не выше

+10 °С. В процессе выращивания патогена, колбы с содержимым периодически встряхивали для равномерного роста гриба. Готовый инокулюм извлекали из колб и вносили на делянки в соответствии с установленными дозами [3].

В ноябре года, когда среднесуточная температура воздуха опустилась ниже +10 °С, на каждую делянку по схеме опыта вносили инокулюм, рассыпая его на почву и растения озимых.

Обработку растений в фазу кущения проводили с помощью ручного опрыскивателя. В соответствии со схемой опыта проводили обработку вегетирующих растений по 3-7 вариантам (через 3 недели после внесения инокулюма на делянки).

Структуру урожая анализировали согласно Методике ВИР. Для определения структуры урожая использовали модельные снопы, учитывали число растений, длину стебля, верхнего и нижнего междоузлия, длину колоса, число колосков и зерен в колосе, массу зерна с колоса, массу 1000 зерен.

ГЛАВА 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Скрининг наиболее перспективного психрофильного штамма-антагониста проводили на основе коллекции фосфатсольбилизирующих микроорганизмов, созданной на базе ГНЦ ПМБ отделом биологических технологий, с целью получения нового продуцента антимикробных препаратов против грибных и бактериальных патогенов, возбудителей болезней человека, животных и растений. Коллекция включает в себя более 700 микроорганизмов, выделенных из образцов почв Кавказа, Дальнего Востока, Карелии, Крыма и других регионов, в том числе из бедных по питательным компонентам экологических ниш (разрушаемые минеральные породы, донные отложения пещер и др.) [30]. Ещё на стадии создания этой коллекции при выделении изолятов из ризосферных проб обратили внимание на то, что некоторые ФРМ активно подавляли рост других микроорганизмов, в том числе и грибов. Антагонистические свойства ФРМ предположительно связаны с конкурентными условиями в бедных по питательным веществам экологических нишах [30, 32, 102]. Поэтому ФР микроорганизмы должны являться, по нашему мнению, потенциальным объектом для поиска нового активного психрофильного штамма-антагониста. В настоящее время два штамма из коллекции уже запатентованы как продуценты СЗР, ещё два находятся на стадии патентования.

3.1.1. Оценка антагонистических свойств фосфатрастворяющих микроорганизмов

В ходе работы над коллекцией проверили на антагонистическую активность 116 наиболее перспективных изолятов (приложение 1). В эту группу вошли дрожжи, спорообразующие Грам-положительные, а также Грам-отрицательные микроорганизмы. Эти штаммы проверили на антимикробную активность в отношении 93 возбудителей болезней человека, животных и

растений. На рисунке 3.1 представлен пример отбора активных изолятов по зонам подавления патогенов.

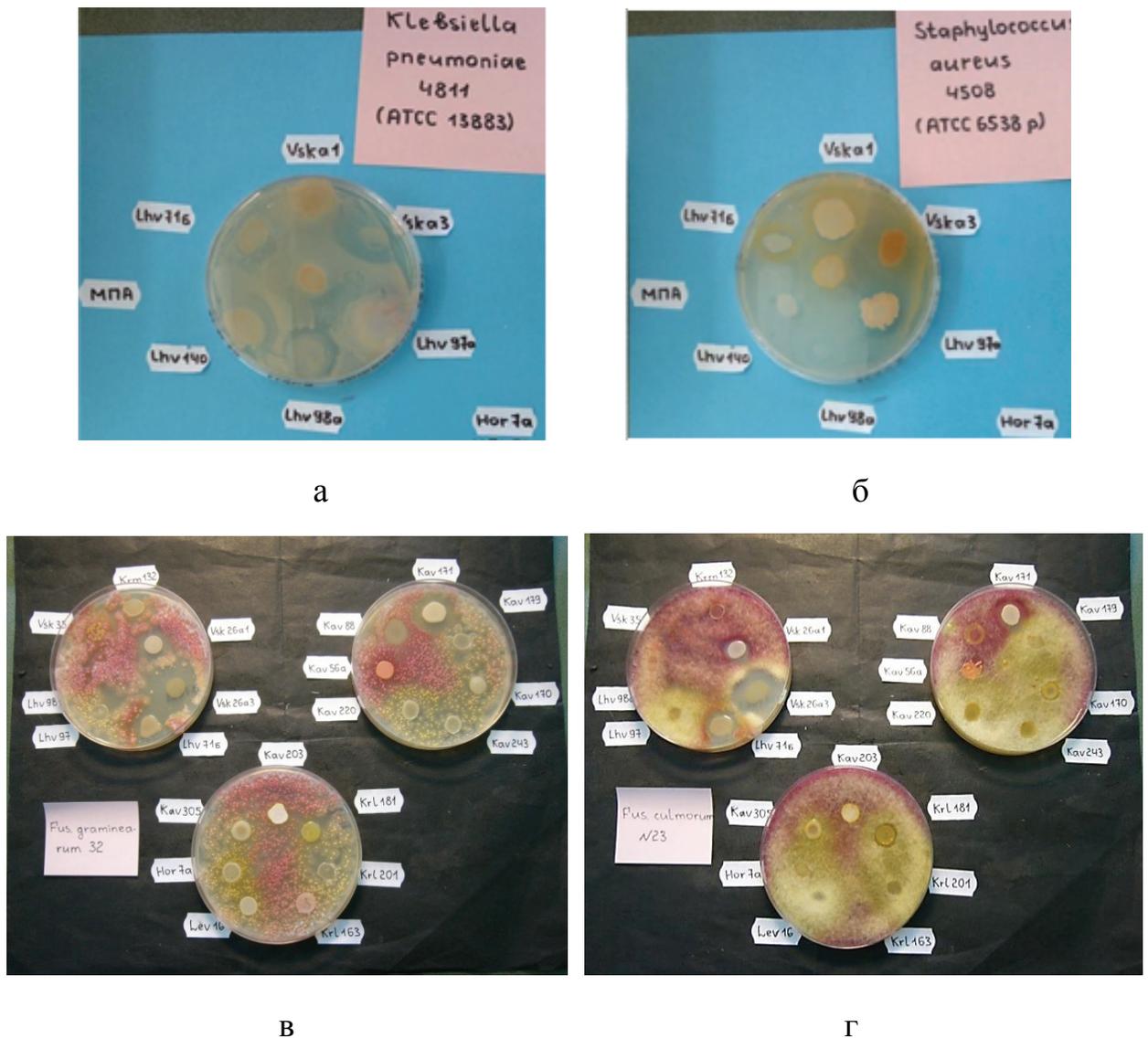


Рисунок 3.1 - Антагонистическая активность ФР изолятов в отношении бактериальных патогенов человека а) *K. pneumoniae*, б) *S. aureus* и грибных патогенов растений в) *F. graminearum*, г) *F. culmorum*

В качестве положительного контроля при использовании в качестве тест-объектов фитопатогенных грибов и бактерий использовали штаммы *B. subtilis* ИПМ 215 и *Pseudomonas fluorescens* P 469, которые проявляют высокую антифитопатогенную активность и запатентованы как продуценты биопрепаратов [73, 74, 77, 82]. При использовании в качестве тест-объектов патогенов человека и животных в качестве положительного контроля также применяли диски с соответствующими для каждого изолята антибиотиками.

В результате этой работы выделили 21 изолят, проявляющий в разной степени антимикробную активность (табл. 3.1). Наиболее высокую активность против всех изученных патогенов (на уровне запатентованных штаммов *B. subtilis* ИПМ 215 и *P. fluorescens* Р 469 и выше) показали бактерии рода *Bacillus* и *Pseudomonas*. Дрожжевые изоляты проявили очень незначительную антимикробную активность. Из отобранных изолятов 5 штаммов обладали высокой антибактериальной активностью и 6 штаммов высокой антифунгальной активностью. Четыре изолята из этой группы - Lhv-71б, Lhv-97, Lhv-98а и Vsk-26а3 имели высокие антибактериальные и антигрибные свойства. Активные изоляты идентифицировали. Штаммы Lhv-71б и Lhv-98а определили как *Bacillus megaterium*, Lhv-97 как *Geobacillus thermoglucosidasius*, Vsk-26а3 – как *Pseudomonas chlororaphis*.

Таблица 3.1 – Антагонистическая активность ФРМ по отношению к патогенам человека, животных и растений

№	Обозначение штамма	Вид микроорганизма	Антагонистическая активность по отношению к					
			<i>F. graminearum</i> №32	<i>F. culmorum</i> №23	<i>F. sporotrichoides</i>	<i>St. aureus</i> ATCC 538P	<i>B. coagulans</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	Hor 7a	<i>Pseudomonas sp.</i>	++	++	++	++	+	+
2.	Lev-16	<i>Candida lambica</i>	+	+	+	0	0	0
3.	Lhv-140	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++	+++	-	-	-
4.	Kav-88b	<i>Bacillus sp.</i>	+++	++	++	0	0	0
5.	Kav-170	<i>Pantoea aglomerans</i>	+	+	+	0	0	0
6.	Kav-171	<i>Klebsiella sp.</i>	++	++	+	+++	0	0
7.	Kav-179	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	+	0	0	0
8.	Kav-203	Не идентиф.	++	+	++	0	0	0
9.	Kav-220	<i>Enterobacter sp.</i>	++	++	++	0	0	0
10.	Kav-243	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	+	0	0	0
11.	Kav-305	<i>Acinetobacter sp.</i>	++	+++	+++	0	0	0
12.	Krl-163	<i>Bacillus sp.</i>	++	++	++	+++	++++	0
13.	Krl-181a	<i>Pseudomonas sp.</i>	+++	++	++	+	0	0
14.	Krl-201	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	+	0	0	0
15.	Krm-132	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++	++	++++	0	0
16.	Lhv-71б	<i>B. megaterium</i>	+++	+++	++	0	+++	0
17.	Lhv-98а	<i>B. megaterium</i>	+++	+++	+++	+++	+++	0

1	2	3	4	5	6	7	8	9
18.	Vsk 26a1	<i>B. subtilis</i>	+++	+++	+++	+	+++	0
19.	Vsk-26a3	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	+++	++	++	++++	++++	++++
20.	Vsk 35	<i>Bacillus sp.</i>	+++	++	+++	++	0	0
21.	ИПМ 215	<i>B. subtilis</i>	+++	+++	+++			

Примечание: 0 означает отсутствие зон, + наличие зоны угнетения роста патогена в месте соприкосновения с бактериальным штрихом; ++ обширная зона угнетения роста патогена в месте соприкосновения с бактериальным штрихом и в сопредельной области; +++ наличие зоны лизиса между штаммами, ++++ наличие обширной зоны лизиса между штаммами

Изолят Vsk-26a3 показал высокую активность против Грам-положительных, Грам-отрицательных бактерий и грибов - возбудителей болезней растений, человека и животных, в том числе против антибиотикоустойчивых штаммов, выделенных из клинического материала.

Антагонистическую активность лучших отобранных штаммов подтверждали на зерне яровой пшеницы сорта *Иволга*. Для этого зерно обрабатывали суспензией фитопатогенных грибов, а затем исследуемым штаммом и помещали на поверхность агара (см. раздел 2.4.1.). Оказалось что, наибольшей фунгицидной активностью обладали бактерии рода *Pseudomonas*. В этих экспериментах выявили стимулирование прорастания семян пшеницы, в отличие от угнетающего эффекта химического протравителя *Виал ТТ* (рис. 3.2).



Рисунок 3.2 - Антагонистическая активность штаммов Krl-181, Kav 305, Vsk-26a3 и химпротравителя *Виал ТТ* по отношению к *F. graminearum* при обработке зерна пшеницы

Лучший результат по стимуляции прорастания семян пшеницы показал штамм Vsk-26a3.

3.1.2. Изучение активности отобранных штаммов-антагонистов при пониженных температурах

Для решения актуальной задачи сельского хозяйства - борьбы с психрофильными фитопатогенами поражающими растения изучили антифунгальную активность при пониженных температурах 2÷8°C. Из выбранных 21 изолята, активность при пониженной температуре проявили 4 штамма. На рисунке 3.3 представлены выборочные результаты оценки активности штаммов-антагонистов в отношении *Microdochium nivale* при температуре 5 °C.



Рисунок 3.3 - Активность некоторых штаммов-антагонистов при 5 °C в отношении *M. nivale* 4995

Данные исследования показали, что наибольшей антигрибной активностью при пониженных температурах обладает штамм Vsk-26a3

3.1.3. Определение фитотоксичности штаммов-антагонистов

Для определения потенциального продуцента с целью применения его в сельском хозяйстве провели оценку фитотоксичности отобранных активных штаммов (раздел 2.2). Полученные результаты приведены на рис. 3.4.

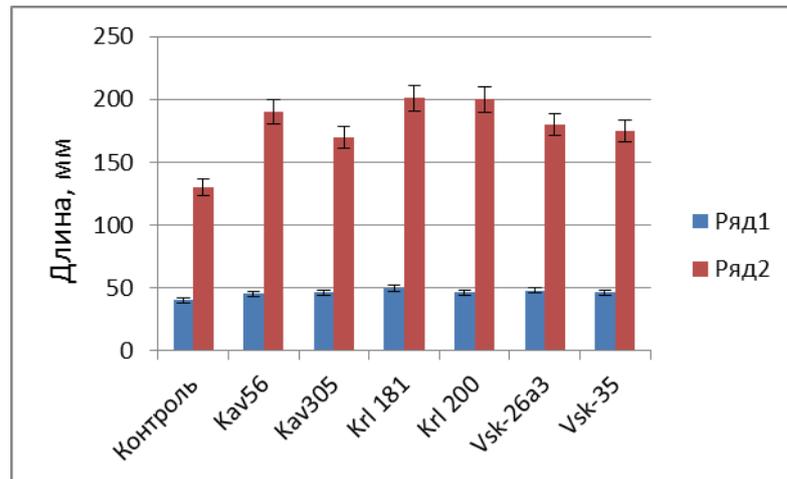


Рисунок 3. 4 - Оценка фитотоксичности штаммов-антагонистов

Проведенные исследования показали, что все отобранные штаммы достоверно стимулировали рост корней пшеницы по сравнению с контролем. Максимальный эффект показали штаммы Krl-181 и Krl-200. Штамм Vsk-26a3 так же продемонстрировал значительный стимулирующий эффект.

3.1.4. Определение безопасности штаммов-антагонистов для теплокровных животных

Оценку патогенности 23 бактериальных изолятов-антагонистов Vsk-26a3, Vsk-35, Lhv-97, Lhv-98, Kav-305, Ног-14, Krl-181 провели в лаборатории биологических испытаний ФБУН ГНЦ ПМБ. Токсичность оценивали в экспериментах на лабораторных животных (раздел 2.2.). В течение всего срока наблюдения гибели животных не наблюдали, отсутствовали признаки интоксикации, не было потери веса. Проведённые испытания показали, что все отобранные штаммы не патогенны для теплокровных животных.

3.1.5. Заключение по разделу 3.1.

Таким образом, в результате скрининга был выбран штамм Vsk-26a3. Он успешно подавлял рост возбудителей фузариоза зерна и одновременно демонстрировал ростстимулирующий эффект на проростках пшеницы. Существенной особенностью изолята Vsk-26a3 также является высокая эффективность против фитопатогена *M. nivale* при пониженной температуре 2÷8 °С, что может быть особенно важно при разработке препарата для защиты

озимых посевов от болезней. Также он оказался не патогенным по отношению к теплокровным животным. На основании результатов предварительных испытаний штамм Vsk-26a3 был отобран для дальнейших исследований как потенциальный продуцент антимикробных препаратов для использования в медицине и сельском хозяйстве.

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

3.2.1. Культурально-морфологические и биохимические свойства штамма Vsk-26a3

Ризосферный штамм Vsk-26a3 представляет собой в мазках, окрашенных по Граму, грамотрицательные палочки (0,5÷0,7) x (1,0÷2,5) мкм, при исследовании методом “висячая капля” клетки подвижны. На ГРМ-агаре через 24 час культивирования при 28 °С вырастают колонии со светло-желтой пигментацией диаметром 1-2 мм. Колонии круглые, с ровными краями, плоские, прозрачные. Штамм хорошо растет при 2÷35°С.

Штамм Vsk-26a3 гидролизует аргинин, расщепляет некоторые олигосахариды, но не раффинозу и сорбозу. Ферментирует манит, сахарозу, мальтозу, салицин, мелибиозу, не обладает уреазной активностью. Окситест - положительный.

Штамм устойчив к антибиотикам: карбенициллину, цефалексину, кларитромицину, фузидину, амоксициллину, фурагину, цефаклору, рокситромицину, итраконазолу, цефалотину, бензилпенициллину, стрептомицину, фуразолидону, фурадонину, флуконазолу, цефтибутену, цефазолину, эритромицину, азитромицину, цефуроксиму, ванкомицину.

Штамм Vsk-26a3 идентифицировали по данным биохимических тестов и с помощью системы MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия) как *Pseudomonas chlororaphis ssp. chlororaphis*.

Таким образом в результате комплекса биохимических, морфологических и приборных исследований перспективный изолят обозначен как *Pseudomonas chlororaphis ssp. chlororaphis* Vsk-26a3. Далее по тексту – штамм Vsk-26a3.

3.2.2. Определение фитотоксичности штамма Vsk-26a3

Определение фитотоксичности штамма Vsk-26a3 выполняли на проростках пшеницы «Московская 56» (раздел 2.2). Изучали фитотоксичность БФ КЖ в 3^x разведениях (1:2;1:4;1:8) и суспензиях клеток Vsk-26a3(10^4 ; 10^5 ; 10^6 ; 10^7 ; 10^8 ; 10^9). Обработанные зёрна погружали в картофельный агар на чашках Петри или раскладывали в чашках Петри на увлажнённую фильтровальную бумагу. При погружении обработанного клеточными суспензиями зерна в картофельный агар, положительные ростстимулирующие и антифунгальные свойства штамма проявил в концентрациях 10^5 ; 10^6 ; 10^7 ; 10^8 КОЕ/мл (рис. 3.5).

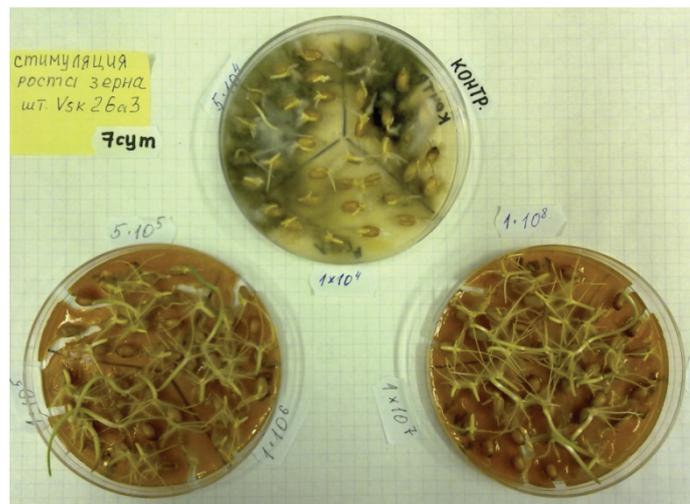


Рисунок 3.5 - Ростостимулирующие и антифунгальные свойства штамма Vsk26a3

При выкладывании обработанного зерна на подложку - фильтровальную бумагу ростостимулирующий эффект 3-х концентраций БФ КЖ и бактериальных суспензий 10^3 ; 10^5 КОЕ/мл представлен на рис. 3.6. Все варианты по сравнению с контролем (необработанное зерно) показали достоверные значения ростстимулирующего эффекта. Лучшие результаты по стимуляции роста зерна пшеницы «Московская 56» показал вариант обработки зерна БФ КЖ в разведении 1:4, а также клеточной суспензией в концентрации 10^3 КОЕ/мл.

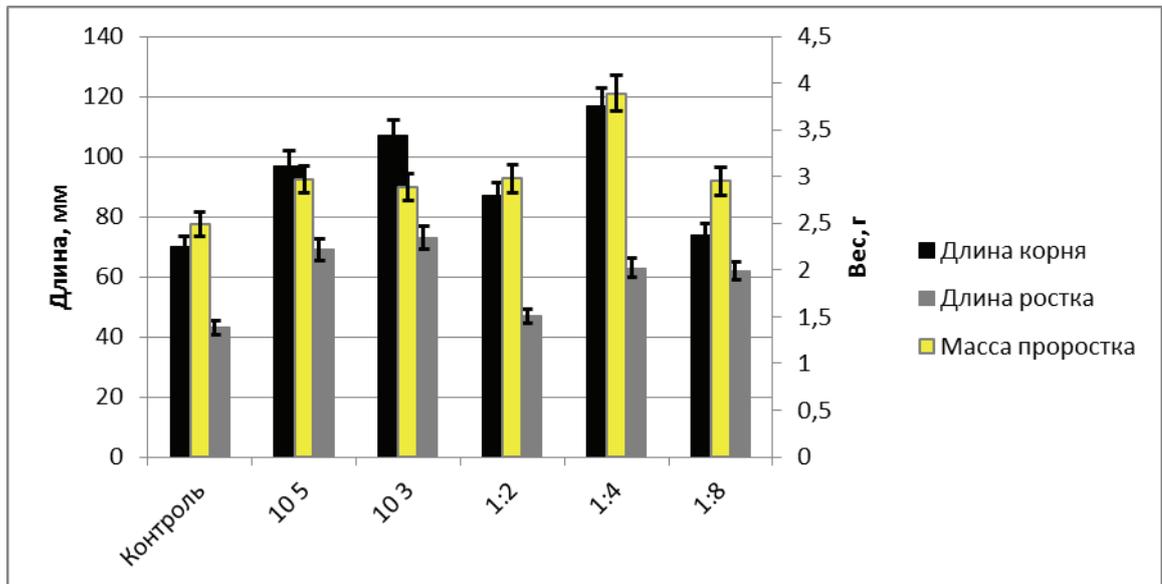
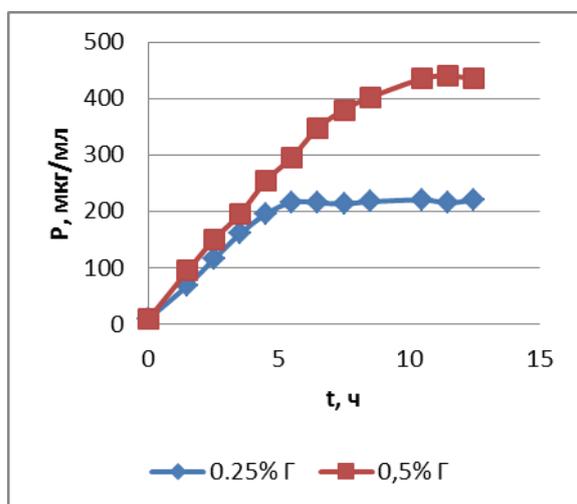


Рисунок 3.6 - Влияние обработки семян пшеницы клеточными суспензиями и БФ КЖ Vsk-26a3 на морфометрические показатели

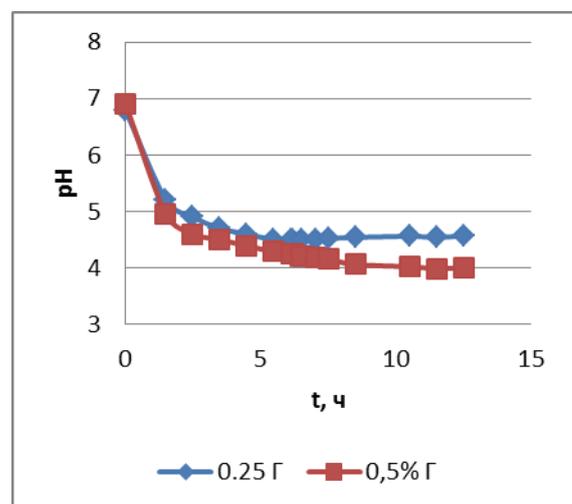
3.2.3. Выявление способности штамма Vsk-26a3 к мобилизации фосфора из минеральных источников сырья

Для обеспечения питания растений доступным фосфором важна, кроме других свойств, способность штамма к фосфатрастворению, поэтому были детально изучены ФР характеристики отобранного штамма.

Динамика выхода фосфора в раствор, изменения рН среды и концентрации глюкозы, глюконовой, кетоглюконовой и суммы этих кислот в среде под действием штамма Vsk-26a3 представлены на рис. 3.7.



а)



б)

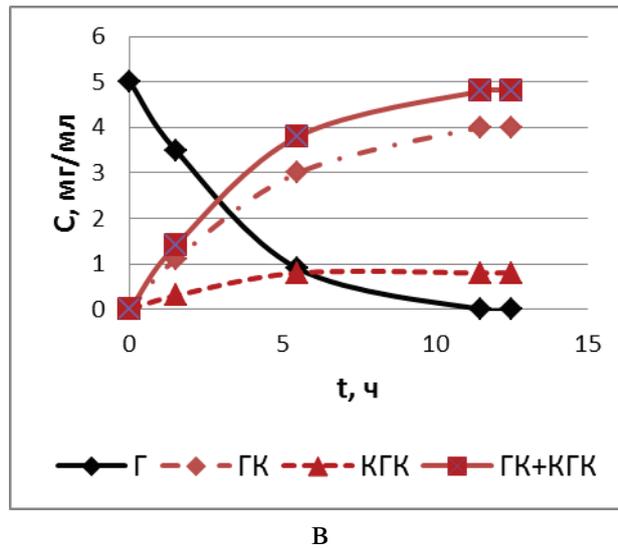


Рисунок 3.7 – Динамика параметров, свидетельствующих о способности штамма Vsk-26a3 к мобилизации фосфора: растворения фосфатов (а); величины рН (б) и изменения концентраций глюкозы (Г), глюконовой (ГК), кетоглюконовой (КГК) и суммы этих кислот (ГК+КГК) (в). Данные по глюкозе и кислотам (в) приведены для исходного содержания глюкозы в среде – 0,5 %.

Динамика накопления фосфора в культуральной жидкости под действием штамма Vsk-26a3 соответствует динамике снижения рН и практически совпадает с накоплением суммы глюконовых кислот.

Полученные результаты демонстрируют, что штамм Vsk-26a3 так же, как и другие, наиболее активные выделенные нами штаммы, например, *Pseudomonas sp.* 181a [83], *Acinetobacter sp.* 305 [84], почти стехиометрически окисляют глюкозу последовательно до соответствующих кислот по уравнениям:



Образовавшиеся кислоты обуславливают растворение ТКФ по уравнениям:



или



Известно, что основным механизмом, с помощью которого микроорганизмы переводят в раствор фосфаты, является образование органических кислот [190]. Проведенные исследования подтвердили предположение Голдштейна [156] о том, что наиболее эффективный механизм высвобождения фосфора из

нерастворимого минерального сырья реализуется бактериями через образование глюконовой и кетоглюконовой (и реже дикетоглюконовой) кислот в результате прямого практически полного окисления глюкозы по уравнениям 1 и 2 и последующего растворения ТКФ по уравнениям 3 и 4. В таблице 3.2 представлены выборочные усреднённые данные растворения фосфатных руд в присутствии штамма Vsk-26a3 в зависимости от времени. Для сравнения в таблице представлены данные по растворению ТКФ в тех же условиях.

Таблица 3.2 - Мобилизация фосфора из руд различных месторождений под действием Vsk-26a3

Место происхождения руды	Концентрация фосфора в среде, мкг/мл			
	2 сут	5 сут	6 сут	11 сут
Намибия	18±2	84±8	218±19	122±11
Иордания	14±1	40±3	95±8	251±21
Марокко	73±7	71±6	83±7	91±7
Эстония	13±1	11±9	36±3	45±3
Обладжан	40±3	52±4	44±4	48±4
ТКФ	335±25	1265±111	1572±98	-

Как и другие ФРМ, штамм Vsk-26a3 слабее растворяет фосфатные руды, чем модельное минеральное фосфатное сырье - ТКФ. Штамм Vsk-26a3 показал лучшую способность к мобилизации фосфора из двух руд – океанического шельфового фосфорита из Намибии и зернистого фосфорита из Иордании. Большая биодоступность этих руд для микроорганизмов была показана ранее [30] и обусловлена, по-видимому, их частично аморфной структурой.

В сравнении с другими ФР штаммами изолят Vsk-26a3 имеет достаточно высокие значения показателей растворения фосфора из руд (табл. 3.3.). В таблице 3.3. представлены усреднённые данные количества растворённого фосфора из руд изолятом Vsk-26a3, другими ФРМ и штаммами-продуцентами биопрепаратов на 6 сутки проведения эксперимента. Изолят Vsk-26a3 обладает более высокой ФРА, чем такие продуценты биопрепаратов как *B. subtilis* ИПМ 215, *P. fluorescens* P 469, *T. asperellum*.

Таблица 3.3 - Сравнительный анализ фосфатрастворения штаммов-антагонистов

Руда	Концентрация фосфора в среде через 6 сут, мкг/мл					
	Kav-305	Krl-181	Lhv-476	<i>B. subtilis</i> ИПМ 215	<i>P. fluorescens</i> P 469	<i>T. asperellum</i>
Намибия	590±50	485±41	14±2	-	221±20	107±9
Иордания	149±13	12±1	4,6±0,4	27±2	38±3	9±1
Марокко	242±22	22±2	6,2±0,5	64±5	57±5	17±1
Эстония	115±10	0	2,6±0,2	79±8	37±3	7±0,6
Обладжан	250±23	0	0,3±0,1	0,8±0,1	0,5±0,1	0
ТКФ	1520±139	1480±13	965±21	364±38	1543±140	490±41

Штамм Vsk-26a3 и другие наиболее активные выделенные ФР штаммы имеют такую же высокую ФР активность, как и штамм *B. seracia* E37 – наиболее активный фосфатрастворяющий штамм из выделенных в мире до настоящего времени [156]. Следует отметить, однако, что известный в литературе штамм *B. seracia* E37 антагонистической активностью не обладает.

Если фосфатрастворяющую активность штаммов Kav-305, Krl-181, Vsk-26a3 и *B. seracia* E37 условно принять за 100 %, солюбилизирующая активность, например, *B. subtilis* ИПМ 215 составит около 20 %. Обычно фосфатмобилизующая активность известных из литературы бактериальных штаммов не превышала 50 % [163].

3.2.4. Исследование совместимости штамма Vsk-26a3 с современными пестицидами в лабораторных условиях (*in vitro*)

Если рассматривать штамм Vsk-26a3 в качестве продуцента нового биопрепарата для использования в растениеводстве, необходимо оценить возможность его комбинации с химическими пестицидами. Совместное применение или же чередование химических и биологических препаратов позволяет снизить дозы применяемых химических средств. Штамм Vsk-26a3 испытывали на совместимость с пестицидами по методике, приведенной в разделе 2.5. В таб. 3.4 представлены результаты оценки совместимости штамма с

использовавшимися химическими пестицидами. Рост бактериальной массы штамма Vsk-26a3, практически не зависел от присутствия пестицидов в агаре, то есть этот штамм устойчив к химическим средствам и, таким образом, совместим со всеми использовавшимися в анализе пестицидами.

Таблица 3.4 - Совместимость штамма Vsk-26a3 с пестицидами

Наименование	Назначение	Концентрация в агаре, %	Рост колоний штамма Vsk-26a3
<i>Максим</i>	Протравитель семян	0,03	+
<i>Максим экстрим</i>	Протравитель семян	0,03	+
<i>Виал траст</i>	Протравитель семян	0,03	+
<i>Дивиденд стар</i>	Протравитель семян	0,33	+
<i>Амистар трио</i>	фунгицид	0,33	+
<i>Альто супер</i>	фунгицид	0,16	+
<i>Фоликур</i>	фунгицид	0,33	+
<i>Зерномакс</i>	гербицид	0,27	+
<i>Линтур</i>	гербицид	0,06	+
<i>Арриво</i>	инсектицид	0,8	+
<i>Тантрек ВРК</i>	инсектицид	0,05	+
<i>Шарпей</i>	инсектицид	0,1	+
Контроль	-	-	+

3.2.5. Заключение по разделу 3.2.

По результатам исследований выбранный штамм Vsk-26a3 идентифицирован как *Pseudomonas chlororaphis ssp. chlororaphis*. Выявлено, что штамм и его БФ КЖ обладают высокими ростстимулирующими свойствами.

Изучен механизм растворения минеральных фосфатов под действием штамма Vsk-26a3. Штамм практически полностью окисляет глюкозу до глюконовой и кетоглюконовой кислот, которые стехиометрически переводят фосфор в растворимое состояние из модельного нерастворимого минерального сырья (ТКФ). Такой механизм является самым эффективным из известных в мире в настоящее время для растворения фосфатов микроорганизмами. Поэтому штамм Vsk-26a3 проявляет и самую высокую ФР способность из известных в настоящее время.

Определена способность штамма Vsk-26a3 к мобилизации фосфора из пяти различных типов фосфатных руд из месторождений Намибии, Иордании, Марокко, Эстонии, Обладжана. Поэтому применение штамма Vsk-26a3 совместно с доступными рудами может быть перспективно для улучшения фосфорного питания растений.

Показана устойчивость штамма к воздействию современных пестицидов, что дает возможность включать его в интегрированную систему защиты растений от вредителей и болезней растений.

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

Проверку активности штамм Vsk-26a3 проводили на бактериальных и грибных патогенах растений, животных и человека. Исследовали антимикробную активность как живых клеток Vsk-26a3, так и БФ КЖ этого штамма.

3.3.1. Изучение антифунгальной активности штамма Vsk-26a3

Активность клеток штамма исследовали на 28 грибных фитопатогенах и 2 патогенах теплокровных. Антагонизм Vsk-26a3 проверяли на чашках Петри со средой КГА методом встречных культур (см. раздел 2.4.). В качестве патогенов использовали грибы родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Candida*, *Trichophyton*. Типичная картина проявления антагонизма штамма Vsk-26a3 на примере возбудителей дерматомикозов *Candida albicans* и *Trichophyton terrestre* представлена на рис. 3.8. Штамм Vsk-26a3 практически полностью подавил рост грибных патогенов в сравнении с другим антагонистически активным фосфатрастворяющим штаммом Lhv-71б (табл.3.5).

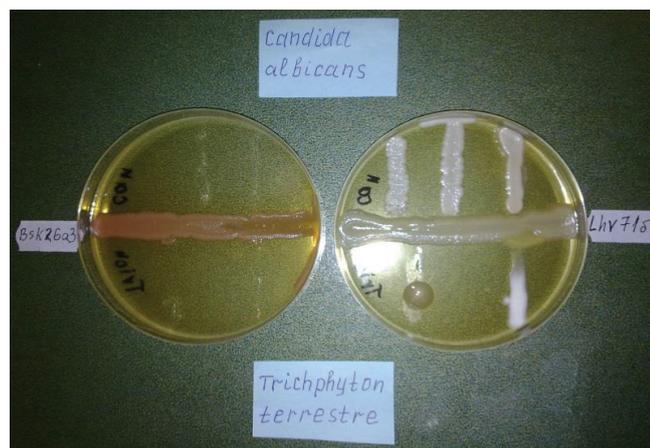


Рисунок 3.8 - Антагонизм штаммов Vsk-26a3 и Lhv-71b и по отношению к *Candida albicans* и *Trichophyton terrestre* на среде ГРМ

Различную степень антифунгальной активности штамм Vsk-26a3 проявил по отношению ко всем 30 исследованным патогенам. Наибольшую активность штамм Vsk-26a3 проявил по отношению к 19 грибным патогенам (таб. 3.5).

Также в работе исследовали антифунгальную активность БФ КЖ Vsk-26a3 и КБФ КЖ методом диффузии в агар (см. раздел 2.4.) Активность фунгатов изучали на 17 фитопатогенах и 1 патогене теплокровных на чашках Петри с КГА методом лунок. Активность БФ КЖ и КБФ КЖ наблюдали в разной степени интенсивности в отношении изученных патогенов (табл. 3.5).

Таблица 3.5 - Антагонизм штамма Vsk-26a3 и фильтрата КЖ к патогенам

№	Наименование патогена	Размер зон подавления, мм		
		клетки Vsk-26a3	БФ КЖ	КБФ КЖ
1	2	3	4	5
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. tenuissima</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

1	2	3	4	5
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

Результаты проведенных экспериментов показали более высокую антифунгальную активность клеток штамма Vsk-26a3, чем БФ КЖ. Однако, процесс его концентрирования дает устойчиво более высокую интенсивность воздействия на патогены. Концентрирование БФ КЖ осуществляли вакуум-выпариванием фильтрата КЖ до появления взвешенной фракции в концентрате (степень упаривания составила 5-6 раз).

Проявление антагонистической активности КБФ КЖ Vsk-26a3 по отношению к *M. nivale* (Ряз) представлено на рисунке 3.9. Так как КБФ КЖ состоит из 2 фракций: рыхлый осадок и надосадочная жидкость, исследовали обе фракции. Антимикробная активность осадка оказалась более высокой относительно надосадочной фракции (размер зон подавления 10 мм и угнетения 5 мм).

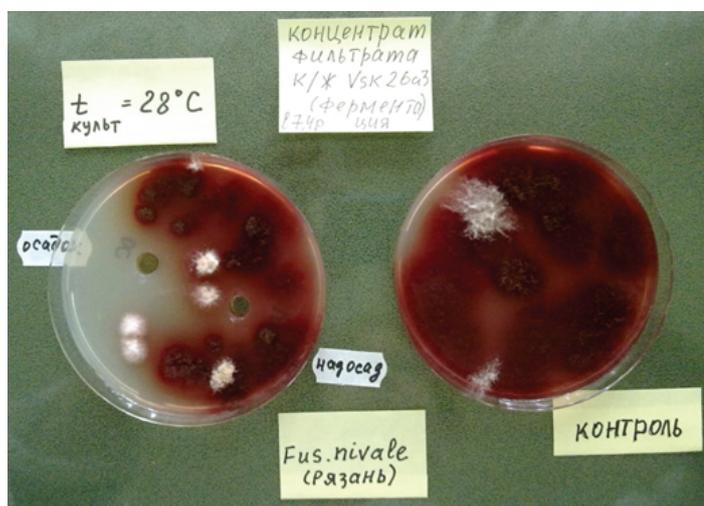


Рисунок 3.9 - Антагонизм штамма Vsk-26a3 по отношению к *M. nivale*

3.3.2. Изучение антибактериальной активности штамма Vsk-26a3

Для выявления антибактериальных свойств штамма Vsk-26a3 исследовали 43 патогенных штамма родов *Bacillus*, *Xantomonas*, *Erwinia*, *Micrococcus*, *Staphilococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Esheria*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Shigella*, *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Yersinia*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Micobacterium*, *Pasteurella*. Исследование антагонистической активности живой культуры Vsk-26a3 проводили в чашках Петри на питательной среде МПА методом встречных культур (см. раздел 2.4.).

По результатам исследований изолят Vsk-26a3 проявил различную степень антибактериальной активности к 33 из 43 использовавшихся штаммов патогенов. Причем, среди них в равной степени представлены как Г⁻, так и Г⁺ культуры. Уровень антимикробной активности Vsk-26a3 представлен в таблице 3.6. Наибольшую активность штамм проявил по отношению к *Esheria coli* ATCC 25922, *Haemophilus influenza* 411, *Salmonella enteritidis* 89, *Salmonella typhimorium* TA 100, *Staphilococcus aureus* ATCC 208P и др.

Таблица 3.6 - Антагонистическая активность штамма 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> E-69	25±1
4	<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	1±0
5	<i>Erwinia cancerogena</i>	8±1
6	<i>E. 567</i>	11±1
7	<i>E. carotovora</i> 6	8±1
8	<i>E. herbicola</i>	3±0
9	<i>Esheria coli</i> AW 518	15±1
10	<i>E. coli</i> HB 101	15±1
11	<i>E. coli</i> ATCC 25922	25±1
12	<i>E. coli</i> HB101(C6)	3±0
13	<i>Haemophilus influenza</i> 411	30±1
14	<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 13883	5±0
15	<i>Listeria monocytogenes</i> 766/1	3±0
16	<i>Micrococcus luteus</i> МГУ-1	30±1

1	2	3
17	<i>Morganella morganii</i>	7±0
18	<i>Mycobacterium smegmatis</i> 53/55	2±0
19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	5±0
20	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	15±1
21	<i>Salmonella enteritidis</i> 204	2±0
22	<i>S. enteritidis</i> 89	20±1
23	<i>S. typhimurium</i> 4,5,12 BO3	3±0
24	<i>S. typhimurium</i> 79	5±0
25	<i>S. typhimurium</i> TA 100	30±1
26	<i>Shigella dysenteriae</i> I 1361	2±0
27	<i>S. sonnei</i> S-форм	5±0
28	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 208P	25±1
29	<i>S. aureus</i> ATCC 538P	20±1
30	<i>S. aureus</i> ATCC 6538p	1±15
31	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043	3±0
32	<i>Xantomonas phaseoli</i> B-627	17±1
33	<i>X. vasculorum</i> B-631	5±0

Дальнейшую проверку антибактериальной активности Vsk-26a3 (КБФ КЖ) проводили методом лунок (раздел 2.4.) по отношению к 27 патогенам представителей различных родов (таблице 3.7.). Для изучения использовали патогены - возбудители болезней растений, человека и животных, в том числе и антибиотикоустойчивые штаммы.

Таблица 3.7 - Антибактериальная активность штамма Vsk-26a3 и его КБФ КЖ

№	Патоген	Размер зон подавления, мм	
		КБФ КЖ	Клетки Vsk-26a3
1	2	3	4
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	12±1	-
2	<i>Bacillus anthracis</i> СТИ-1	12±1	-
3	<i>B coagulans</i> E-69	18±1	25±2
4	<i>Erwinia carotovora</i> 6	8±0	8±1
5	<i>Esherihia coli</i> 6ЖР	3±0	-
6	<i>E.coli</i> Я-63	3±0	-
7	<i>Klebsiella pneumonia</i> 969R	2±1	-
8	<i>Listeria monocytogenes</i> 776/1	14±1	-
9	<i>Micrococcus luteus</i> МГУ-1	29±2	30±2
10	<i>Pasteurella multocida</i>	10±1	-

1	2	3	4
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> L-23	3±0	-
12	<i>Staphylococcus aureus</i> 113R	16±1	-
13	<i>S. aureus</i> 132R	20±1	-
14	<i>S. aureus</i> 17R	15±1	-
15	<i>S. aureus</i> 194R	14±1	-
16	<i>S. aureus</i> 93R	15±1	-
17	<i>S. aureus</i> MR 218	17±1	-
18	<i>Xantomonas phaseoli</i> B-627	20±1	17±1

Примечание: (-) – отсутствие данных

КБФ КЖ штамма Vsk-26a3 обладает в различной степени активностью по отношению к 27 бактериальным патогенам, причем наличие антибиотикорезистентности у микроорганизмов практически не влияло на степень подавления роста их образцом КБФ КЖ Vsk-26a3. Так же выявлено, что живые клетки и КБФ КЖ обладают соизмеримым уровнем антимикробной активности.

3.3.3. Определение чувствительности некоторых бактерий к антимикробным метаболитам штамма Vsk-26a3

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) антимикробных компонентов БФ КЖ и КБФ КЖ по отношению к патогенам определяли методом лунок (раздел 2.4.). Этот метод сравнительно прост по выполнению, экономичен и на его постановку необходимо немного времени. Для доказательства возможности применения метода лунок при определении МИК антимикробных метаболитов Vsk-26a3, находящихся в культуральной жидкости, рассчитали коэффициент корреляции (R^2), значения которого составили 0,95 и 0,87 (рис. 10). Высокие значения коэффициентов корреляции свидетельствуют о том, что метод лунок может быть использован для определения МИК в наших экспериментах (раздел 2.4.). Для исследований использовали бактериальные штаммы *Micrococcus luteus* МГУ-1, *Xantomonas phaseoli* ВКМ B-627, *Listeria monocytogenes* 776/1 и *Staphylococcus aureus* 93R, *Bacillus coagulans*. Важно отметить, что для получения достоверных результатов необходимо придерживаться общих условий проведения исследования: применять стандартные питательные среды,

одинаковые объёмы питательной среды в чашках Петри, размеры лунок и объёмы, исследуемых антимикробных растворов вносимые в лунку, единый титр суспензии патогена.

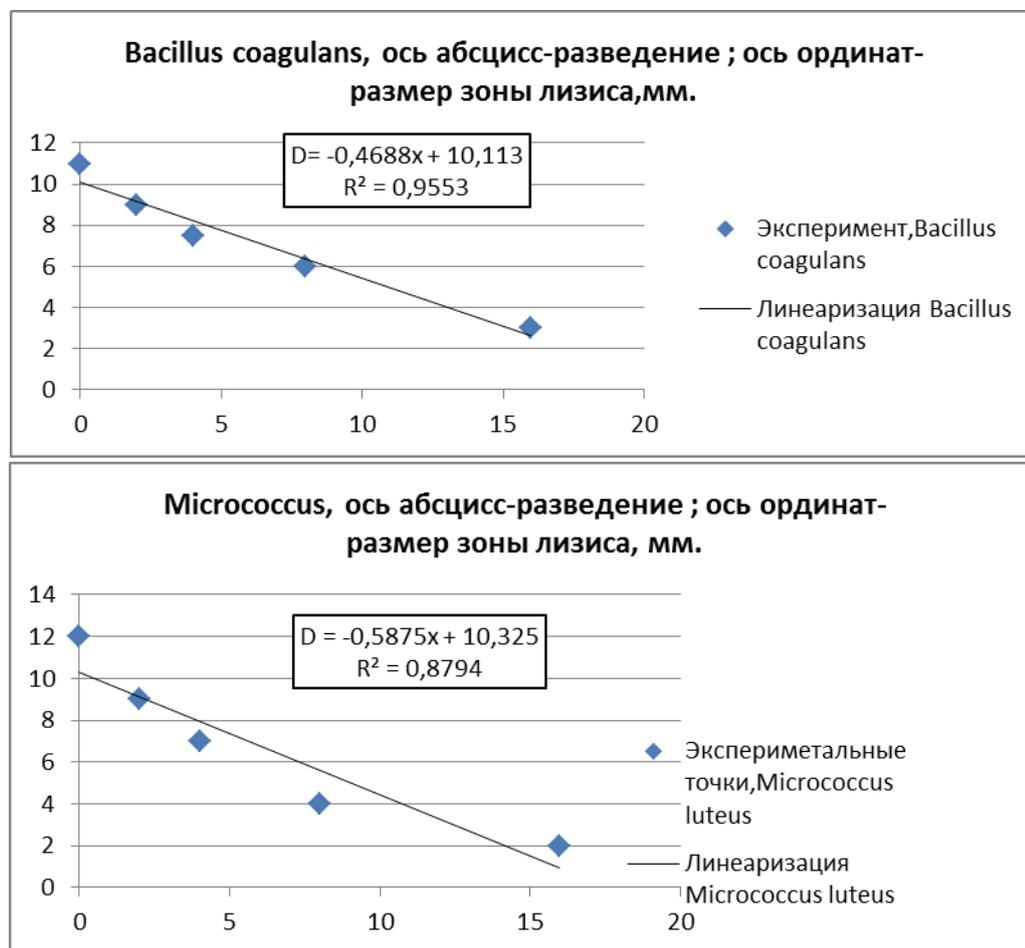


Рисунок 3.10 - Графики зависимости размера зон подавления от разведения

Оценка МИК БФ КЖ и КБФ КЖ для *Bacillus coagulans*, *Xantomonas phaseoli*, *Micrococcus luteus* МГУ-1 представлена в таблице 3.8.

Таблица 3.8 - Определение минимальных активных концентраций бесклеточных фильтратов КЖ штамма Vsk-26a3 для бактерий

Концентрация		Размер зон подавления, мм		
БФ КЖ	КБФ КЖ	<i>B. coagulans</i>	<i>Xantomonas phaseoli</i>	<i>Micrococcus luteus</i> МГУ-4
1	2	3	4	5
1		11±1	10±1	12±1
1:8		6±1	4±1	4±1
1:16		3±1	2±1	2±1

1	2	3	4	5
1:32		1±1	2±1*	1±1
1:64		2±1*	Нет	2±1*
	1	15±1		18±1
	1:32	6±1		4±1
	1:64	3±1		2±1
	1:128	2±1		2±1
	1:256	1±1		1±1
	1:500	(2±1)*		(5±1)*

Примечание: (*) - угнетение

Полученные данные показали, что по отношению к выбранным фитопатогенам максимальные дозы разведения БФ КЖ с минимальной антибактериальной активностью равны 1:64, максимальные дозы разведения КБФ КЖ соответственно – 1:500.

Зависимость размера зон подавления от разведения БФ КЖ и КБФ КЖ на культуре *Listeria monocytogenes* 776/1 представлена на рисунке 11.



Рисунок 3.11 – Демонстрация метода максимальных разведений БФ КЖ и КБФ КЖ на *Listeria monocytogenes* 776/1

3.3.4. Сравнение антимикробной активности штамма Vsk-26a3 с другими известными штаммами-антагонистами

В работе провели сравнение антагонистической активности штамма Vsk-26a3 в отношении фитопатогенов с известными штаммами-антагонистами, запатентованными как продуценты средств защиты растений от болезней: *B. subtilis* ИПМ-215, *B. subtilis* 26Д, *P. fluorescens* P 469 Активность штаммов

сравнивали по отношению к распространенным 4 грибным и 3 бактериальным фитопатогенам (таб. 3.9.).

Штамм Vsk-26a3 показал лучшие или сравнимые результаты с этими антагонистами против грибных фитопатогенов при 28°C, однако при 8 °C антагонистические свойства Vsk-26a3 против *M. nivale* были самыми высокими. Против бактериальных фитопатогенов штамм Vsk-26a3 также был более эффективен.

Таблица 3.9 - Сравнительный анализ активности штаммов

	Размер зон подавления						
	<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°C	8°C	28°C	28°C	28°C	28°C	28°C
Vsk-26a3	+++	+++	++	++	+++	+++	+++
<i>B. subtilis</i> ИПМ-215(бактофит)	+++	+	++	+	++	+	++
<i>P. fluorescens</i> P 469(пат. РФ 2235771)	+++	0	++	++	+	+	+++
<i>B. subtilis</i> 26Д (фитоспорин)	++	0	-	-	-	-	-

Примечание:(-) – нет данных

3.3.5. Изучение влияния активных метаболитов на исходный штамм Vsk-26a3

Исследовали возможность ингибирования роста клеток Vsk-26a3 собственными продуктами метаболизма из БФ КЖ и КБФ КЖ на чашках Петри с КГА (рис. 3.12).

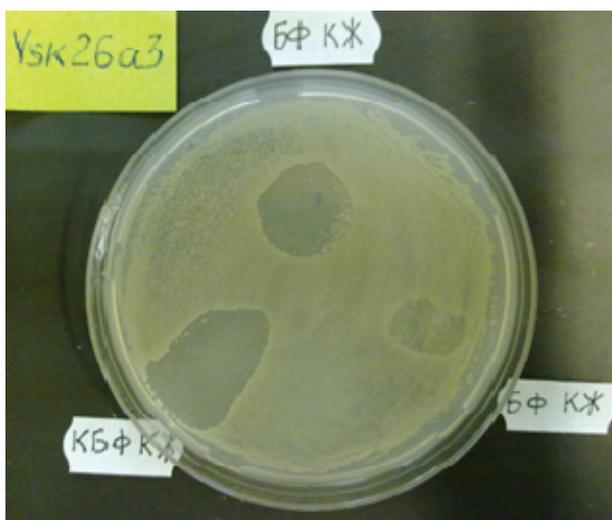


Рисунок 3.12 - Угнетение роста клеток Vsk-26a3 собственными метаболитами

Так как при получении КБФ КЖ происходит его расслоение, для исследования использовали обе фракции КБФ КЖ (табл. 3.10). Большим подавляющим эффектом на Vsk-26a3 обладает надосадочная фракция КБФ КЖ.

Таблица 3.10 - Размер зон подавления роста клеток Vsk-26a3

КБФ КЖ	Размер зон подавления Vsk-26a, мм
надосадочная	2±0
осадок	0,5±0

3.3.6. Заключение по разделу 3.3

Штамм Vsk-26a3 проявил различную степень активности против всех 30 исследованных грибных патогенов и против 53 бактериальных патогенов из исследованных 63. Выявили, что по отношению к бактериальным фитопатогенам МИК БФ КЖ соответствует 1:64, МИК для КБФ КЖ – 1:500.

Показали, что штамм Vsk-26a3 активно подавляет возбудителя снежной плесени (*M. nivale*) при температуре 2-8 °С, в отличие от других известных продуцентов биопрепаратов.

Также подтвердили, что клетки штамма Vsk-26a3 и КБФ КЖ обладают высокой антибактериальной и антифунгальной активностью в отношении, как патогенов растений, так и патогенов человека и животных. Также выявили, что

большие концентрации вторичных метаболитов штамма Vsk-26a3 угнетают рост собственных клеток, что необходимо будет учитывать при создании форм биопрепаратов на основе Vsk-26a3 и его метаболитов.

3.4. Исследование стабильности антимикробных метаболитов штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 под влиянием различных факторов

Термоустойчивость изучали в соответствии с методикой, приведенной в разделе 2.6.1. В качестве тест-объектов использовали Г- и Г+ штаммы *Xantomonas phaseoli* и *B. coagulans*. Оказалось, что кипячение БФ КЖ при 100 °С не снижает его антимикробной активности (таб. 3.11). На рисунке 3.13 представлено фото, демонстрирующее зависимость зон подавления патогенов под воздействием прогретых при различной температуре образца БФ КЖ.

Таблица 3.11 - Влияние температуры на активность БФ КЖ

Патоген	Размер зон подавления, мм			
	Контроль	60 °С	80 °С	100 °С
<i>Xantomonas phaseoli</i>	8±0	9±1	9±1	9±0
<i>B. coagulans</i>	9±1	9±0	9±0	9±1



Рисунок 3.13 - Термостабильность антимикробных метаболитов штамма Vsk-26a3

Таким образом, показано, что метаболиты штамма Vsk-26a3, отвечающие за антагонистическую активность, не теряют своих свойств даже при нагревании

образца при температуре 100 °С в течение 30 мин. Эти данные подтверждают высокую термостабильность антимикробных метаболитов Vsk-26a3.

Для проверки устойчивости антимикробных метаболитов к ферментам, расщепляющим пептиды и белки использовали препарат трипсин. Образец БФ КЖ Vsk-26a3, обработанный ферментом, исследовали на антимикробную активность методом диффузии в агар. Оказалось, что антимикробные метаболиты штамма Vsk-26a3 обладают устойчивостью к ферменту трипсин, что может свидетельствовать о небелковой природе активности антимикробных метаболитов штамма Vsk- 26a3 (табл.3.12).

Таблица 3.12 - Устойчивость БФ КЖ к трипсину

Тест объект	Размер зон подавления, мм	
	Контроль (БФ КЖ)	БФ КЖ+трипсин
<i>B. coagulans</i>	8±0	8±1
<i>X. phaseoli</i>	10±1	10±0

Диапазон размеров молекул активных метаболитов определяли методом диализа. Процесс диализа проводили в мешочках из коллодия с разными диаметрами пор, в которых находился БФ КЖ. Полученные в них диализируемые жидкости проверяли на антимикробную активность по отношению к бактериальным патогенам на чашках Петри с МПА методом диффузии в агар (раздел 2.4.) (табл. 3.13).

Таблица 3.13 - Активность образцов БФ КЖ после диализа

тест объект	Размер зон подавления, мм			
	контроль	размер пор 12 кДа	размер пор 2,5 кДа	размер пор 1 кДа
<i>Micrococcus luteus</i> МГУ-1	20±1	0	0	0
<i>Xantomonas phaseoli</i>	13±1	0	0	0
<i>Erwinia carotovora</i>	3±0	0	0	0

Полученные данные означают, что штамм Vsk-26a3 синтезирует низкомолекулярные антимикробные вещества с размерами молекул менее 1 кДа.

Методом встречных культур (раздел 2.4) исследовали антимикробную активность в процессе 2-х годичного хранения при $2\div 8$ °С жидкого образца КБФ КЖ, полученного при глубинном культивировании в апреле 2014 года (табл.3.14).

Таблица 3.14 - Активность метаболитов при хранении

Патоген	Размер зон подавления после хранения, мм		
	0 мес.	12 мес.	24 мес.
<i>Xantomonas phaseoli</i>	12±1	12±1	12±1
<i>Micrococcus luteus</i> МГУ-4	12±1	13±1	13±1

Оказалось, что антимикробные метаболиты штамма Vsk-26a3 в жидком образце КБФ КЖ не утратили своей антагонистической активности более чем за 2 года хранения при температуре $2\div 8$ °С.

Таким образом, показано, что активные метаболиты в КБФ КЖ устойчивы к кратковременному нагреву до 100 °С, имеют небелковую природу, размер молекул менее 1 КДа и могут длительно (не менее года) храниться при $2\div 8$ °С в жидком виде.

3.5. Исследование механизмов антагонистического действия штамма Vsk-26a3

Исследовали синтез антимикробных метаболитов на разных по составу питательных субстратах методом встречных культур (раздел 2.4.). Эксперимент проводили на чашках Петри с питательными средами: МПА, ГРМ и КГА. Выявлено, что штамм Vsk-26a3 проявляет большую антагонистическую активность на более бедной по составу среде КГА, чем на богатой МПА. Различие размера зон подавления фитопатогенов штаммом Vsk-26a3 в зависимости от состава питательной среды отображено на рисунке 3.14.

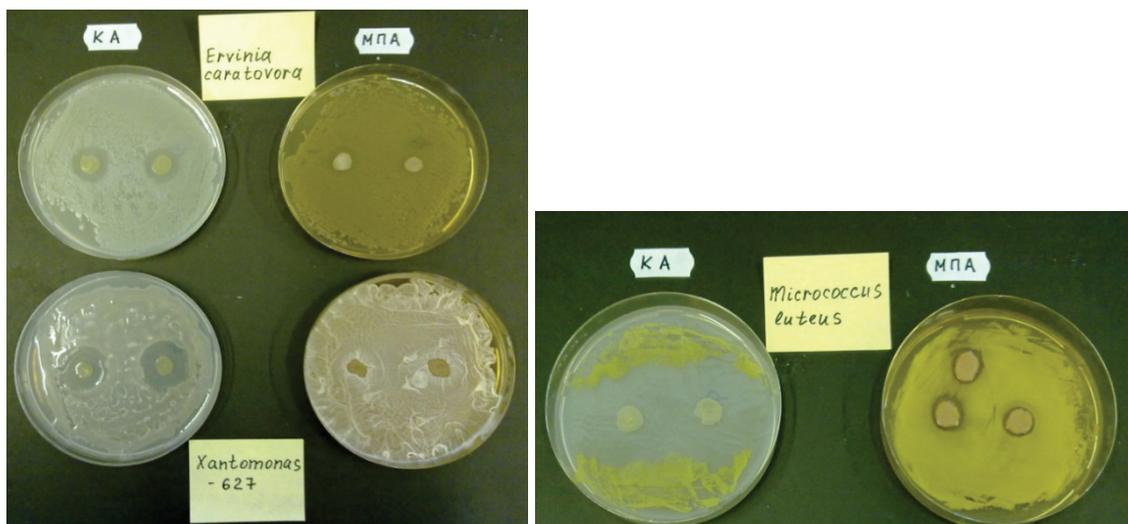


Рисунок 3.14 - Зависимость антагонистической активности штамма Vsk-26a3 от состава питательной среды в отношении к *M. luteus* и *X. phaseoli*

Выявили способность штамма Vsk-26a3 к более активному синтезу антимикробных соединений при совместном глубинном культивировании Vsk-26a3 с живыми клетками патогена *Candida albicans*. Клетки *C. albicans* в процессе культивирования в колбе погибали. Контроль эксперимента проводили на чашках Петри с КГА методом диффузии в агар относительно БФ КЖ, полученного без совместного культивирования штаммов. При этом соотношение культур Vsk-26a3/ *C. albicans* в посевном материале играет ключевую роль (табл. 3.15).

Таблица 3.15 - Зависимость антагонистической активности БФ КЖ штамма Vsk-26a3 от состава посевного материала

Соотношение культур в посевном материале Vsk-26a3/ <i>C. albicans</i>	Размер зон подавления <i>Candida albicans</i> , мм
1:1	4±1
1:5	(3±0)*
1:10	(3±0)*
1:50	(3±0)*
Без <i>C. albicans</i>	(3±0)*

Примечание – (*) - угнетение роста

Экспериментально показали, что разные соотношения антагонистических культур в посевном материале влияют на выработку антимикробных метаболитов, несколько лучшие антагонистические свойства имел БФ КЖ с соотношением посевных культур 1:1.

При совместном глубинном культивировании с грибами рода *Fusarium* это свойство не подтвердилось, несмотря на частичное подавление роста гриба при культивировании в колбе. Микроскопия мазка совместного глубинного культивирования штаммов Vsk-26a3 и *F. culmorum* №23 представлена на рис. 3.15. На снимке можно наблюдать полуразрушенные гифы гриба, плотно покрытые клетками *Pseudomonas*, зоны лизиса гиф гриба под действием клеток Vsk-26a3. На фото хорошо видна адгезивная способность клеток штамма Vsk-26a3, что, видимо, является важным фактором для формирования прикорневой ризосферы, а также возможного механизма его взаимодействия с патогенами.

Аналогичную картину выработки антимикробных метаболитов наблюдали при (микроскопирование мазка КЖ) совместном глубинном культивировании *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 и *Candida albicans*.

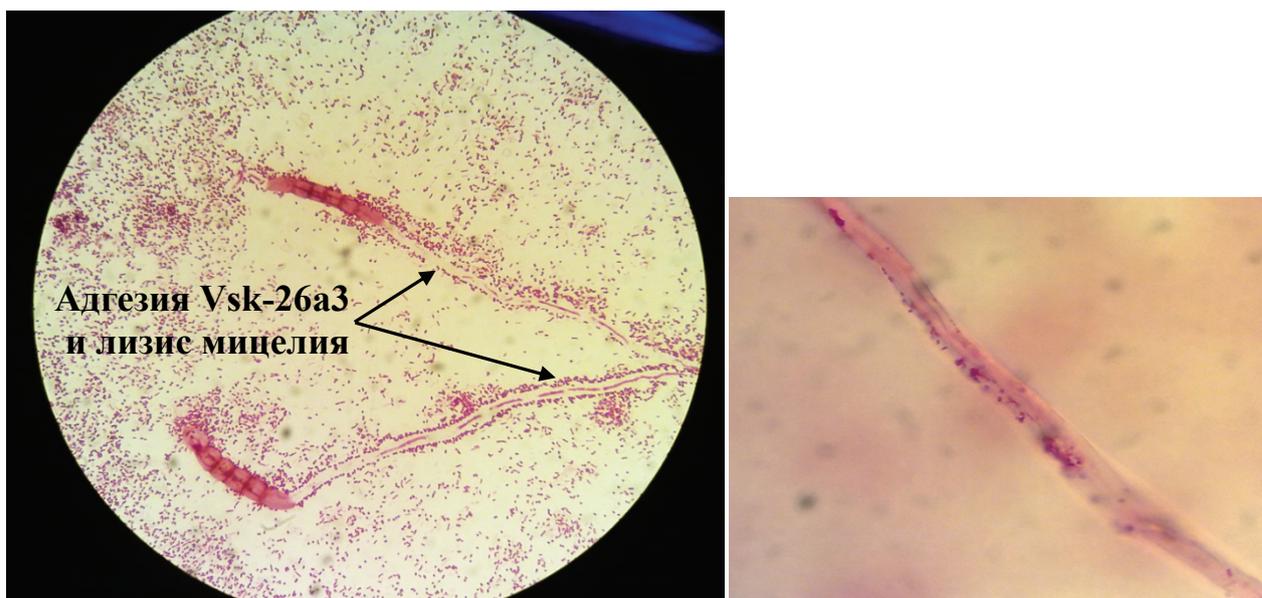


Рисунок 3.15 - Микроскопия мазка совместного глубинного культивирования Vsk-26a3 и *F. culmorum* №23. Увеличение x100

3.5.3 Исследование состава антимикробных метаболитов штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk- 26a3

3.5.3.1. Разделение активных метаболитов

Для выделения активных метаболитов с целью их дальнейшего разделения экстракцию КБФ КЖ штамма Vsk-26a3 проводили растворителями различной полярности, в том числе ацетоном, четыреххлористым углеродом, хлороформом,

дихлорметаном, этилацетатом, этиловым, изобутиловым, изоамиловым и метиловым спиртами (см. раздел 2.7.3). Антагонистическую активность полученных упаренных экстрактов проверяли методом диффузии в агар с МПА для бактериальных и с КГА для грибных патогенов (раздел 2.4). В таблице 3.16 представлены данные для наилучшего из использованных растворителей - хлороформа по наблюдаемым зонам подавления патогенов.

Таблица 3.16 - Антимикробная активность водной и органической фаз после экстракции хлороформом КБЖ штамма Vsk-26a3

Разделенные фазы КБЖ КЖ		Размер зон подавления, мм			
		<i>X. phaseoli</i>	<i>M. luteus</i> МГУ-4	<i>E. caroto- vora</i>	<i>F. sporotri- chioides</i>
Хлорофор- мный экстракт	Без разведения	-	-	11±1	14±1
	разведение 1:10	15±1	22±2	4±0	-
Водная фаза после экстракции	Без разведения	-	-	2±0	0
	разведение 1:10	5±0	5±0	0	-

Примечание – (-) – нет данных

Обнаружено, что обе экстракционные фазы обладают активностью против бактериальных и грибных патогенов. Однако наибольшим антимикробным действием обладает фаза хлороформенного экстракта (ХЭ).

Для разделения активных метаболитов использовали метод тонкослойной хроматографии (ТХС) (см. раздел 2.7.3). Фото пластин после элюирования в системе хлороформ-этилацетат 15:1 двух ХЭ КБЖ КЖ, полученных в результате культивирования при 28 и 15 °С в течение 24 час представлены на рис. 3.16. И визуально, и при УФ облучении ($\lambda=254$ нм) на пластинах наблюдали пятна различного цвета и интенсивности окрашивания.

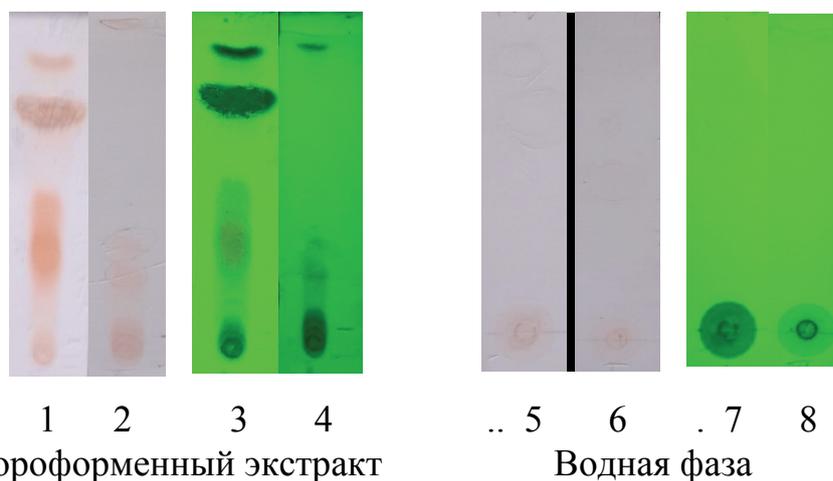


Рисунок 3.16 - Хроматограммы двух хлороформных экстрактов КБЖ КЖ штамма Vsk-26a3: 1,3,5,7 – КЖ получена при 28 °С; 2,4,6,8 - КЖ получена при 15 °С; 3-4, 7-8 - при УФ облучении с длиной волны 254 нм

Для выявления антимикробной активности компонентов, разделённых на хроматографических пластинах, применили биоавтографический метод (раздел 2.7.4). Использовали 3 бактериальных (*X. phaseoli* В-627, *M. luteus* МГУ-4, *E. carotovora* 4966) и 3 грибных патогена рода *Fusarium*. Выборочные данные представлены на рисунке 3.17. На всех фото в каждой чашке на левой пластинке нанесён КБФ КЖ, полученной при 28 °С, на правой – при 15 °С культивирования в течение 24 час. Т.к. штамм Vsk-26a3 является психрофилом, актуален вопрос способности к синтезу антимикробных метаболитов и при пониженных температурах. Но, из-за более высокой скорости накопления антимикробных метаболитов при 28 °С за одинаковое время (24÷26час), для дальнейших исследований практически использовали КБЖ КЖ, полученный при 28⁰С.

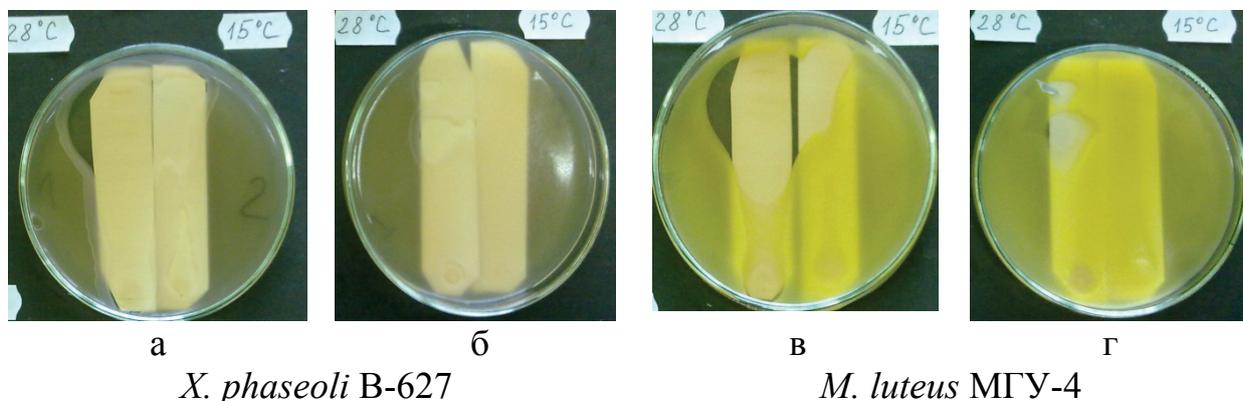


Рисунок 3.17 - Выявление антимикробной активности отдельных компонентов КБЖ КЖ штамма Vsk-26a3 биоавтографическим методом в отношении *X. phaseoli* В-627 и *M. luteus* МГУ-4: а, в - хлороформенный экстракт БКФ КЖ; б, г - водная фаза БКФ КЖ после экстракции хлороформом.

Из сопоставления результатов, представленных на рис. 3.16 и 3.17 видно, что наибольшая зона подавления соответствует наиболее темному пятну в УФ области на пластине, где был нанесен упаренный ХЭ КБЖ КЖ (28 °С). Получено также, что на месте наибольшей зоны подавления фракцией водного экстракта не наблюдается никаких пятен как при видимом свете, так и при УФ облучении. Для проявления таких компонентов требуются дополнительные реагенты.

Для оптимизации процесса разделения компонентов использовали разные системы элюэтов. На рис. 3.18 представлены пластины после обработки двумя разными системами растворителей для разделения фракций ХЭ КБЖ КЖ, выращенной при 28°С. Необходимо отметить, что исходя из наличия нескольких зон активности по длине треков, КБЖ КЖ содержит несколько (групп) метаболитов, обладающих выраженной антимикробной активностью. Хроматограммы на рис. 3.16 и 3.18 получены для ХЭ одного и того же КБЖ КЖ, но хроматограмма на рис. 3.18 получена для БКФ КЖ после его замораживания при -18 °С и последующего оттаивания.

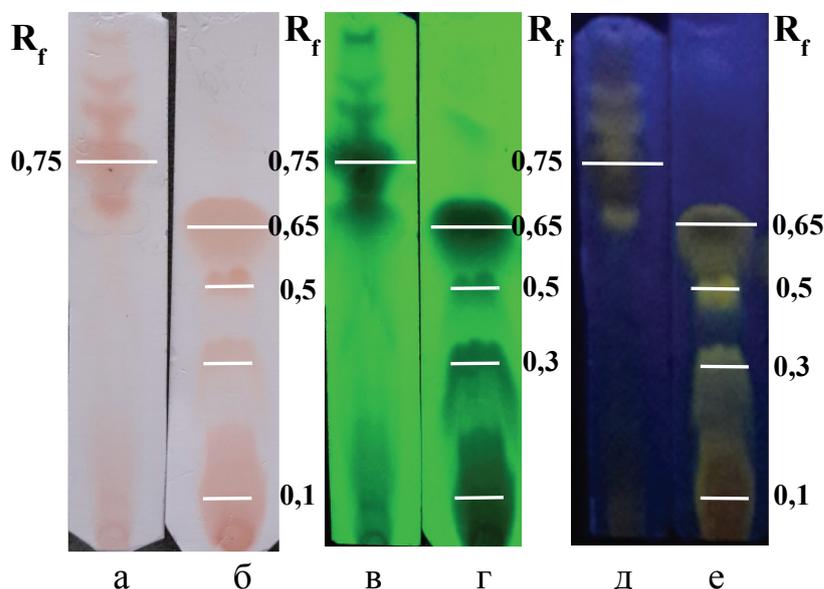


Рисунок 3.18 - Хроматограммы хлороформенного экстракта КБЖ КЖ при видимом свете (а,б) и при УФ облучении (в,г – 254 нм; д,е – 365 нм) после элюирования в смеси хлороформа с ледяной уксусной кислотой 9:1 (а, в, д) и хлороформа с этилацетатом 15:1 (б, г, е)

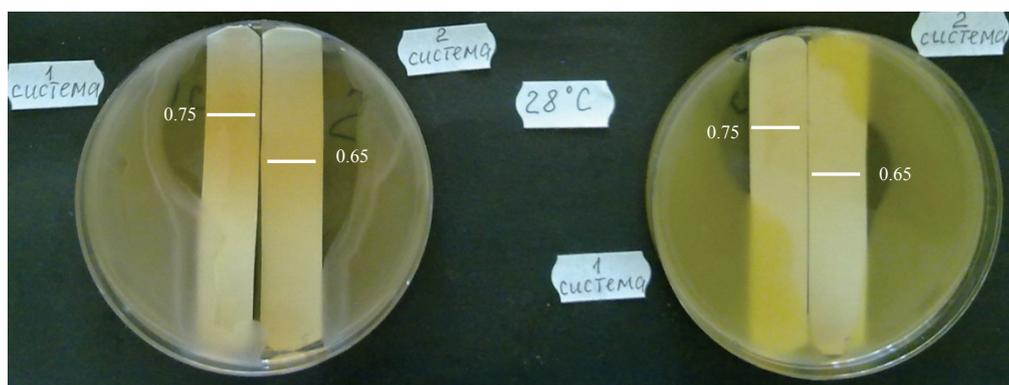
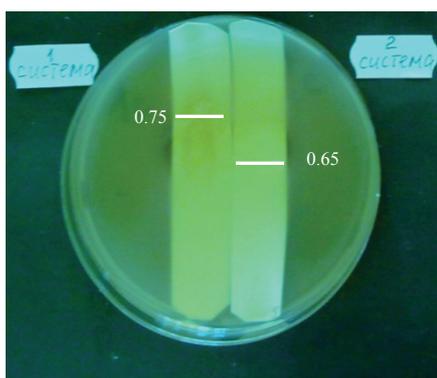
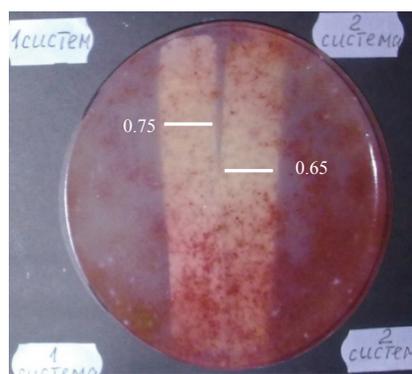
*X. phaseoli* B-627*M. luteus* МГУ-4*E. carotovora* 4966*M. nivale*

Рисунок 3.19 – Биоавтографическое выявление активных компонентов хлороформного экстракта КБЖ КЖ штамма Vsk-26a3: в каждой чашке левая пластинка обработана смесью хлороформа с ледяной уксусной кислотой 9:1 (1 система), а правая – смесью хлороформа с этилацетатом 15:1 (2 система)

Для выявления антимикробной активности разделенных таким образом компонентов (рис. 3.18) также использовали биоавтографический метод (рис. 3.19).

Из сопоставления результатов, представленных на рис. 3.18 и 3.19 следует, что активной в отношении всех исследованных патогенов являлась только фракция, имевшая в первой системе растворителей $R_f=0,7$, а во второй – 0,60-0,65. Поэтому последующие исследования были сконцентрированы на определении состава этой наиболее активной фракции (НАФ) КБФ КЖ штамма Vsk-26a3.

3.5.3.2. Определение состава наиболее активной антимикробной фракции КБЖ КЖ штамма Vsk-26a3

На первом этапе состав пробы НАФ, выделенной с хроматографической пластины Sorbfil, исследовали с помощью газовой хроматографии (раздел 2.7.5).

В исходном виде (без предварительной химической дериватизации) составляющие пробы НАФ на газовом хроматографе не обнаружили, т.е. летучих компонентов с молекулярным весом до 350-400 Да проба НАФ не содержала.

Обработка высушенной аликвоты исследованного спиртового раствора НАФ избытком БСТФА (как отдельно, так и пополам с пиридином), приводило к появлению набора хорошо хроматографирующихся веществ: основное вещество А (в стандартной программе время выхода - 10,24 мин) с содержанием 91-93% по площади пика, одна макропримесь В (11,03 мин) с содержанием 4-6%, другая макропримесь С (11,35 мин) с содержанием 1%, 4-5 микропримесей с содержанием около 0,2-0,4%. Известно, что использованный реактив БСТФА (с 1%-ной примесью триметилхлорсилана) дериватизирует все функциональные группы, содержащие подвижный водород, а именно гидрокси-, карбокси-, аминок-, амидо-, меркапто- и т.п. Поэтому очевидно, что какие-то из этих групп имеются в молекулах изучаемых веществ, что и мешает им хроматографироваться непосредственно без их предварительного химического блокирования.

Обработка пробы НАФ гораздо более слабым силанизирующим реактивом ТРИ-СИЛ приводила к несколько другой картине: основное вещество А и вторая макропримесь С давали в точности такие же пики, как и под действием БСТФА, однако основная макропримесь В из хроматограммы исчезала. ТРИ-СИЛ силанизирует только гидрокси- и карбокси-группы, а амиды и амины он силанизировать не может. По-видимому, главная примесь В имеет иную химическую природу (если сравнивать с основным веществом А), хотя и выходит в хроматограмме довольно близко, и содержит аминокгруппу (первичную или вторичную) или амидную группу тоже первичную или вторичную, явно отсутствующие в основном веществе А и во второй по содержанию макропримеси С.

Обработка пробы НАФ раствором трехфтористого бора в метаноле не давала заметных количеств летучих продуктов – следовательно, вещества А и С содержат не карбоксильные группы (указанный реактив в этих условиях количественно переводит карбоксигруппы в сложноэфирные группы).

Обработка смесью уксусного ангидрида с пиридином давала смесь 5-6 ацетатов, элюирующих довольно близко (10,2-11,5 мин), причем дополнительное выдерживание ацетилируемой пробы в термостате при 80 °С приводило к перераспределению интенсивностей: увеличивалась доля поздно элюирующих ацетатов и уменьшалась доля относительно «легких». Такому результату может быть два объяснения: либо вещество имеет несколько труднодоступных гидроксигрупп, лишь частично ацетилирующихся в данных условиях, либо этот реактив особым образом изомеризует основное вещество с образованием 5-6 очень близких по строению продуктов. В любом случае, функциональные группы вещества А определенно ацетилируются уксусным ангидридом, т.е. основное вещество А явно не содержит карбоксильных и амидных групп.

На втором этапе исследования состава НАФ использовали хроматомасс-спектрометрию (раздел 2.7.5). На рис. 3.20 приведен масс-спектр пробы НАФ.

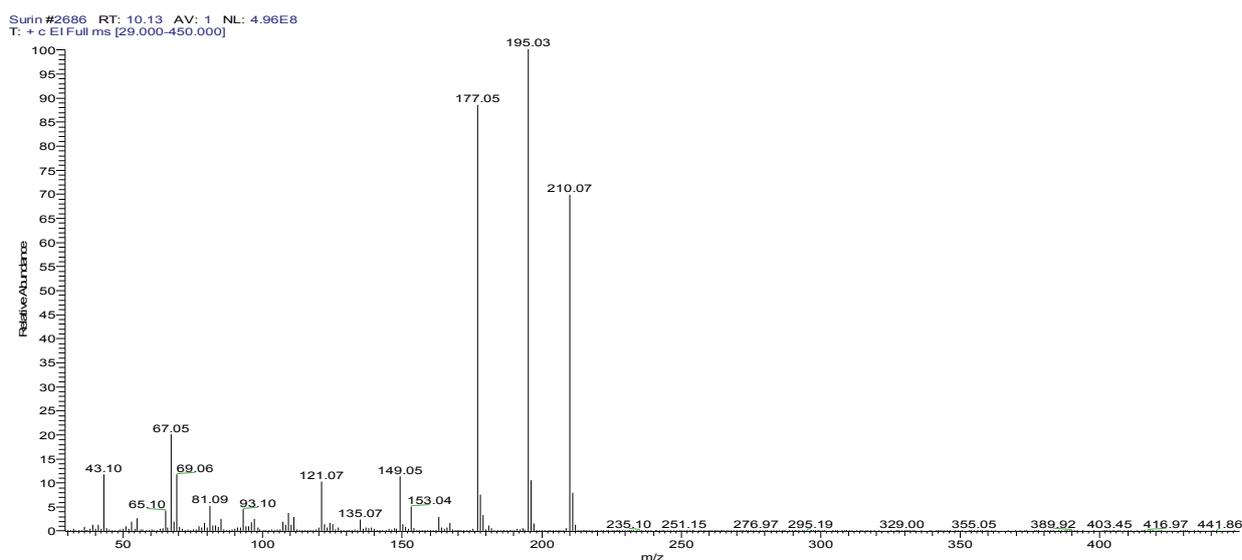
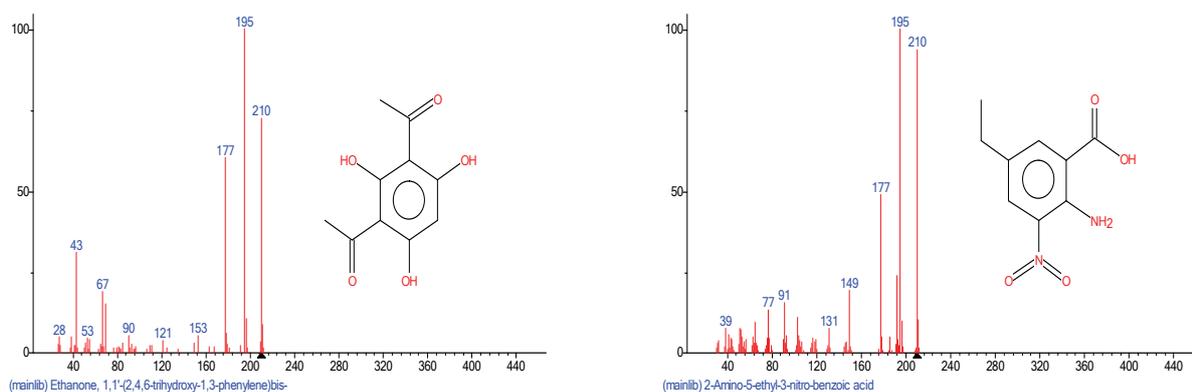


Рисунок 3.20 – Масс-спектр пробы НАФ КБЖ КЖ штамма Vsk-26a3

На основании сравнения полученного масс-спектра с имеющимися базами данных были предложены две возможные структуры основного вещества НАФ (рис. 3.21).



а

Б

Рисунок 3.21 – Масс-спектры 2,4-диацетилфлороглюцина (а) и 2-амино-5-этил-3-нитро-бензойной кислоты (б).

Газохроматографические исследования первого этапа показали, что основное вещество НАФ не содержит амино- и карбоксигрупп и может содержать труднодоступные гидроксигруппы. Кроме того, из литературных данных известно, что 2-амино-5-этил-3-нитробензойная кислота антибактериальной активностью не обладает (BioAssay Record for AID, 1949). Поэтому из двух предложенных на основе масс-спектрометрии структур была выбрана первая.

Таким образом, основной антимикробный компонент, продуцируемый штаммом Vsk-26a3, определили как 1,1'-(2,4,6-тригидрокси-1,3-фенилен)-бисэтанон или, как его чаще называют, 2,4-диацетилфлороглюцин (2,4-ДАФГ). 2,4-ДАФГ известен как антибиотик, эффективный против бактерий, грибов, вирусов и нематод [9, 100]. 2,4-ДАФГ продуцируют некоторые виды псевдомонад, а содержание его в антимикробном комплексе может достигать 80 % [100].

3.5.3.3. Определение других антимикробных метаболитов штамма Vsk-26a3

2-Оксифеназин и 2-оксифеназин-1-карбоновая кислота (2-ОФК), содержащие гидроксигруппу при втором углеродном атоме феназинового ядра являются антимикробными пигментами, специфическими для *P. chlororaphis* [100].

Производные 2-оксифеназина имеют окраску от желтой до ярко-красной. Сам исследуемый штамм также имеет схожую оранжево-розовую окраску

колоний и КЖ. На приведенных выше хроматограммах (рис.16 и 18) хорошо видно несколько пятен, окрашенных в оранжево-розовые тона, и соответствующих зонам подавления патогенов (рис. 3.17, 3.19). Окраска пятен на хроматограммах усиливалась после обработки формалином (рис. 3.22), что определенно указывает на присутствие 2-оксифеназинов в составе антимикробного комплекса, продуцируемого штаммом Vsk-26a3 [186].

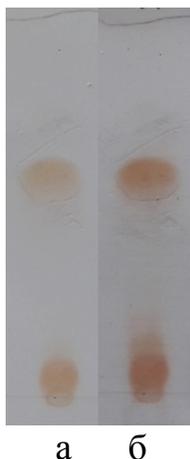


Рисунок 3.22 – Хроматограмма хлороформенного экстракта КБЖ КЖ штамма Vsk-26a3: а – до обработки формалином; б – после обработки формалином, для определения присутствия 2-оксифеназина

Хроматограмма на рис. 22 получена из того же КБЖ КЖ, что и хроматограммы на рис. 3.16 и 3.18, но с его дополнительным фильтрованием после хранения (замораживания и оттаивания).

Как известно, 2-ОФК имеет ярко-красную окраску и дает оранжевую флуоресценцию в УФ свете [100, 186]. В этой связи яркое пятно на хроматограмме на рис. 3.16.1 и 16.3, с $R_f = 0,32$ может представлять собой именно это соединение.

Известно, что 2,4-ДАФГ – бесцветное соединение, однако на всех хроматограммах основное пятно, содержавшее 2,4-ДАФГ, имело окраску от оранжевой до розовой (рис. 3.16.1, 18а и б) и приобретало красный оттенок после обработки формалином (рис. 3.22), что указывает на присутствие в составе НАФ 2-оксифеназинов. Поскольку основная примесь В в составе НАФ имеет амино- или амидогруппу, можно предположить, что примесь В является амидом 2-ОФК.

Наличие антибактериальной активности у различных фракций, выделенных с хроматограмм, приведенных на рис. 3.18б и 3.22 показано на рис. 3.23.



X. phaseoli B-627



M. luteus МГУ-4

Рисунок 3.23 – Антибактериальная активность различных фракций ХЭ КБЖ КЖ, выделенных с хроматографических пластин: №1 - $R_f = 0,5$, №2 - $R_f = 0,3$, №3 - $R_f = 0,1$, №5 - $R_f = 0,65$ (рис. 3.18б); №9 - $R_f = 0,1$ (фильтрат) и №10 - $R_f = 0,65$ (фильтрат) (рис. 3.22)

Как видно из рис. 3.23, все использованные фракции имели антибактериальную активность. Наибольшую активность, как и следовало ожидать, имела фракция №5, выделенная с хроматограммы, представленной на рис. 18б, с $R_f = 0,65$. Активность фракций с $R_f = 0,1$ и $R_f = 0,65$ с пластины, представленной на рис. 3.22, оказалась ниже активности аналогичных фракций с пластины, представленной на рис. 3.18б, очевидно, из-за дополнительного фильтрования КБЖ КЖ после размораживания. Из сравнения УФ спектров фракций (рис. 3.24), можно сделать вывод, что качественный состав фракций при этом не изменился. Из рисунка 3.24 видно, что все спектры сходны между собой, из чего можно предположить, что в состав пятен с $R_f = 0,1$ входит другое производное флороглюцина, а именно, триацетилфлороглюцин, как это наблюдалось для штамма *P. aurantiaca* в [93, 100]. Триацетилфлороглюцин менее активен, чем ДАФГ, что согласуется с данными по диаметрам зон подавления патогенов на рис. 3.22 для фракций под №№3 и 5. Моноацетильное производное флороглюцина – флорацетофенон - не активно в отношении бактерий и грибов [93].

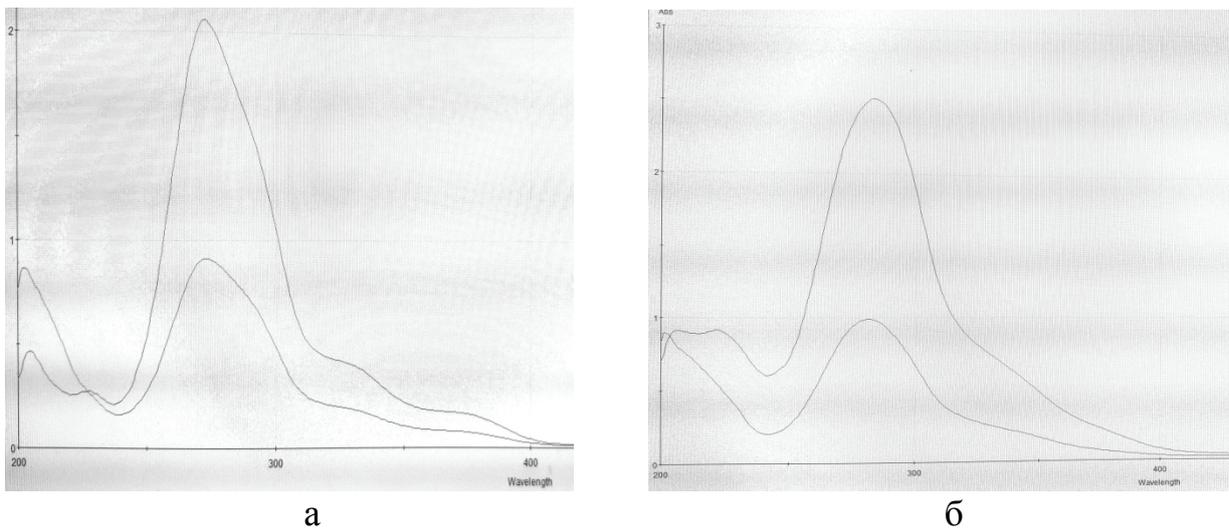


Рисунок 3.24 – Спектры поглощения фракций ХЭ КБЖ КЖ штамма Vsk-26a3 с R_f 0,65 (а) и 0,1 (б): красные линии – фракции с хроматограммы, представленной на рис. 18б; синие линии - фракции с хроматограммы на рис. 22

Для выяснения природы других антимикробных компонентов КБЖ КЖ штамма Vsk-26a3 пластины с хроматограммами упаренной водной фазы обработали раствором нингидрина. Характерную окраску с нингидрином, указывающую на присутствие полипептидов, дало только стартовое пятно, компоненты которого проявляли антимикробную активность (рис. 3.25). Таким образом, можно предположить, что одним из антимикробных компонентов, продуцируемых штаммом Vsk-26a3, могут быть полипептиды. Природа двух других активных фракций из водной фазы с $R_f=0,6$ и $0,8$ (рис. 17б и г) осталась невыясненной.



Рисунок 3.25 – Хроматограммы водной фазы КБЖ КЖ штамма Vsk-26a3 после экстракции хлороформом: а) до обработки раствором нингидрина; б) после обработки раствором нингидрина

3.5.4. Заключение по разделу 3.5

Проведенные эксперименты показали, что одним из основных механизмов антагонистической активности штамма Vsk-26a3 является синтез антимикробных метаболитов. Штамм Vsk-26a3 более активно синтезирует антимикробные соединения при его совместном глубинном культивировании с живыми клетками антагониста *Candida albicans*.

Полученные результаты позволяют сделать заключение, что штамм Vsk-26a3 продуцирует не менее 7 антимикробных метаболитов, не менее четырёх из которых экстрагируются хлороформом. Основной антимикробный метаболит идентифицирован как 2,4-ДАФГ – антибиотик широкого спектра действия, активный также против грибов и нематод, продуцируемый многими видами псевдомонад. Возможно, что в состав антимикробного комплекса штамма Vsk-26a3 входит и другое производное флороглюцина - менее активный, чем ДАФГ, триацетилфлороглюцин.

Штамм Vsk-26a3 продуцирует антимикробные пигменты - производные 2-оксифеназина, среди которых могут быть 2-ОФК и ее амид.

В числе антимикробных метаболитов штамма Vsk- 26a3 могут быть и полипептиды.

Таким образом, установили, что штамм Vsk-26a3 является продуцентом большого числа антимикробных веществ различной природы и спектра действия, что делает его перспективным для производства на его основе антимикробных препаратов. Возможно, именно синергическое взаимодействие компонентов позволяет проявлять этому штамму высокую антагонистическую активность против широкого круга разнообразных патогенов человека, животных и растений и для конкретных случаев использования (как, например, смешанные инфекции, фитопатогены невыясненной этиологии) – может быть целесообразно и экономично применение неразделенного «антимикробного комплекса» как единого препарата для различных целей.

3.6. Разработка методов получения экспериментальных образцов препаратов на основе штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 и его метаболитов

3.6.1. Оптимизация состава питательных сред и условий глубинного культивирования

Данная оптимизация направлена на создание более дешевой сбалансированной питательной среды и подбор условий культивирования для получения высокоэффективного биопрепарата и продуктов вторичного синтеза. При этом, важно, чтобы получаемый продукт на основе штамма Vsk-26a3 или комплекса его метаболитов в процессе биосинтеза и последующей переработки – не потерял большой, заложенный в культуре потенциал антимикробного действия.

В первой основной серии экспериментов по оптимизации подбирали источник азота при прочих одинаковых условиях. Единоновременно проверяли три источника азота в трех количественных уровнях: два органических – гидролизат казеина, гидролизат рыбной муки и один минеральный – NH_4Cl с добавлением трёх различных доз дрожжевого экстракта (ДЭ) и без него. Варианты питательной среды на минеральной основе с добавлением ДЭ имели общий уровень накопления биомассы с вариантами на органической основе и составляли $1,6 \div 1,8 \times 10^{10}$ КОЕ/мл. При культивировании микроорганизмов, с какой бы целью оно не проводилось, важным является определение такой характеристики, как максимальная удельная скорость роста микроорганизмов (раздел 2.8.), отражающая потенциал сред и условий выращивания. Максимальная удельная скорость роста μ_{\max} была выше на минеральной среде с добавлением 0,5 % глюкозы. Общий выход живых клеток был сопоставим в вариантах опыта. В таблице 17 представлены варианты сред с лучшими результатами по выходу биомассы.

Таблица 17.-Подбор источника азота в питательной среде

Источник азота	ДЭ, %	M_{\max}	КОЕ/мл
Casein Hydrolysate 20 г/л	0,25	0,36	$(1,6 \pm 0,21) \times 10^{10}$
ГРМ 20 г/л	0,25	0,35	$(1,6 \pm 0,23) \times 10^{10}$
NH_4Cl 1 г/л	0,50	0,56	$(1,8 \pm 0,20) \times 10^{10}$

Для дальнейшей оптимизации выбрали минеральную среду на основе NH_4Cl (1 г/л), которая экономически предпочтительней богатых сред.

В последующих уточняющих сериях экспериментов подбирали оптимальные источники углерода, рН среды, температуру и длительность культивирования по параметрам скорости роста популяции и антимикробной активности при выращивании на выбранной минеральной среде. Также исследовали влияние цитрата натрия, стимулятора метаболической активности, одного из ключевых компонентов цикла трикарбоновых кислот, на активность штамма. Процесс культивирования контролировали отбором промежуточных и заключительных проб путем подсчёта концентрации клеток и определением антимикробной активности на чашках с ГРМ агаром и КГА на тестовых культурах и патогенах человека и растений (В качестве тест-объектов использовали: *Micrococcus luteus* МГУ-1, *Xantomonas campestris* sp. *phaseoli* ВКМ-627, *Candida albicans*, *F. graminearum* VL-1735, *F. sporotrichioides*, *M. nivale*).

В результате установили, что при глубинном культивировании штамма Vsk-26a3 на питательных средах, различающихся по составу и количеству углеродсодержащих соединений, уровень накопления антимикробных компонентов существенно различался. Так, значения измерений, представленные в таблице 3.18, демонстрируют, что при использовании в качестве источника углерода галактозы, мелассы и крахмала антимикробная активность почти не обнаруживается, хотя концентрация выросших клеток была довольно высокой. Лучшие результаты по активности выявили при использовании глюкозы и глицерина. Так на основании высокой скорости роста, уровня накопления биомассы и синтеза активных метаболитов для дальнейших экспериментов отобрана питательная среда на основе NH_4Cl (1 г/л), ДЭ (0,5 %), глицерина (1 %). Оставшиеся компоненты питательной среды такие как 1- и 2- замещённый фосфат калия, сульфат магния, хлорид аммония и микроэлементы были взяты в стандартных количествах для выращивания псевдомонад [6, 7].

Таблица 3.18 – Антимикробная активность супернатантов в зависимости от источника углерода в среде культивирования штамма Vsk-26a3

№	Источник углерода	Содержание, %	ОП кон.	Размер зон подавления, мм		
				<i>S. tiphimurium</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>M. luteus</i>
1	Глюкоза	1,0	14,5	5±0	6±1	7±1
2	Крахмал	1,0	3,0	0	0	3±1
3	Меласса	1,0	18,0	0	0	1±0
4	Галактоза	1,0	5,5	0	0	(5±1)*
5	Глицерин	1,0	17,0	5±0	5±0	9±1
6	сахароза	1,0	17,0	7±1	0	3±0
7	целлюлоза	1,0	1,2	0	0	0

Примечание: (*) - угнетение роста

Также, для обеспечения более высокого выхода антибактериальных веществ, тестировали различные температуры культивирования штамма. Оказалось, что максимальная удельная скорость роста культуры расположена в области температур 25÷35 °С (рис. 3.26).

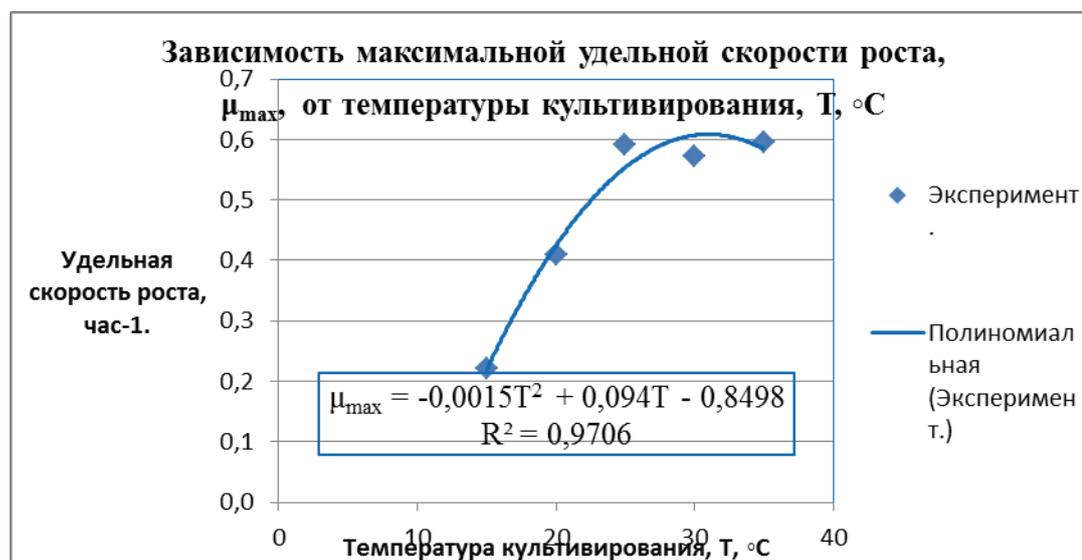


Рисунок 3.26 - Зависимость максимальной удельной скорости роста от температуры культивирования

Максимальный синтез активных продуктов и наибольший выход биомассы на 24 часа роста штамма наблюдается также при 20÷30 °С (табл.3.19, рис.3.26).

Таблица 3.19 - Антимикробная активность штамма Vsk-26a3 на 24 час культивирования

Т°С	Размер зон подавления, мм	
	<i>B. coagulans</i>	<i>M. luteus</i>
35	3±0	3±0
30	11±1	10±1
25	5±0	7±1
20	6±1	8±1
15	3±0	3±0

Однако обнаружено, что штамм Vsk-26a3 имеет такую же противомикробную активность при 28 °С через 24 час культивирования, как и при 15 °С, если увеличить время культивирования до 35 час (рис. 3.27). Этот факт даёт основания предполагать о высокой антимикробной активности штамма при пониженных температурах, что очень важно в природных условиях. В то же время, с технологической и экономической точки зрения более предпочтителен ускоренный синтез биомассы и метаболитов в зоне повышенных (20÷30 °С) температур выращивания, поэтому для дальнейших исследований выбрали температуру культивирования 28 °С.

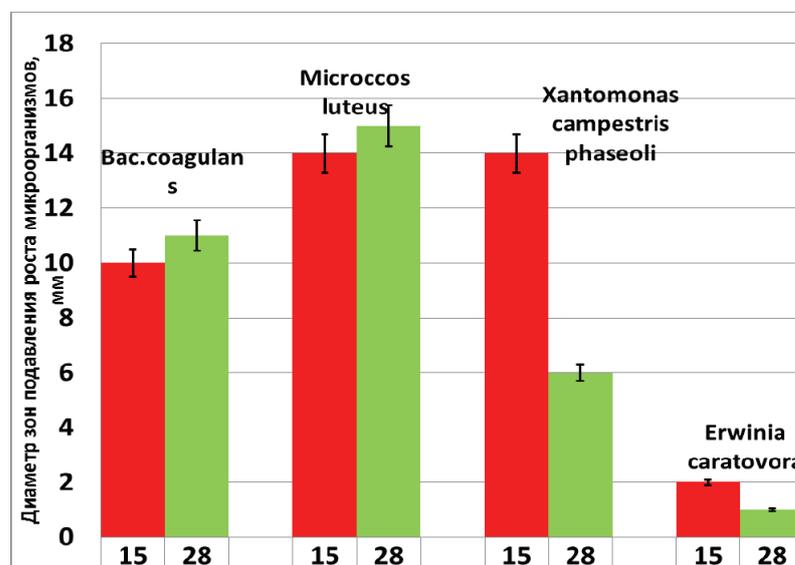


Рисунок 3.27 - Влияние температуры и времени культивирования на антибактериальную активность штамма Vsk-26a3: *B. coagulans*, *M. luteus*, *X. campestris*

Значение рН культивирования также имеет важное значение для синтеза вторичных метаболитов. Исследовали значение начальных величин рН в

диапазоне $3,5 \div 8,0$. Оптимальное значение для синтеза антимикробных метаболитов находится в зоне $pH_0 = 5,5 \div 7,0$, т.е. в слабо-кислых условиях среды (рис.3.28).

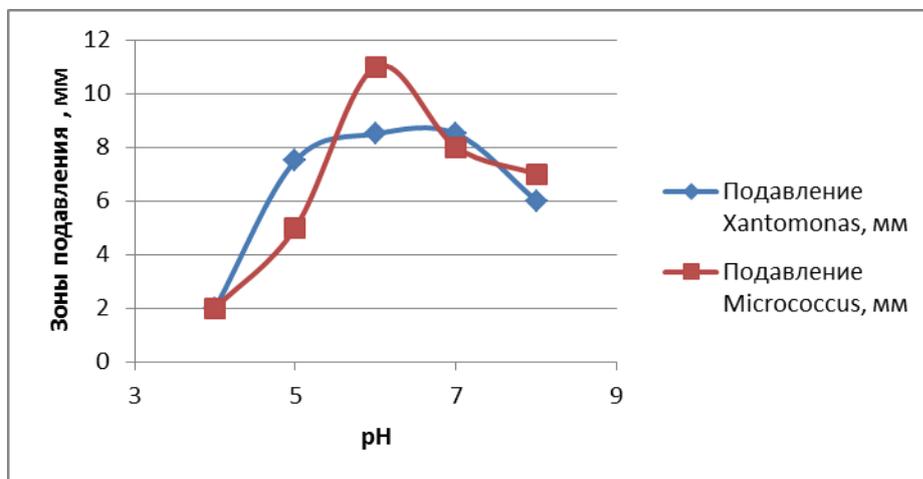


Рисунок 3.28 – Зависимость активности БК КЖ от показателя pH среды при культивировании при 28°C 24 час

По результатам проведенных исследований, подобрали оптимальные варианты питательных сред, которые в опытах на колбах обеспечивали более высокий выход бактериальной массы и синтеза антимикробных метаболитов штамма Vsk-26a3, что тестировали по величине антагонистической активности КЖ. Выбрали 2 рецептуры питательных сред для периодического глубинного культивирования продуцента в ферментерах (рабочим объемом 8 л). Первый вариант составили для культивирования с оптимальным количественным соотношением биомассы и антимикробных метаболитов (таблица 3.20). Второй вариант питательной среды (таблица 3.21) подобрали для обеспечения максимального синтеза активных метаболитов.

Таблица 3.20 - Состав питательной среды №1 для наработки биомассы и метаболитов Vsk-26a3

№	Компонент	Концентрация, г/л
1	2	3
1	Глицерин	10,0
2	Хлорид аммония	6,0
3	Калия фосфат 1-замещённый	3,0

1	2	3
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

pH₀ = 5,5 ÷ 7,0

Таблица 3.21 - Состав питательной среды №2 для максимального получения антимикробных метаболитов штамма Vsk-26a3

№	Компонент	Концентрация, г/л
1	Глицерин	10,0
2	Сульфат аммония	1,0
3	Калия фосфат 1- замещённый	1,5
4	Калия фосфат 2- замещённый	3,0
5	Магния сульфат	0,05
6	цитрат натрия × 7 H ₂ O	0,25
7	Микроэлементы	10,0 мл
8	Вода	До 1 л

pH₀ = 5,5 ÷ 7,0

Провели сравнительный анализ антагонистической активности БФ КЖ штамма Vsk-26a3, выращенного на подобранных средах №1, №2 и классических питательных средах для выращивания псевдомонад: средой LB и модифицированной средой Кинга В (таблица 3.22).

Таблица 3.22 - Сравнительный анализ оптимизированной среды №1 со средами LB и Кинг В при культивировании при 28 °С 24 час

Среда	Выход жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	Размер зон подавления БФ КЖ, мм		
		<i>Xantomonas phaseoli</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Micrococcus 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
№1	$1,6 \pm 0,33 \times 10^{10}$	9±1	2±0	9±1
№2	$1,0 \pm 0,20 \times 10^{10}$	13±1	3±0	14±1

Примечание – (*) – угнетение

Оказалось, что количество живых клеток Vsk-26a3 полученных на среде №1 (для оптимальной наработки биомассы и метаболитов) сопоставимо с титром клеток на средах LB и Кинг В, по синтезу активных метаболитов среда №1 более эффективна. Количество живых клеток Vsk-26a3 полученных на среде №2 (для максимального получения антимикробных метаболитов) уступает титру клеток на средах LB и Кинг В, но по синтезу активных метаболитов намного превосходит их (табл. 3.22). При этом среды LB и Кинг В имеют высокую себестоимость, что ограничивает их применение. Разработанные нами минеральные среды являются экономически более выгодными и стандартизованными.

Решение задачи оптимизации ферментационных сред и условий культивирования микроорганизмов с целью повышения выхода биомассы и/или накопления вторичных метаболитов основывается на проведении многочисленных экспериментов. Существенно сократить объём работ может использование программных продуктов, например программное обеспечение IMMД (интегрированная математическая модель развития) [43, 170]. Основные положения выбранной модели следующие:

1- возрастная структура популяции к концу периодического процесса культивирования изменяется следующим образом: число делящихся клеток стремится к 0, число неделящихся возрастает экспоненциально;

2 - вторичные метаболиты синтезируют только делящиеся клетки;

3 - при лимитировании любым компонентом питательной среды в процессе культивирования вторичные метаболиты могут служить источником N, C и др. элементов питания для неделящихся клеток и/или источником энергии поддержания их жизнедеятельности.

Компьютерная программа с помощью графиков показывает, насколько оптимален состав питательной среды, демонстрирует динамику роста культуры в зависимости от времени, количества делящихся и неделящихся клеток (нулевого возраста клеточного цикла) штамма. Большое число делящихся клеток определяет интенсивность синтеза вторичных метаболитов, уменьшение числа –

завершение этого процесса. Максимальные значения неделящихся клеток и отсутствие делящихся являются ключевым признаком для завершения процесса наработки биомассы, т.к. неделящиеся клетки лучше переносят высушивание и дольше хранятся, что очень важно для производства биопрепаратов.

3.6.2. Оптимизация глубинного культивирования с целью получения биомассы

Глубинное культивирование штамма Vsk-26a3 проводили в ферментёре с рабочим объёмом 8 литров. Экспериментально установлено, что на питательной среде №1 при 28 °С рост биомассы и наработка антимикробных соединений штаммом происходит в период 16–24 часа роста, после чего рост культуры замедляется, а синтез антимикробных соединений не растёт. В течение всего процесса культивирования контролировали рост клеток по динамике оптической плотности и накоплению активных метаболитов (метод лунок), рН среды, аэрацию, обороты мешалки, температуру в реакторе. На рисунке 3.29 представлена типичная кривая роста клеток штамма Vsk-26a3 при глубинном культивировании с целью получения максимального выхода биомассы. На данном рисунке синим цветом отражён общий выход биомассы, который состоит из делящихся клеток (красная линия) и неделящихся клеток (зелёная линия), жёлтым цветом выделена зона экспоненциального роста, зелёным - зона замедленного роста. Чёрными точками обозначены экспериментальные данные в фазе роста, белыми – в стационарной фазе или фазе убывания. На графике отражено совпадение процесса роста популяции с расчётной моделью, полученной с использованием программного обеспечения (синяя линия). Однако на заключительном этапе культивирования математическая модель прогнозирует дальнейший небольшой прирост биомассы (синяя пунктирная линия) при условии дополнительной подачи лимитирующих процесс компонентов питательной среды.

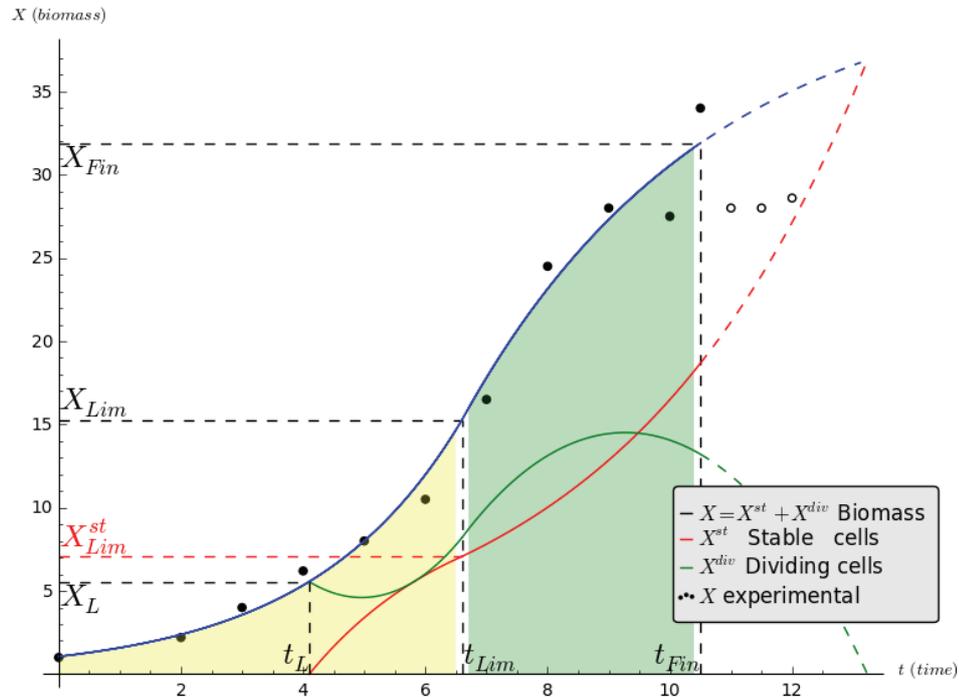


Рисунок 3.29 - Динамика накопления биомассы клеток Vsk-26a3 при культивировании в ферментёре ($V=8\text{л}$)

Окончание процесса культивирования сопровождается понижением оптической плотности, повышением значения рН КЖ, уменьшением потребления O_2 , а также образованием в КЖ конгломератов в виде мелких видимых глазом крупинок.

3.6.3. Оптимизация глубинного культивирования с целью синтеза активных метаболитов

Для глубинного культивирования в ферментёре использовали среду №2. Уровень антагонистической активности в КЖ в процессе культивирования оценивали путем отбора проб в определенные отрезки времени (до 16 ч роста – через каждые 4 ч, далее – через 2 ч). Антагонистическую активность проб в процессе культивирования контролировали методом диффузии в агар (раздел 2.4.). Т.к. зоны подавления роста патогенов БФ КЖ удовлетворительно коррелируют с МИК (раздел 2.4.) при стандартном титровании, их размеры были использованы при построении графиков по IMMД программному обеспечению.

На рисунках 3.30 и 3.31 представлена динамика накопления антимикробных веществ при глубинном культивировании штамма с целью

получения максимального выхода активного продукта. Обработка результатов процесса для кривых роста биомассы и динамики синтеза продукта выполнена с помощью IMMД программного обеспечения. На графиках сплошной линией представлен фактический выход продукта, пунктирной - прогноз синтеза. Розовым цветом выделена стационарная зона роста биомассы. Как видно из графиков, прогноз синтеза активных метаболитов оказался выше, что говорит о лимитировании компонентами питательной среды и, как следствие, возможной утилизации клетками штамма целевых метаболитов. Анализ этих данных показывает потенциал повышения выхода метаболитов при доработке состава питательной среды.

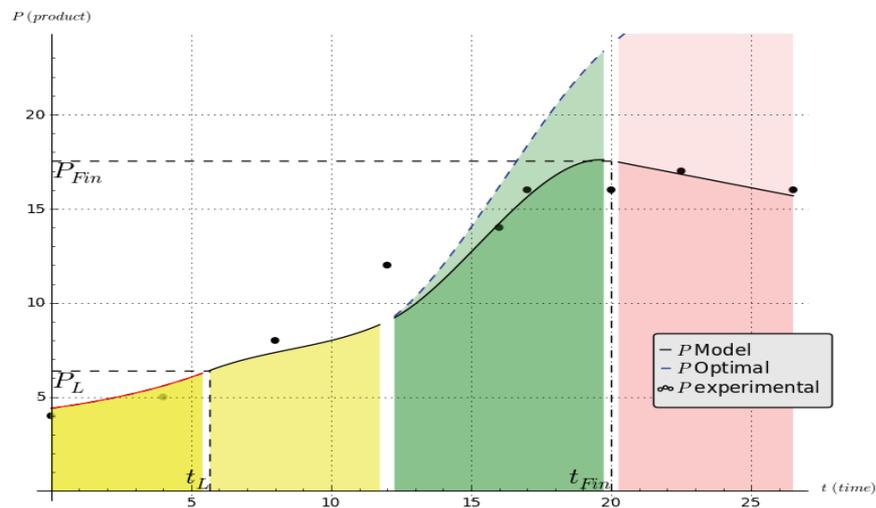


Рисунок 3.30 - Динамика синтеза антимикробных веществ (при использовании *B. coagulans* в качестве тест-объекта)

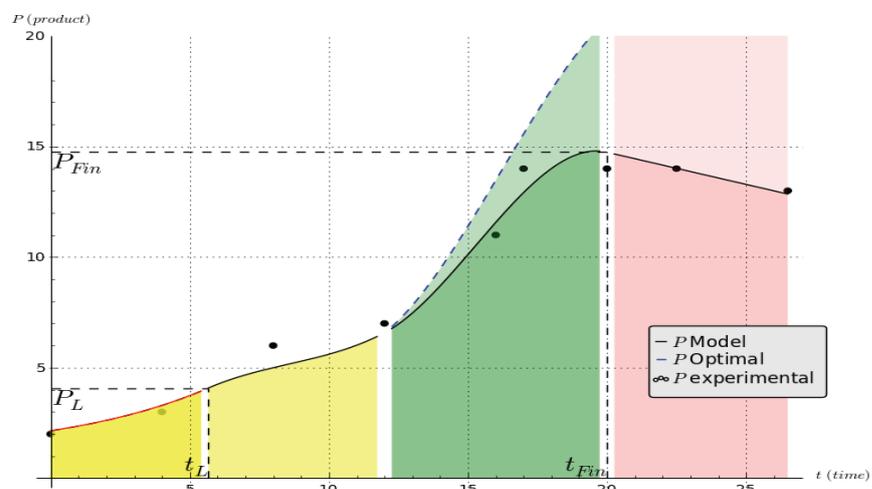


Рисунок 3.31 - Динамика синтеза антимикробных веществ в отношении *Xantomonas phaseoli*

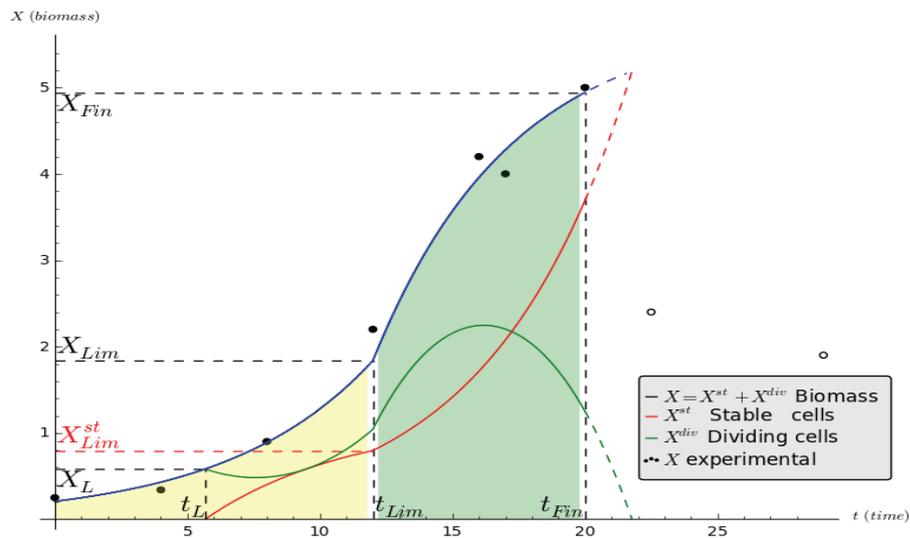


Рисунок 3.32 - Динамика синтеза биомассы

Анализ графиков, представленных на рисунках 3.30 и 3.31, позволил предположить, что появление антимикробных соединений в КЖ начинается с 6÷8 час роста. К 20 часам роста количество активных метаболитов достигает максимума. При анализе динамики синтеза биомассы (рис. 3.32), наблюдаем совпадение линий практического выхода клеток с прогнозом. Это означает, что на среде данного состава получен максимальный выход биомассы. Также при сопоставлении данных на рис. 3.30, 3.31, 3.32 отмечается совпадение по времени максимального накопления антимикробных метаболитов и максимальной оптической плотности культуры.

Анализ кривой прогноза по выходу активных метаболитов с помощью IMMД программного обеспечения (рис. 3.30 и 3.31), потребовал произвести коррекцию состава исходной питательной среды №2 (табл. 3.21.) в сторону увеличения количества некоторых компонентов (модифицированная среда №3, табл. 3.23).

Таблица 3.23 - Модифицированный состав питательной среды для максимального получения антимикробных метаболитов, среда №3

№	Компонент	Среда №2 Концентрация, г/л	Среда №3 Концентрация, г/л
1	2	3	4
1	Глицерин	10,0	10,0
2	Сульфат аммония	1,0	2,0

1	2	3	4
3	Калия фосфат 1- замещённый	1,5	1,5
4	Калия фосфат 2- замещённый	3,0	3,0
5	Магния сульфат	0,05	0,25
6	цитрат натрия×7 H ₂ O	0,25	0,25
7	Микроэлементы	10,0 мл	10,0 мл
8	Вода	До 1 л	До 1 л

$pH_0 = 5,5 \div 7,0$

На модифицированной среде (№3) наработали биомассу Vsk-26a3, оценили динамику синтеза антимикробных соединений, используя в качестве тест-системы *Micrococcus luteus* и *Xantomonas phaseoli* (рис 3.33 и 3.34).

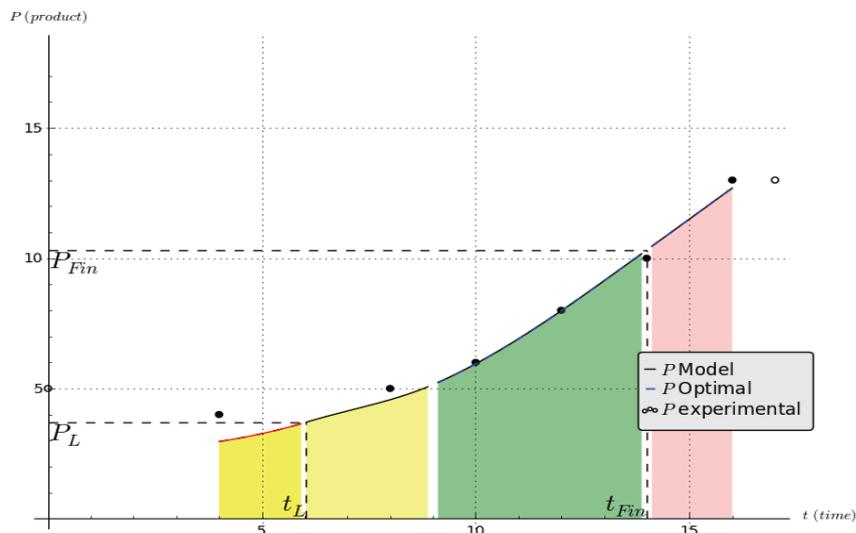


Рисунок 3.33 - синтез антимикробных веществ в отношении *Micrococcus luteus* на модернизированной среде

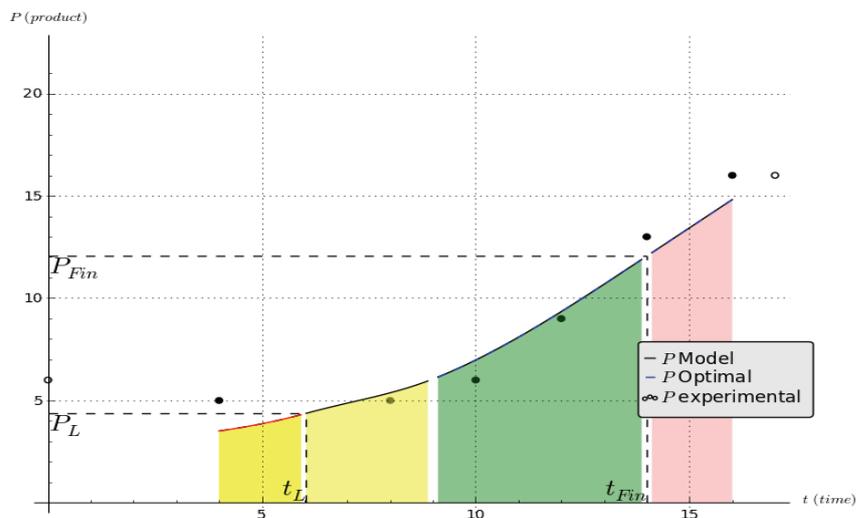


Рисунок 3.34 - Синтез антимикробных веществ в отношении *Xantomonas phaseoli* на модернизированной среде

Достоверное появление антимикробных соединений в КЖ отмечается в период 6 - 8 ч.р. от начала культивирования. К 16 ч. р. количество активных метаболитов достигает наибольшего значения. К сожалению, процесс культивирования завершили преждевременно и максимума синтеза достигнуть не удалось (рис 3.33 и 3.34). Из графиков на рисунках чётко видно, что фактический выход антимикробных веществ полностью совпал с прогнозом, полученным с помощью программного обеспечения. Это говорит о том, что данный процесс культивирования проведён без лимитирования по компонентам питательной среды, с максимально возможным синтезом антимикробных метаболитов на данной среде. Хотя практический выход активного продукта был получен несколько выше, чем на нескорректированной среде, однако удалось сократить время процесса культивирования на 5 часов, что является существенным технологическим преимуществом. Также из графика (рис. 3.35) видно, что на момент завершения культивирования в среде ещё содержалось достаточно большое количество делящихся клеток. Это даёт основание предположить, что продление процесса ферментации могло бы дать ещё больший выход активных метаболитов.

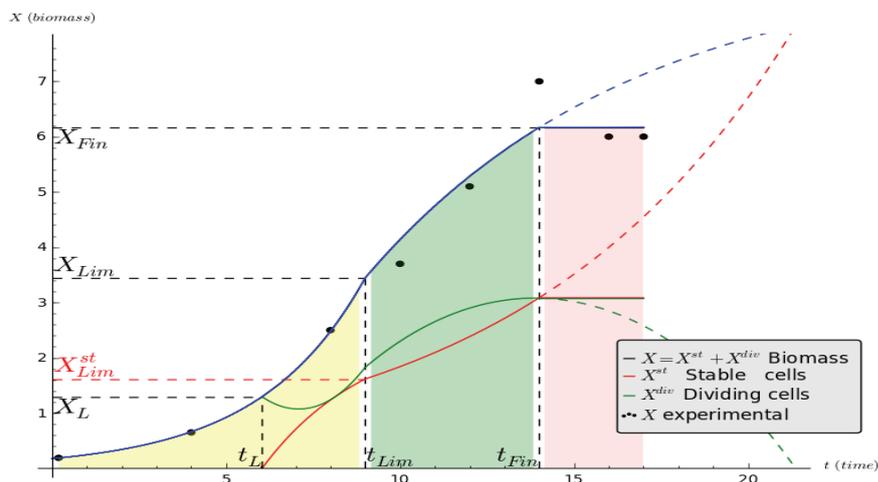


Рисунок 3.35 - Динамика синтеза биомассы

Из графика на рисунке 3.35 следует, что прекращение роста биомассы происходит к 14÷16 часам, предположительно под воздействием накопления вторичных метаболитов, проявляющих ингибирующие свойства.

Аутоингибирующую активность собственных метаболитов оценили на газоне культуры Vsk-26a3, на который каплями нанесли следующие образцы БФ КЖ: на 17 час роста культуры, 19 час роста, 21 час роста и КБЖ КЖ (21 час роста) (рис. 3.36).

Оказалось, что аутоингибирующая активность зависит от времени роста культуры Vsk-26a3: с увеличением времени культивирования увеличивается аутоингибирующая активность.

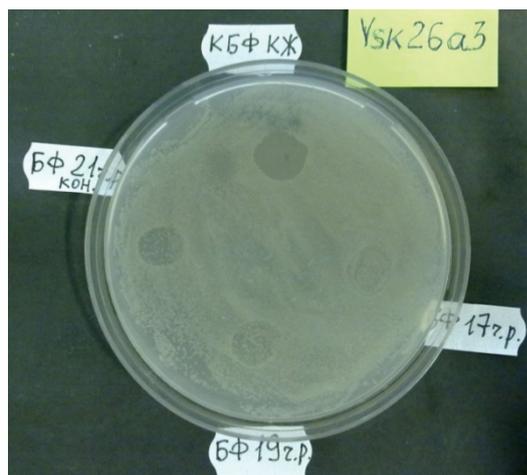


Рисунок 3.36 – Аутоингибирующая активность Vsk-26a3 в зависимости от времени культивирования клеток

Таким образом, попытка дальнейшего повышения выхода культуры или комплекса антимикробных метаболитов (за счет техники fed-batch культивирования или высокоплотного выращивания) будет приводить к усилению аутоингибирующей активности клеток.

После проверки качества разработанных сред провели сравнительную экономическую оценку отобранных сред №1, №3 и классических питательных сред для выращивания псевдомонад: средой LB и модифицированной средой Кинга В. При этом предполагали, что в структуре себестоимости затраты по энергии, стоимость труда, прочие прямые расходы, налоговые издержки – для разных сред сопоставимы, и для сравнения себестоимости сред использовали ключевую составляющую – стоимость сырья. Расчеты с использованием оптовых цен на компоненты питательных сред показали, что себестоимость по сырью среды №1 (для наработки биомассы и метаболитов) составила 1121,64 руб за 100л среды, для среды №3 (для максимального получения антимикробных

метаболитов) - 481,79 руб за 100л среды, в то время как себестоимость по сырью 100л среды LB и среды Кинга В составили 2202,33 и 3382,80 руб/100 л соответственно. Таким образом, предлагаемые среды №1 и №3 в 2,0-7,1 раз дешевле общепринятых сред для псевдомонад (LB и Кинг В) и являются экономически предпочтительными для использования в промышленном изготовлении препаратов на основе штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3.

3.6.4. Изготовление экспериментальных образцов биопрепарата

Переработка КЖ с целью изготовления экспериментальных образцов препарата на основе штамма Vsk-26a3 и его метаболитов включала разделение ее на бесклеточный супернатант и клеточную массу.

Клеточную массу отделяли от КЖ методом центрифугирования. Сепарированную биомассу смешивали с защитной средой (раздел 2.10.) и подвергали лиофильному высушиванию. Получали образцы высушенных клеток в виде порошков с концентрацией клеток $4\div 6 \times 10^{11}$ КОЕ/г и остаточной влажностью 4-6 %. Такие образцы использовались в качестве экспериментальных образцов биопрепарата для последующих испытаний в растениеводстве.

При концентрировании супернатанта КЖ с использованием мембран с размерами пор 1,0 кДа, антимикробные компоненты проходили сквозь них, поэтому от этого метода пришлось отказаться. Поэтому, супернатант КЖ после центрифугирования для удаления клеток штамма подвергали микрофильтрации на полых волокнах с размером пор $d=0,22\mu\text{m}$ для полного отделения фильтрата от микробных клеток. На следующей стадии его концентрировали на выпарной вакуумной установке, учитывая наличие термоустойчивости антимикробного комплекса. Другой успешный продукт переработки был получен с помощью распылительного высушивания фильтрата КЖ. Температура теплоносителя составляла $130\div 135$ °С, время контакта биологической субстанции с теплоносителем до полного высушивания $3\div 10$ с. При этом режиме полученный оранжево-розовый легкий малогигроскопичный порошок сохранил активность при нанесении на чашки с тест-объектами.

Упаренный концентрат КЖ также можно рассматривать как экспериментальный образец (или компонент) биопрепарата для сельского хозяйства. В этой форме экспериментальный образец обладал антимикробной активностью, которая сохранялась при длительном хранении (более года).

Для оценки возможности использования метаболитов Vsk-26a3 в качестве компонентов при разработке препаратов для использования в медицине провели испытания антимикробной активности концентрата КЖ и его высушенной формы по отношению к штаммам микроорганизмов родов *Pseudomonas* и *Staphilococcus* (*S. aureus* 194R и *P. aeruginosa*), выделенным из клинического материала. В качестве контроля антимикробной активности использовали антибиотики, рекомендованные для подавления этих патогенов (рис. 3.37).

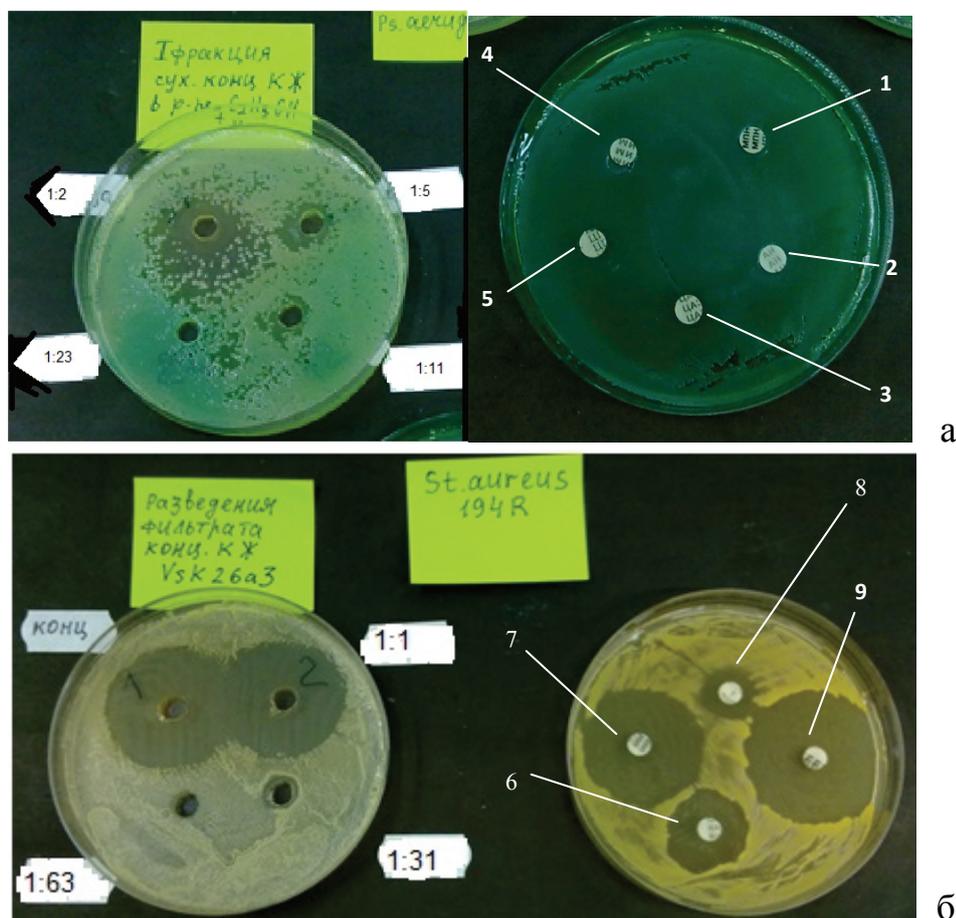


Рисунок 3.37- Антимикробная активность БКФ КЖ по отношению к клиническим изолятам *P. aeruginosa* (а) и *S. aureus* 194R (б). Слева: I фракция сухого концентрата КЖ в растворе с H_2O дист. в различных разведениях, внесённая в лунки; справа: диски с антибиотиками (а) 1-цефтазидим, 2-амикацин, 3-цефепим, 4-имепенем и 5-меропенем и (б) 6-ванкомицин, 7-цефазолин, 8-оксациллинол и 9-цефалексин.

Анализ полученных экспериментальных данных позволил составить принципиальную схему получения препаратов на основе Vsk-26a3 (рис. 3.38).

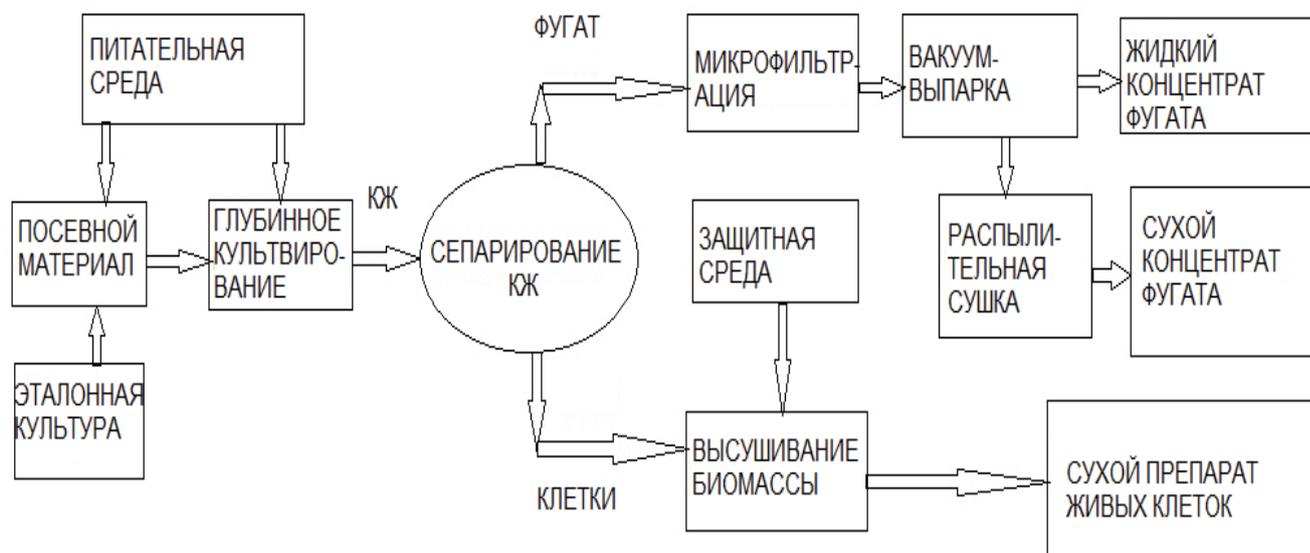


Рисунок 3.38 – Схема процесса получения экспериментальных образцов биопрепарата на основе биомассы штамма Vsk-26a3 и продуктов его метаболизма

Комплексную схему изготовления биопрепаратов на основе предлагаемого продуцента можно представить следующим образом: после стадий биосинтеза и разделения культуральной жидкости, - все полученные компоненты (биомасс, бесклеточный фугат) используются для получения конечных продуктов. Клеточная масса высушивается, а фугат после микрофльтрации перерабатывается вакуум-выпаркой в жидкий самоконсервирующий концентрат, либо в сухой препарат - распылительной сушкой. Технология была использована при разработке лабораторного регламента на производство комплексного биопрепарата на основе штамма Vsk-26a3. По технологии изготовлены экспериментальные образцы в виде сухих порошков с концентрацией $(4\div 6)\times 10^{11}$ клеток в грамме для испытаний.

3.6.5. Заключение по разделу 3.6.

В ходе работы подобрали составы питательных сред для синтеза биомассы штамма Vsk-26a3 и синтеза антимикробных метаболитов. Провели наработку препаратов живых клеток, жидкого и сухого концентратов фугата для

исследований и полевых испытаний. Показали сохранение антимикробной активности полученных экспериментальных образцов препаратов клеток и субстанций. Разработали технологическую схему процесса получения прототипов биопрепаратов.

3.7. Испытания экспериментальных образцов препарата в полевых условиях

На яровой мягкой пшенице

Испытания экспериментальных образцов препарата на основе лиофильно высушенных клеток штамма Vsk-26a3 проводили на яровой мягкой пшенице сорта *Агата* (см. раздел 2.11.).

Погодные условия в период всходов благоприятно отразились на полевой всхожести яровой пшеницы. В ходе испытаний установили, что предпосевная обработка семян пшеницы экспериментальным образцом Vsk-26a3 в дозе 0,5 и 1,0 кг/т увеличило полевую всхожесть семян.

В условиях вегетации 2013 года растения яровой пшеницы сформировали зерно с массой 1000 семян от 38,6 до 41,7 г. Наибольшим этот показатель был при обработке экспериментальным образцом в дозе 0,5 кг/т (41,7 г). Однако, достоверного увеличения массы 1000 зерен над химическим и биологическим эталонами не установили.

Предпосевная обработка семян пшеницы, как эталонами (химическим и биологическим препаратами), а также экспериментальными образцами Vsk-26a3 привело к увеличению урожайности (табл. 3.24). При этом обработка экспериментальным образцом Vsk-26a3 в дозе 0,5 кг/т показала наибольшую прибавку урожая.

Таблица 3.24 – Урожайность яровой пшеницы, т/га

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

НСР₀₅ = 0,27

Погодные условия в период вегетации не способствовали поражению растений яровой пшеницы бурой ржавчиной и мучнистой росой в вариантах опыта. Устойчивость к поражению бурой ржавчиной и мучнистой росой также является особенностью сорта яровой мягкой пшеницы *Агата*. Поэтому, защита пшеницы от инфекции не являлась основным фактором прибавки урожая.

По результатам испытания лучшим оказался вариант 5, где применяли экспериментальный образец Vsk-26a3 (0,5 кг/т), что позволило получить достоверную прибавку урожая яровой мягкой пшеницы относительно контроля на 0,69 т/га за счет увеличения полевой всхожести семян и формирования более крупного зерна. Этот результат может являться опосредованным влиянием стимулирующего действия штамма Vsk-26a3 и улучшения питания растений за счёт эффекта фосфатрастворения, поскольку инфекционный фон в ходе исследования находился на уровне обычных значений в регионе.

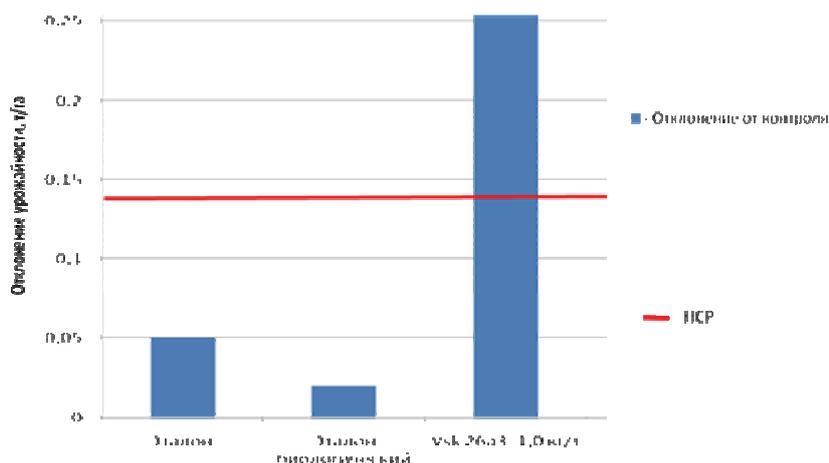
На сое.

Испытания экспериментальных образцов препарата на основе лиофильно высушенных клеток штамма Vsk-26a3 проводили 2013 г. на сое сорта *Касатка* (раздел 2.11.2.) Из-за недостатка влаги в период всходы-цветение высота растений была ниже среднеголетних значений. Тем не менее, в варианте обработки (1,0 кг/т) Vsk-26a3 отмечали достоверное превышение высоты

растений в сравнении с контролем, с эталоном (нитрагин) и биологическим эталоном (фитоспорин).

В структуре урожая показатели количества бобов в варианте обработки Vsk-26a3 – 1,0 кг/т имеют достоверное превышение над эталоном химическим и биологическим. По количеству семян с 1 растения наилучшим оказался тот же вариант.

По итогам эксперимента достоверная прибавка урожайности отмечена у варианта с применением препарата Vsk-26a3 в дозе 1,0 кг/т (рис. 3.39). Таким образом, обработка семян сои перед посевом экспериментальным образцом препарата Vsk-26a3 в дозе 1,0 кг/т в полевых условиях привела к повышению урожайности на 15,8%.



НСР₀₅ 0.13

Рисунок 3.39 – Отклонение урожайности сои в вариантах опыта от контроля

сравнению с контролем, на - 12,6% по сравнению с химическим эталоном и на 14,5% по сравнению с биологическим эталоном.

На озимой пшенице без искусственного инфицирования

Испытания экспериментальных образцов препарата на основе лиофильно высушенных клеток штамма Vsk-26a3 проводили на озимой мягкой пшенице сорта *Виола* (см. раздел 2.11.3.)

Достоверное превышение полевой всхожести относительно контроля и химического эталона установлено в вариантах Vsk-26a3 в дозе 1,0 кг/т и Vsk-26a3 в дозе 0,5 кг/т (рис. 3.40), что свидетельствует о ростстимулирующих свойствах штамма.

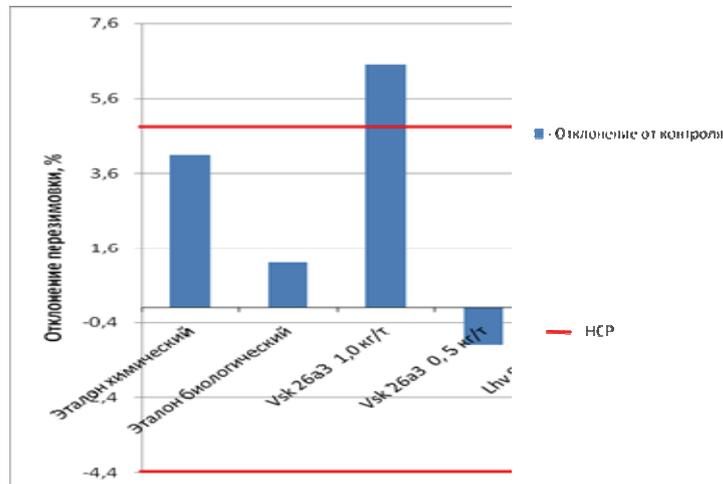


Рисунок 3.40 – Отклонение числа растений на 1 м² в вариантах опыта от контроля

В условиях засухи в период вегетации растений тем не менее сформировалось крупное зерно с массой 1000 семян от 46,7 до 51,0 г. Наибольшим этот показатель был при обработке семян экспериментальным образцом Vsk-26a3 в дозе 1,0 кг/т (51,0 г.)

Засушливые погодные условия в период вегетации не способствовали поражению растений озимой пшеницы бурой ржавчиной и мучнистой росой в вариантах опыта, отсутствовало также и поражение снежной плесенью. Поэтому оценить в полевых условиях биологическую эффективность экспериментальных образцов на основе штамма Vsk-26a3 достоверными данными не удалось. Тем не менее, перезимовку озимая пшеница перенесла лучше, чем при применении биологического эталона и означает, что штамм Vsk-26a3 активен в условиях пониженных температур зимнего периода. На рис. 3.41 представлена фотография модельных снопов озимой мягкой пшеницы сорта *Виола*.

Прибавка урожая составила относительно контроля - 0,78 т/га (23,6%), относительно эталона химического - 0,84 т/га (25,9%), относительно эталона биологического - 0,26 т/га (6,8%).



Рисунок 3.41 - Фото модельных снопов

Таким образом, по результатам лучшим оказался вариант, где применяли обработку на основе экспериментальных образцов штамма Vsk-26a3 в дозе 1,0 кг/т. В этом варианте урожайность сформировалась за счет увеличения полевой всхожести семян, лучшей перезимовки и формирования более крупного зерна, что позволило получить максимальное увеличение урожая озимой мягкой пшеницы.

На озимой мягкой пшенице при искусственном заражении возбудителям снежной плесени.

Проводили оценку в полевых условиях биологической эффективности экспериментального образца препарата на основе Vsk-26a3 против возбудителей снежной плесени на озимой пшенице с использованием искусственного инфекционного фона (раздел 2.9.4.), поскольку ожидать уверенного природного заражения возбудителем не представлялось возможным.

Наилучшим образом перезимовали растения пшеницы, семена которых перед посевом обрабатывали экспериментальным образцом на основе штамма Vsk-26a3 в дозе 0,25 кг/т (табл. 3.25).

Таблица 3.25 – Число всходов растений озимой мягкой пшеницы сорта *Виола*, после перезимовки

Вариант	Среднее значение, %	Отклонение от искусственно заражённого контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±
1- Контроль без обработок	90,2	+3,8	-2,9
2- Контроль, зараженный возбудителями снежной плесени	86,4	-	-6,7
3- Эталон химический	93,1	+6,7	-
4- Vsk-26a3 0,5 кг/т	96,1	+9,7	+3,0
5- Vsk-26a3 0,25 кг/т	90,8	+4,4	-2,3

НСР₀₅ 8,48

Достоверное превышение высоты растений над контролем, искусственно заражённым контролем и химическим эталоном установлено в варианте обработки Vsk-26a3 в дозе 0,25кг/т (табл. 3.26).

Таблица 3.26- Высота растений озимой мягкой пшеницы сорт *Виола*

Вариант	Среднее значение см	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от искусственно заражённого контроля, ±
1	64,7	-	-1,6	+0,4
2	64,3	-0,4	-2,0	-
3	66,3	+1,6	-	+2,0
4	64,0	-0,7	-2,3	-0,3
5	70,3	+5,6	+4,0	+6,0

НСР₀₅=3,35

Достоверное превышение длины колоса над искусственно заражённым контролем установили в варианте применения Vsk-26a3 в дозе 0,5кг/т (табл. 3.27).

Таблица 3.27 - Длина колоса озимой мягкой пшеницы сорт *Виола*

Вариант	Среднее значение см	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от искусственно заражённого контроля, ±
1	8,6	-	+0,10	+0,6
2	8,0	-0,60	-0,50	-
3	8,5	-0,10	-	+0,5
4	9,2	+0,60	+0,70	+1,2
5	9,0	+0,40	+0,50	+1,0

НСР₀₅=1,18

Самое наибольшее достоверное превышение числа зерен с колоса над искусственно заражённым контролем установили в варианте обработки Vsk-26a3 в дозе 0,25кг/т (табл. 3.28).

Таблица 3.28 - Количество зерен с колоса озимой мягкой пшеницы сорт *Виола*

Вариант	Среднее значение шт	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от искусственно заражённого контроля, ±
1	26,8	-	-1,60	+4,8
2	22,0	-4,80	-6,40	-
3	28,4	+1,60	-	+6,4
4	23,9	-2,90	-4,50	+1,9
5	28,7	+1,90	+0,30	+6,7

НСР₀₅=2,41

Достоверное превышение массы 1000 зерен над искусственно заражённым контролем установили в варианте использования Vsk-26a3 в дозе 0, 5кг/т (табл. 3.29).

Таблица 3.29 - Масса 1000 зерен озимой мягкой пшеницы сорт *Виола*

Вариант	Среднее значение г	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от искусственно заражённого контроля, ±
1	50,2	-	+0,80	+1,9
2	48,3	-1,90	-1,10	-
3	49,4	-0,80	-	+1,1
4	52,4	+2,20	+3,00	+4,1
5	47,9	-2,30	-1,50	-0,4

НСР₀₅ = 2,38

Достоверное превышение коэффициента продуктивного кушения (количество стеблей у растения) над контролем и химическим эталоном установлено в варианте применения Vsk-26a3 в дозе 0,25 кг/т (табл. 3.30).

Таблица 3.30 - Коэффициент продуктивного кушения озимой мягкой пшеницы сорта *Виола*

Вариант	Среднее значение шт	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от искусственно заражённого контроля, ±
1	1,10	-	-0,12	-0,28
2	1,38	+0,28	+0,16	-
3	1,22	+0,12	-	-0,16
4	1,15	+0,05	-0,07	-0,23
5	1,48	+0,38	+0,26	+0,10

$НСР_{05} = 0,18$

Максимальное достоверное превышение урожайности над контролем, искусственно заражённым контролем и химическим эталоном получено в варианте применения Vsk-26a3 в дозе 0,25 кг/т (табл. 3.31).

Таблица 3.31 - Урожайность озимой мягкой пшеницы сорт *Виола*

Вариант	Среднее значение т/га	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от искусственно заражённого контроля, ±
1 Контроль без обработок	1,85	-	-0,85	+1,1
2 Контроль, зараженный возбудителями снежной плесени	1,44	-0,41	-1,26	-
3 Эталон химический	2,70	+0,85	-	+1,26
4 Vsk-26a3 0,5 кг/т	2,65	+0,80	-0,05	+1,21
5 Vsk-26a3 0,25кг/т	3,18	+1,33	+0,48	+1,74

$НСР_{05} = 0,40$

По результатам испытания лучшим оказался вариант , где применяли Vsk-26a3 в дозе 0,25 кг/т, что позволило получить достоверную прибавку урожая озимой мягкой пшеницы сорта Виола относительно контроля на 1,33 т/га (+72 %), относительно искусственно заражённого контроля на 1,74 т/кг (+120 %) и

относительно эталона химического на 0,48 т/кг (+18 %) через увеличение высоты растений и числа зёрен с колоса за счёт защитных и стимулирующих свойств препарата.

3.7.1. Заключение по разделу 3.7.

Полученный экспериментальный образец биопрепарата на основе Vsk-26a3 показал в 4 делячных испытаниях достоверную прибавку урожая на яровой мягкой пшенице сорта Агата, на сое сорта Касатка, на озимой мягкой пшенице сорта Виола в условиях естественного и искусственного инфекционного фона (до +120 % прибавки урожая).

3.8. Рекомендации по использованию штамма Vsk-26a3 с целью повышения урожайности зерновых и бобовых культур

По итогам испытаний экспериментального образца препарата на основе лиофильно высушенных клеток штамма Vsk-26a3 на озимой мягкой пшенице, выращенной в условиях повышенного инфекционного фона, могут быть рекомендованы следующие дозы обработки препаратом

Обработка перед посевом в дозе	Обработка в фазе кущения в дозе
0,25÷ 1,0 кг/т	1,5÷3,0кг/га, 200-300 л/га

Для яровой пшеницы и сои можно рекомендовать однократную обработку посевного материала в дозе 0,5÷1,0 кг/т.

На основании результатов полевых испытаний штамм Vsk-26a3 может быть рекомендован для создания на его базе биопрепаратов с рост стимулирующими, антимикробными, фосфатсолубилизирующими свойствами для повышения урожайности бобовых культур, яровых и озимых зерновых.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований изучили антагонистические свойства штаммов из коллекции ФР микроорганизмов, созданной на базе ГНЦ ПМБ в отделе биологических технологий. Проверили 116 бактериальных ФРМ на антагонистическую активность в отношении 64 видов бактериальных и грибных патогенов растений, человека и животных, в том числе против антибиотикоустойчивых штаммов. Обнаружили 11 изолятов микроорганизмов в разной степени проявляющих активность по отношению ко всем исследовавшимся патогенам, из них 3 изолята обладали лучшими результатами. Отобрали наиболее активный психрофильный штамм-антагонист Vsk-26a3, потенциальный продуцент для использования в антимикробных препаратах. Штамм идентифицирован как *Pseudomonas chlororaphis ssp. chlororaphis*. Штамм, проявил высокую эффективность против фитопатогенов при пониженной температуре 2-8 °С, что актуально для защиты озимых посевов от грибных болезней в сельском хозяйстве, в том числе от снежной плесени. Этот штамм отобрали для дальнейших исследований в качестве перспективного потенциального продуцента антимикробных препаратов для применения в сельском хозяйстве. Изучили его культурально-морфологические и биохимические свойства. Показали безопасность штамма по отношению к растениям и теплокровным животным. Кроме этого, показали наличие у штамма Vsk-26a3 рост стимулирующих свойств для растений.

Изучили механизм растворения минеральных фосфатов под действием штамма Vsk-26a3. Штамм практически полностью окисляет глюкозу до глюконовой и кетоглюконовой кислот, которые стехиометрически переводят фосфор в растворимое состояние из модельного нерастворимого минерального сырья (ТКФ). Такой механизм является самым эффективным из известных в мире в настоящее время для растворения фосфатов микроорганизмами. Поэтому штамм Vsk-26a3 проявляет и самую высокую ФР способность из известных в настоящее время. Такую же ФР активность имеет штамм *Burkholderia cepacia* E37

– наиболее активный фосфатмобилизующий штамм из выделенных в мире [156]. При этом штамм *B. seracia* E37 антагонистической активностью не обладает.

Выявили способность штамма Vsk-26a3 к высвобождению растворимого фосфора из пяти типов исследованных руд (апатитовые, океанические шельфовые, ракушечные, желваковые, остаточные метасоматические). Поэтому прямое применение штамма Vsk-26a3 совместно с доступными рудами (рудными концентратами) может быть перспективно для улучшения фосфорного питания растений. Повышение доступности фосфора для растений является одним из возможных механизмов ростстимулирующей активности этого штамма.

Поскольку препарат на основе штамм Vsk-26a3 может применяться как на стадии обработки семян, так и при цветении колосьев, исследовали совместимость штамма Vsk-26a3 с протравителями семян, фунгицидами, гербицидами и инсектицидами. Штамм Vsk-26a3 проявил хорошую совместимость с 12 широко используемыми химическими пестицидами, что даёт возможность включения этого штамма в интегрированную систему защиты растений от вредителей и болезней.

Изучили антимикробную активность штамма Vsk-26a3 на 63 патогенных штаммах родов *Bacillus*, *Xantomonas*, *Erwinia*, *Micrococcus*, *Staphilococcus*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Salmonella* и др., на 28 грибных фитопатогенах и 2 грибных патогенах теплокровных *Candida albicans* и *Trichophyton terrestre*. Штамм проявил различную степень активности против всех 30 исследованных грибных патогенов и против 53 бактериальных патогенов. Штамм Vsk-26a3 проявил более высокую антагонистическую активность при выращивании на бедных по составу питательных средах. Очевидно, продукция антимикробных метаболитов обуславливает конкурентные преимущества штамма Vsk-26a3 в борьбе за питательный субстрат.

Провели сравнение активности штамма Vsk-26a3 в отношении фитопатогенов с известными штаммами-антагонистами, запатентованными как продуценты СЗР от болезней: *B. subtilis* ИПМ-215, *B. subtilis* 26Д, *P. fluorescens* P 469. Штамм Vsk-26a3 показал лучшие или соизмеримые результаты против

грибных фитопатогенов при 28 °С, однако при 8 °С против возбудителя снежной плесени - гриба *M. nivale* штамм является несоизмеримо более эффективным. Против бактериальных фитопатогенов штамм Vsk-26a3 также проявил более высокую эффективность. Эти данные говорят о высоком потенциале его использования в производстве биопрепаратов для различных отраслей.

Получили, что упаренный в 5÷6 раз БФ КЖ штамма обладает высокой антибактериальной и антифунгальной активностью, равной активности живых клеток в отношении патогенов растений, человека и животных и не теряет активности в жидком виде более года. Высокие концентрации вторичных метаболитов в БКФ КЖ штамма Vsk-26a3 угнетают рост собственных клеток. БФ КЖ не теряет своих свойств при температуре 100°С в течение 30 мин и более чем за 2 года хранения при (5±3) °С.

С помощью ТСХ показали, что штамм Vsk-26a3 продуцирует не менее 7 антимикробных метаболитов. Основной антимикробный метаболит идентифицировали как 2,4-ДАФГ (диацетилфлороглюцин) – антибиотик широкого спектра действия, активный также против грибов и нематод, продуцируемый многими видами псевдомонад. Возможно, что в состав антимикробного комплекса штамма Vsk-26a3 входит и другое производное флороглюцина - менее активный, чем ДАФГ, триацетилфлороглюцин. Показали, что штамм Vsk-26a3 продуцирует антимикробные пигменты - производные 2-оксифеназина, среди которых могут быть 2-ОФК и ее амид. В числе антимикробных метаболитов штамма Vsk- 26a3 могут быть также и полипептиды.

Таким образом, установили, что штамм Vsk-26a3 одновременно синтезирует несколько антимикробных веществ различной природы и спектра действия, что делает его перспективным для производства на его основе антимикробных препаратов. Возможно, именно синергическое взаимодействие компонентов позволяет проявлять этому штамму высокую антагонистическую активность против широкого круга патогенов человека, животных и растений. И

комплексный препарат на основе неразделенных антимикробных метаболитов может быть исключительно перспективным и экономичным в производстве.

Для получения более дешёвых биопрепаратов для сельского хозяйства и активных продуктов вторичного синтеза провели работа по подбору компонентов питательных сред и условий культивирования на колбах и на ферментёре. Оказалось, что при глубинном культивировании штамма *P. chlororaphis* Vsk-26a3 на питательных средах, различавшихся по составу и количеству углеродосодержащих и азотных соединений, уровень накопления антимикробных компонентов существенно различался. Лучшие результаты по антимикробной активности получили при использовании питательных сред на основе минерального источника азота и глицерина. Выявили, что максимальная удельная скорость роста культуры и синтеза активных метаболитов расположена в области температур $25\div 35$ °С. Однако, при культивировании при пониженных температурах $15\div 20$ °С с увеличением времени процесса ферментации максимальный количественный синтез антимикробных компонентов соответствовал уровню лучших вариантов культивирования при 25-30 °С. Определили оптимальные величины рН процесса культивирования, которые составили $5,5\div 7,0$.

Для решения задачи оптимизации ферментационных сред и условий культивирования микроорганизмов в реакторах использовали программное обеспечение на основе интегрированной математической модели развития, позволяющее без проведения многочисленных экспериментов существенно сократить объём исследовательских работ.

По результатам исследований составили недорогие стандартизованные минеральные среды и подобрали условия культивирования, обеспечивающие высокий выход биомассы и активных продуктов вторичного синтеза. Провели сравнительную оценка сред с классическими питательными средами для выращивания псевдомонад: средой Кинга В и средой LB. В сравнении с более дорогостоящей средой Кинга В, подобранные минеральные среды оказались более эффективными по накоплению биомассы и синтезу активных метаболитов

и биомассы. В результате этих работ разработали технологическую схемусоставили лабораторный регламент на производство комплексного биопрепарата против снежной плесени на основе штамма Vsk-26a3.

Показали, что экспериментальными образцами биопрепаратов для применения в растениеводстве могут служить как лиофильно высушенная биомасса клеток штамма Vsk-26a3, так и упаренный фильтрат КЖ, также обладающий высокими бактерицидными, фунгицидными и ростстимулирующими свойствами, не теряющий активности при длительном хранении.

Экспериментальный образец на основе лиофильно высушенной биомассы клеток штамма Vsk-26a3 применяли в полевых испытаниях: на озимой пшенице без искусственного инфекционного фона и при его создании, на яровой пшенице и на сое. По результатам полевых испытаний на яровой мягкой пшенице лучшим оказался вариант, где применялся Vsk-26a3 в дозе 0,5 кг/т, что позволило получить достоверную прибавку урожая относительно контроля на 0,69 т/га (+23,4 %) за счет увеличения полевой всхожести семян и формирования более крупного зерна.

По итогам полевого эксперимента на сое достоверную прибавку урожайности относительно всех вариантов опыта отметили при использовании препарата Vsk-26a3 в дозе 1,0 кг/т. Достоверное превышение урожайности над контролем составило 0,28 т/га (+15,8%), над химическим эталоном 0,23 т/га (+12,6 %), над биологическим эталоном 0,26 т/га (+14,5 %).

По итогам полевых испытаний на озимой мягкой пшенице без искусственного заражения лучшим оказался вариант, где применялся Vsk-26a3 в дозе 1,0 кг/т, что позволило получить прибавку урожая относительно контроля 0,78 т/га (+23,6%), относительно эталона химического 0,84 т/га (+25,9%), относительно эталона биологического 0,26 т/га (+6,8%) за счет увеличения полевой всхожести семян, лучшей перезимовки и формирования более крупного зерна.

Провели оценочные испытания в полевых условиях на озимой мягкой пшенице сорта *Виола* при искусственном инфицировании почвы возбудителями снежной плесени *M. nivale*. По итогам испытаний при обработке препаратом на основе штамма Vsk-26a3 в дозе 0,25 кг/т прибавка урожая относительно эталона химического - 0,48 т/кг (+18 %), относительно незараженного контроля составила 1,33 т/га (+71,9 %), относительно искусственно заражённого контроля - 1,74 т/кг (+121 %).

Таким образом, по результатам лабораторных и полевых испытаний штамм *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 может быть рекомендован как продуцент биопрепаратов для борьбы с болезнями растений, прежде всего со снежной плесенью, а также для улучшения фосфорного питания растений. Применение биопрепаратов на основе ризосферного микроорганизма, способного активно растворять фосфаты и противостоять фитопатогенам, позволит не только повысить количество и качество урожая, но и оздоровить плодородный слой почв сельхозугодий.

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 *Pseudomonas 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 *Pseudomonas 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 *Pseudomonas 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 *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 с целью получения биомассы и синтеза антимикробных метаболитов. Разработан лабораторный регламент на производство комплексного биопрепарата против снежной плесени на основе *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 ЛР 00001927-15-82-2015.
11. Полученный экспериментальный образец биопрепарата на основе *Pseudomonas 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 *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 может быть рекомендован, как продуцент антимикробных веществ, а также для создания на его основе биопрепаратов с ростстимулирующими, антимикробными, фосфатрастворяющими свойствами.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева, Е.И. Снежная плесень озимых зерновых (методы изучения и меры борьбы) / Е.И. Андреева, О.Ю. Молчанов // Химические средства защиты растений. - М.: НИИТЭХИМ, 1987. - 45 с.
2. Анохина Т.О. Ризосферные плазмидосодержащие бактерии рода *Pseudomonas*, стимулирующие рост растений и деградирующие полициклические ароматические углеводороды: Автореферат, Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН - Пущино, 2011. - 146 с.
3. Анфиногенова, Г.В. Разработка метода искусственного заражения и оценки озимой ржи на устойчивость к снежной плесени // Вестник с.-х. науки, 1981.- № 2.- С.73-77.
4. Артамонова, М.Н. Антагонистическая активность ассоциативных ризобактерий / М.Н. Артамонова, А.С. Алексеева, Н.И. Потатуркина-Нестерова // Международный журнал экспериментального образования. - 2013. - № 10. (часть 2).
5. Асабина, Е.А. Сравнительный анализ математических моделей биосинтеза ингибиторов роста фитопатогенов псевдомонадами. / Е.А. Асабина, С.П. Четвериков, О.Н. Логинов // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2008. - Вып. № 86. - С. 122-124.
6. Асабина, Е.А. Отработанные пивные дрожжи – компонент сред для промышленного производства биопрепаратов / Асабина, Е.А. Четвериков С.П., Логинов О.Н. // Аграрная Россия. – 2009. - Специальный выпуск. – С. 115.
7. Асабина, Е.А. Оптимизация биосинтеза ингибиторов роста фитопатогенов бактериями рода *Pseudomonas* / Е.А. Асабина, С.П. Четвериков, О.Н. Логинов // Биотехнология. – 2009. № 3. – С. 67-71.
8. Беззубенкова, О.Е. Микрофлора ризосферы и ризопланы и её влияние на растительный организм / О.Е. Беззубенкова, М.Н. Юхлимова, Н.И. Потатуркина, Н.И. Нестерова // Естественные и технические науки – 2012. – № 4. – С. 99-102.
9. Боронин, А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas* // Соросовский образовательный журнал. 1998г. - №10. - С.25-31.
10. Бабенко, Ю.С. Биологическая активность и физиолого-биохимические свойства фосфатрастворяющих бактерий / Г.И.Тырыгина, Е.Ф. Григорьев, Л.М. Долгих, Т.И. Борисова // Микробиология. - 1984. - Т. 53. - №4. - С. 533-539.
11. Берестецкий, О.А. Фитотоксичность почвенных микроорганизмов и их экологическая роль // Фитотоксические свойства микроорганизмов - Л., 1978. С. 7-30.
12. Билай, В.И. Микроорганизмы – возбудители болезней растений / В.И. Билай, Р.И. Гвоздяк, И.Г. Скрипаль //Под ред. Билай В.И. Киев: Наук. думка, 1988. –С. 522.
13. Бондаренко Н.В. Биологическая защита растений. //- М.: Агропромиздат, 1986. - 278 с.
14. Бурова Ю.А. Изучение свойств бактерии *Pseudomonas aureofaciens* и получение на ее основе биопрепарата для защиты растений : Автореферат дис. канд. биол. наук. – М.– 2006.

15. Бурова, Ю.А. Получение бактериальной суспензии *Pseudomonas aureofaciens* 2006 на мелассе и изучение некоторых ее свойств / Ю.А. Бурова, С.А. Ибрагимова, В.В. Ревин // Вестник Оренбургского государственного университета, № 10 (146) , - 2012. - С. 61–65.

16. Бурова, Ю.А. Действие культуральной жидкости бактерии *Pseudomonas aureofaciens* на развитие семян пшеницы и фитопатогенных грибов / Ю.А. Бурова, В.В. Ибрагимова, В.В. Ревин // Известия ТулГУ. Естественные науки. Вып. 3. – Тула: ТулГУ, 2012. – С. 198–206.

17. Бурова, Ю.А. Исследование содержания биологически активных веществ в культуральной жидкости бактерии *Pseudomonas aureofaciens* при хранении / Ю.А. Бурова, С.А. Ибрагимова, В.В. Ревин // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – М., 2012. – Т.8, №3. – С. 26–30.

18. Бухарин, О.В. Ассоциативный симбиоз. / О.В. Бухарин, Е.С. Лобакова, Н.В. Немцева, С.В. Черкасов // Екатеринбург: УрО РАН, - 2006. – 264 с.

19. Васецкая, М.В. Биосредства для протравливания семян зерновых культур / М.В. Васецкая, В.П. Кратенко, В.А. Лавринова // Защита и карантин растений. — 2002.-№7.-С. 20-21.

20. Великанов Л.Л. Роль грибов в формировании мико и микробиоты почв естественных и нарушенных биоценозов и агроценозов: дис. канд. биол. Наук // МГУ им. Ломоносова – М., 1997. – 547 с.

21. Вялых, А.К. Влияние биопрепаратов на снижение заболевания пшеницы фузариозом колоса / А.К. Вялых, А.Г. Касьяненко, Ю.И. Савченко // Фузариоз колоса зерновых злаковых культур: сб. научн. тр. РАСХН. – Краснодар, 1992- С. 35.

22. Гагкаева, Т.Ю. Фузариоз зерновых культур / Т.Ю. Гагкаева О.П. Гаврилова, М.М. Левитин, К.В. Новожилов // - СПб.: РАСХН, 2011. - 120 с.

23. Гораль, В.М. Инсектофунгицидный препарат гаупсин на основе штаммов *Pseudomonas aureofaciens* / В.М. Гораль, Н.В. Лаппа, С.В. Гораль, А.Д. Гарагуля, Е.А. Киприанова, Т.Г., Омельянец, В.В. Смирнов, // Прикл. биох. и микробиол. - 1999.- 35(5) С.- 596-598.

24. Горьковенко, В.С. Вредоносность гриба *Microdochium nivale* в агроценозе озимой пшеницы / В.С. Горьковенко, Л.А. Оберюхтина, Е.А. Куркин // Защита и карантин растений. -2009- УДК 631.466.1/.2. - с.34-36.

25. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории РФ. Утв. Минсельхозом РФ по состоянию на 01.03.14-М.: Минсельхоз, -2014.

26. Гринько, Н.Н. Биорегуляция популяций фузарий (на примере овощных культур защищенного грунта) Н.Н. Гринько, Т.В. Стрижак // Производство экологически безопасной продукции растениеводства: региональные рекомендации. Под ред. М.С. Соколова и Е.П. Угрюмова. – Пушкино – 1998. – Вып. 4. – С. 87-90.

27. Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв // М.- 2002- ИКЦ Академкнига. 282 с.

28. Долгова, Е.М. Эффективность применения биопрепаратов псевдобактерин-2 и псевдобактерин-3 против болезней пшеницы / Е.М. Долгова, О.П.

Манько, И.Я. Зубко, В.В. Кочетков, С.Б. Петрикевич, Н.П. Ашина, А.Г. Чигалейчик, А.М. Боронин. // Проблемы Экологической Безопасности Агропромышленного Комплекса- Сергиев Посад,- 1996.- № 2.- С. 123-126.

29. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) // Третье издание, переработанное и дополненное. – М.: Колос, 1973. – 336 с.

30. Дунайцев И.А. Выделение фосфатсольюбилизирующих микроорганизмов и изучение возможности их использования в промышленности и сельском хозяйстве: диссертация на соискание уч. ст.канд. биол. наук / Оболенск, 2010. - 186 с.

31. 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.

32. Дунайцев, И.А. Сольюбилизация 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. – Внф. Бюллетень 38. – Санкт-Петербург. – 2007. – С. 120-123.

33. 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.

34. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках // Учебник (изд. 6-е),- 2004– С. 155.

35. Ермолаева, Н.И. Применение биометода в открытом и защищенном грунте: Использование ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* для предпосевной обработки огурцов, капусты и картофеля / Н.И. Ермолаева, Н.И. Иванова, Н.П. Скворцова // Защита растений. - 1992. № 8 - С. 24-25.

36. Жалеева, Л.Д. Эффективность биологических средств борьбы с фузариозной инфекцией озимой пшеницы / Л.Д. Жалеева, М.И. Зазимко, А.В. Болбат, Н.В. Хандога // Фузариоз колоса зерновых злаковых культур: сб. научн. тр. РАСХН. – Краснодар, 1992. - С. 34.

37. Жиглецова, С.К. Возможности применения микроорганизмов для решения задач экологической и продовольственной безопасности / С.К. Жиглецова, И.А. Дунайцев, С.Г. Бесаева. // Агрохимия. - 2010. - №6. - С. 83-96.

38. Заикина И.А. Экологическая роль бактериального сообщества эпифитов филлосферы в жизнедеятельности растений: Автореф. дис. на соискание уч. ст. к.б.н. / Ставрополь, 2008, 15 с.

39. Заостровных, В.И. Вредные организмы сои и система фитосанитарной оптимизации её посевов / В.И. Заостровных, Л.К. Дубовицкая // Новосибирск, 2003. – 528 с.

40. Захарченко, Н.С. Роль ассоциаций микроорганизмов с растениями в решении экологических проблем / Н.С. Захарченко, С.В. Пиголева, А.А. Лебедева, О.В. Фурс, М.А. Чепурнова, Л.С. Карнова, А.А. Лебедева, И.Ф. Пунтус,

В.В. Кочетков // Сб. "Экотоксикология-2009. Современные Биоаналитические Системы, Методы и Технологии"- Пушкино-Тула- 2009.- С. 92-93.

41. Киприанова, Е.А. Химическая и биологическая характеристика антибиотических веществ, образуемых *Pseudomonas aurantiaca* / Е.А. Киприанова, А.С. Рабинович, Л.Ю. Каминская // Физиологически активные вещества.- 1971.- № 3.- С. 283-290.

42. Кипрушкина Е.И. Научное обоснование применения биологических средств защиты для обработки и длительного холодильного хранения картофеля: Автореф. дис. на соискание уч. ст. к.б.н. – С.-Пб., 1995,- С.16.

43. Клыков, С.П. Зависимость возрастной структуры популяции клеток, утилизации субстратов и синтеза метаболитов от энергетических затрат / С.П. Клыков, В.В. Дербышев //Биотехнология. – 2009. - № 5. – С. 80–89.

44. Кононенко, Г.П. Контаминация фузариотоксинами зерна кукурузы и риса на основных территориях возделывания культур в Российской Федерации / Г.П. Кононенко, А.А. Буркин // Сельскохоз. биология. – 2008. - №5. - С. 88-91.

45. Коломбет, Л.В. Научное обоснование и практическая реализация технологии создания грибных препаратов для защиты растений от болезней: диссертация на соискание уч. ст. докт. биол. наук / Москва, 2006. - 353 с.

46. Котик, А.М. Частота обнаружения Т-2 токсина, НТ-2 токсина, дезоксиниваленола, зеараленона и фумонизинов в различных кормовых субстратах / А.М. Котик, В.О. Труфанова, О.В. Труфанов.// Птахівництво: Міжвід. темат. наук. зб. ІІІ УААН. – 2006. - №58. - С. 556–562.

47. Криг, Н. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. / Н. Криг, П. Снит, С. Уильямс, Э. Бок, Д. Хоулт, Р. Беркли, Д. Бун, Дж. Стейли, П. Стин: пер. с англ. – М. : МАКС Пресс, 2007.

48. Курилова, Д.А. Фузариоз сои и перспективные штаммы (*Chaetomium* и *Pseudomonas*) для микробиологической защиты культуры: Автореф. дис. на соискание уч. ст. к.б.н. – 2007.

49. Кунакова, А.М. Взаимодействие ассоциативных бактерий с растениями при различных агроэкологических условиях: Автореферат дисс. канд. биол. наук. С-Пб, 1998.

50. Кузьмина, Л.Ю. Эффективность бактериальных препаратов при защите растений яровой пшеницы от твердой головни / Л.Ю. Кузьмина, О.Н. Логинов, Т.Ф. Бойко, Р.Ф. Исаев, Е.В. Свешникова, А.И. Мелентьев // Сельскохозяйственная биология.-2003,- № 5.-С, 69-73.

51. Левин, Б.В. Экологическая классификация фосфатного сырья / Б.В. Левин, А.А. Ангелов // Хим. Пром. сегодня. - 2003. - С. 41-49.

52. Леонов, А.Г. Токсигенность изолятов *Fusarium graminearum* Shhw. из зерна фузариозной пшеницы в Краснодарском крае / А.Г. Леонов, Л.С. Малиновская, Н.А. Соболева, Т.П. Кононенко // Докл. ВАСХНИЛ. – 1990. - №11. - С.40–45.

53. Логинов, О.Н. Триглицеридпептиды – новая группа антигрибных метаболитов псевдомонад (*Pseudomonas*) / О.Н. Логинов, С.П. Четвериков, В.Н. Гусаков // ДАН. 2003. Т. 393. № 5. С. 715-717.

54. Логинов, О.Н. Роль бактерий-антагонистов фитопатогенов в защите сельскохозяйственных растений от болезней / О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев, Т.Ф. Бойко, Н.Ф. Галимзянова, Е.В. Свешникова // Уфа: Изд-во «Гилем», 2001, -66 с.
55. Логинов, О.Н. Биопрепараты против твердой головни пшеницы / О.Н. Логинов, Е.В. Свешникова, Р.Ф. Исаев, Н.Н. Силищев, Н.Ф. Галимзянова, Т.Ф. Бойко // Защита и карантин растений-2002,- № 9- С. 39
56. Логинов, О.Н. Биосинтез низкомолекулярных метаболитов бактериями *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 / О.Н. Логинов, С.П. Четвериков // Биотехнология. - 2003. - № 5. - С. 22-25.
57. Маслиенко, Л.В. Разработка микробиологического метода снижения вредоносности фузариозов / Л.В. Маслиенко, Д.А. Курилова // Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур вып. 2, 2012, - С.151–152.
58. Межидов, М. М. Справочник по микробиологическим питательным средам // М.: Медицина, 2003. С -306.
59. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур // М.: Колос, 1989. – 253 с.
60. Мирчинк, Т.Г. Почвенная микология // М.: Изд-во МГУ, 1988. – 220с.
61. Мишке, И.В. Микробные фитогормоны в растениеводстве // Рига, 1988, С. 151.
62. Монастырский, О.А. Влияние фунгицидов на образование токсинов штаммами видов *Fusarium* при заражении зерна пшеницы // Докл. РАСХН. - 1995.- № 2. - С. 21-22.
63. Монастырский, О.А. Влияние биопрепаратов на развитие и токсинообразование полевых штаммов *Fusarium graminearum* / О.А. Монастырский, В.А. Ярошенко. // Докл. РАСХН. - 2002. - № 3. - С. 22-23.
64. Монастырский, О.А. О целесообразности промышленного производства биопрепаратов для защиты хранящегося зерна / О.А. Монастырский, О.Г. Дузик, С.А. Ермоленко, М.П. Селезнева // Агро XXI. – 2007. - №10 –12. - С. 10–12.
65. Муромцев, Г.С. Роль почвенных микроорганизмов в почвенном питании растений / Г.С. Муромцев, Г.Н. Маршунова, В.Ф. Павлова, Н.В. Зольникова // Успехи микробиол. 1985. Т. 20. С. 174-198.
66. Новикова И.И. Полифункциональные биопрепараты для защиты растений от болезней // Защита и карантин растений. – 2005. - №2. - С. 22–24.
67. Новикова, И.И. Испытание новых биопрепаратов в борьбе с фузариозом колоса / И.И. Новикова, В.Г. Иващенко, Г.В. Калько, И.В. Бойкова, Л.А. Назаровская, А.И. Литвиненко // Микол. и фитопат. – 1994. – Т. 28, вып. 1. – С. 70-75.
68. Новикова, И.И. Биологическая эффективность новых микробиологических препаратов Алиринов Б и С для защиты растений от болезней в различных природно-климатических зонах / И.И. Новикова, А.И. Литвиненко, И.В. Бойкова // Микол. и фитопат. – 2003. - Т. 1, №37. - С. 92-98.

69. Новожилов, К.В. Направление исследований для решения проблемы фузариоза колоса зерновых культур / К.В. Новожилов, М.М. Левитин // Вест. с.-х. науки. - 1990, № 10. - С. 64–67.

70. Определитель бактерий Берджи: в 2 т./ пер. с англ. Г.А. Заварзина. // М.: Мир, 1997. – 800 с.

71. Павлюшин, В.А. Новые комплексные биопрепараты для защиты овощных культур от грибных и бактериальных болезней / В.А. Павлюшин, С.Л. Тютюрев, Э.В. Попова, И.И. Новикова, Г.А. Быкова, Н.С. Домнина // Биотехнология. – 2010. – № 4. – С. 69-80.

72. Патент 2053205 РФ, МКИ С12N1/04, 1,00. Биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов.

73. Патент 2111196 РФ, МКИ А01С, А01Р, А61, С05В, С12. Биопрепарат Агат-25К для повышения урожая растений.

74. Пат. 2203945 Р Ф, МКИ 7 С 12 N 1/20, А 01 N 63/00// (С 12 N 1/20, С 12 R Штамм бактерий *Pseudomonas aureofaciens* для получения препарата против заболеваний пшеницы, вызываемых грибными фитопатогенами.

75. Пат. 2213774 Р Ф, МКИ 7 С 12 N 1/20// (С 12 N 1/20, С 12 R. 1:40). Штамм бактерий *Pseudomonas putida* для получения препарата против заболеваний пшеницы, вызываемых грибными фитопатогенами.

76. Патент № 2228252 РФ, МКИ С12N1/04, 1,00. Способ получения биомассы и целевых продуктов синтеза с заданными технологическими параметрами.

77. Патент 2235771 РФ, МКИ А01С, А01Р, А61, С05В, С12. Штамм *Pseudomonas fluorescens* Р469 для получения препарата против болезней растений, вызываемых фитопатогенными грибами и бактериями.

78. Патент 2260951 РФ, МКИ А01С, А01Р, А61, С05В, С12. Штамм бактерий *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 6 – продуцент цитокининов.

79. Патент № 2303061 РФ, МКИ С12N1/04, 1,00. Питательная среда для культивирования бактерий рода *Pseudomonas*.

80. Патент №2380886 РФ, МКИ 7 С 12 N 1/20// (С 12 N 1/20, С 12 R. 1:40). Способ защиты посадочного материала растений против заболеваний, вызываемых фитопатогенными микроорганизмами.

81. Патент № 2385935 РФ, МКИ А01С, А01Р, А61, С05В, С12, Генный кластер, участвующий в биосинтезе сафракцина, и его применение в генной инженерии

82. Патент №2396338 РФ, МКИ С12N1/04, 1,00. Штамм бактерий *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2500Д для биodeградации полициклических ароматических углеводов в условиях загрязнения почв арсенитом натрия

83. Патент № 2451068 РФ, МКИ А01С, А01Р, А61, С05В, С12. Фосфатрастворяющий штамм *Acinetobacter species* 305 с фунгицидными свойствами.

84. Патент 2451069 РФ, МКИ А01С, А01Р, А61, С05В, С12. Фосфатрастворяющий штамм *Pseudomonas species* 181a с фунгицидными свойствами.

85. Пасечник, Л. Бактериальные болезни пшеницы /Л. Пасечник, С. Ходос, В. Буценк, Л. Патыка // Зерно. - 2011. - №2. - С.90-92
86. Пахомова, Т.И. Проблемы биологической безопасности кормов в промышленном птицеводстве / Т.И. Пахомова, О.А. Монастырский // Агро XXI. - 2006. №1-3. - С.40-42.
87. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток /Пер. с англ. Петровой Т.А., Позмоговой И.Н. // М.: Мир, 1978. –С.14-17.
88. Петриков К.В. Биологические поверхностно-активные вещества продуцируемые микроорганизмами-нефтедеструкторами родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* // Автореф. дис. канд. хим. Наук. – М., 2011. – С. 11
89. Пиковская Р.И. Мобилизация фосфатов в почве в связи с жизнедеятельностью некоторых видов микробов // Микробиология. -1948. - Т.17. - С. 362-370.
90. Пирог, Т. П. Использование микробных поверхностноактивных веществ в биологии и медицине / Т.П Пирог, А.Д. Конон, А.Б. Скочко, // *Biotechnologia Acta.* – 2001. - № 2.- Т. 4.
91. Подкина, Д.В. Использование комбинированных инфекционных фонов при оценке устойчивости сои к корневой гнили / Д.В. Подкина, И.А. Котлярова // Научн.-техн. бюл. ВНИИМК. – Краснодар, 1988. – № 3. – С. 25–27.
92. Попкова К.В. // Общая фитопатология. М.: Дрофа. – 2005. - 445с.
93. Редди, Т.К. Моно-, ди- и триацетилфлороглюцины из *Pseudomonas fluorescens* / Т.К. Редди, А.В. Боровков // Химия природ. соединений.— 1969.— № 2 .-С. 133-139.).
94. Рой, А.А. Биологические свойства фосфатмобилизующего штамма *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 / А.А. Рой, О.Н. Рева, И.К. Курдиш, В.В. Смирнов // Прикл. биохим. микробиол. - 2004. - Т. 40. - № 5. - С. 551-557.
95. Романенко, Н.Д. Перспективы использования бактерий-антагонистов против наиболее фитопатогенных видов нематод, вирусов и грибов / Н.Д. Романенко, И.О. Попов, С.Б. Таболин, Е.Н. Бугаева, Заец В.Г. // Издательство Агрорус. - 2008.-№ 1–3.
96. Сарычева Л. М. Влияние регуляторов роста растений и фунгицидов на патогенез инфекционного выпадения и урожайность озимых зерновых культур / Автореф. дис. канд. биол. наук. // М., 2010.
97. Свешникова Е.В. Новые бактерии рода *Pseudomonas* - антагонисты фитопатогенов и перспективы их использования в сельскохозяйственной практике / Автореф. дис. канд. биол. наук. // М. - 2007г
98. Сидорова И.И. Биологические методы борьбы с фитопатогенными грибами // Итоги науки и техники. Защита растений. – М.: ВИНТИ, 1980. – № 2. – С. 116-157.
99. Сизова, О.И Ризосферные бактерии *Pseudomonas aureofaciens* и *Pseudomonas chlororaphis*, окисляющие нафталин в присутствии мышьяка / О.И. Сизова, В.В. Кочетков, А.М. Боронин // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. - том 46. - № 1. - С. 45–50.
100. Смирнов, В.В Бактерии рода *Pseudomonas* / В.В. Смирнов, Е.А. Киприанова // Киев: Наукова думка - 1990. -264 с.

101. Соколов, М.С. Здоровая почва как необходимая условия жизни человека / М.С. Соколов, Ю.Л. Дородных, А. Марченко // Почвоведение. - 2010. - № 7. - С. 858-866.

102. Старшов А.А. Комплексное использование фосфатрастворяющих и супрессивных свойств микроорганизмов: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Оболенск. - 1014г.

103. Станкевич Д.С. Использование углеводородокисляющих бактерий рода *Pseudomonas* для биоремедиации нефтезагрязненных почв: Дис. канд. биол. наук / академия им. К.А. Тимирязева, - М. – 2002- 132с.

104. Сулейманова, Л.Р. Комплексообразование триглицеридпептидов бактерий рода *Pseudomonas* с корневыми эксудатами растений / Л.Р. Сулейманова, С.П. Четвериков, О.Н. Логинов // Башкирский химический журнал. - 2007. - Т. 14, № 3. - С. 47-51.

105. Сулейманова, Л.Р. Микроорганизм *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 и биопрепарат «Елена» / Л.Р. Сулейманова, Е.А. Асабина, О.Н. Дубинина, О.Н. Логинов, С.П. Четвериков, Н.Ю. Черняева, Р.Ф. Хузнарязанова, Н.Н. Силищев // Токсикологический вестник. - 2008. - № 3. - С. 39-41.

106. Сулейманова, Л.Р. Комплексообразующая способность метаболитов псевдомонад с ионами металлов / Л.Р. Сулейманова, С.П. Четвериков, О.Н. Логинов // Аграрная Россия. – 2009. Специальный выпуск. – С. 130-131.

107. Сулейманова, Л.Р. Метаболиты бактерий рода *Pseudomonas*: экологичный механизм взаимодействия с растениями / Л.Р. Сулейманова, С.П. Четвериков, О.Н. Логинов // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2007. - Вып. № 75. - С. 338-340.

108. Тихонович, И.А. Сельскохозяйственная микробиология как основа экологически устойчивого агропроизводства: фундаментальные и прикладные аспекты / И.А. Тихонович, Н.А. Прохоров // Сельскохозяйственная биология – СПб, - 3-2011.- С. 3-9.

109. Феклистова, И.Н. Стимуляция роста растений бактериями *Pseudomonas aurantiaca* В-162 / И.Н. Феклистова, Е.Г. Веремеенко // Актуальные проблемы изучения фито- и микобиоты: Сб. статей / Под ред. В.Д. Поликсеновой– Минск: 2004– С. 203–205.

110. Феклистова, И.Н. Синтез феназиновых соединений бактериями *Pseudomonas aurantiaca* В-162 / И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // Вест. Белорус. ун-та– Сер. 2: Химия. Биология. География–2005– № 2– С. 66–69.

111. Феклистова, И.Н. Оптимизация условий синтеза феназина бактериями *Pseudomonas aurantiaca* В-162 / И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // Вест. Белорус. ун-та– Сер. 2: Химия. Биология. География–2005– № 3– С. 29–31.

112. Феклистова, И.Н. Бактерии *Pseudomonas aurantiaca* В-162 как основа биопрепарата для защиты растений / И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // Земляробства і ахова раслін.– 2006– № 2– С. 42–44.

113. Феклистова, Н.П. Синтез пирролнитрина бактериями *Pseudomonas aurantiaca* В-162 / Н.П. Феклистова, И.Н. Максимова // Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем: Труды

Белорусского государственного университета. Т. 3. ч. 1 / под ред. В.М. Юрина.– Минск: 2008.– С. 148–155.

114. Феклистова, И.Н. Гиббериллины бактерий *Pseudomonas aurantiaca*: биологическая активность, подходы к получению и использованию продуцентов фитогормонов / И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // Белорусский государственный университет, Минск, - 2009.

115. Феклистова, И.Н. Применение синтезирующих антибиотики феназинового ряда бактерий *Pseudomonas aurantiaca* для биологического контроля заболеваний пшеницы / И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // Вестник БГУ.- Минск. - 2009. - 2(3).- С. 32-36.

116. Фундаментальная фитопатология / Под ред. Ю.Т. Дьякова. – М.: Красанд. - 2012. - 512 с

117. Хархун Е В Использование антагонизма *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* при создании экспериментального биопрепарата и его влияние на состояние микробиоценоза почвы : Автореф. дис. канд. биол. наук. – Ростов-на-Дону, 2008.

118. Хархун, Е.В. Состояние микробиоценоза почвы после применения биопрепаратов на основе *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* (*Pseudomonas aureofaciens*) / Е.В. Хархун, А.В. Полякова, В.В. Внуков, Д.А. Ким // Фундаментальные исследования. - 2012. - № 11. – С. 56-60.

119. Четвериков, С.П. Оптимизация состава питательной среды для промышленного производства биопрепарата «Елена» / С.П. Четвериков, Е.А. Асабина, О.Н. Логинов // Башкирский химический журнал. - 2006. - Т. 13, № 2. - С. 10-13.

120. Четвериков, С.П. Комплексообразование триглицеридпептидов псевдомонад с корневыми экссудатами растений как механизм воздействия на фитопатогены /. Л.Р. Сулейманова, О.Н. Логинов // Прикладная биохимия и микробиология. -2009. Т. 45, №5. – С. 506-511.

121. Четвериков, С.П. Цитокининподобные вещества *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 6 / С.П. Четвериков, Е.А. Асабина // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009.- №10 - С. 512-513.

122. Четвериков, С.П. Новые цитокининподобные метаболиты *Pseudomonas chlororaphis*. / С.П. Четвериков, О.Н. Логинов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13. - № 5(3). – С. 218-220.

123. Четвериков С.П. Идентификация новых экзометаболитов некоторых штаммов *Pseudomonas* spp. и технология биопрепаратов на их основе : Автореф. дис. докт. биол. наук. - Уфа, 2012.

124. Чкаников, Д.И. Влияние некоторых фунгицидов на токсинообразование в культуре гриба *Fusarium graminearum Schwabe* / Д.И. Чкаников, Г.Д. Соколова, Г.А. Девяткина, В.В. Павлова // Агрехимия. – 1996. - №12. - С.68–73.

125. Чугунова К.О. Антагоністична активність штаму *Pseudomonas fluorescens* 2303 // Щодо фітопатогенів Наукові вісті НТУУ "КПІ" . - 2013 / 3

126. Шкалик В.А. Защита растений от болезней //3-е изд., испр. и доп. - М.: КолосС, 2010. - 404 с., [16] л. ил. ISBN 978-5-9532-0767-6

127. Штерншис, М.В. Биопрепараты в защите растений / М.В. Штерншис, Ф.С. Джалилов, И.В. Андреева, О.Г. Томилова // Масличные культуры. - Новосибирск. Изд-во НГАУ. - 2000. - С. 128.
128. Штерншис, М.В. Биологическая защита растений / М.В. Штерншис, Ф.С. Джалилов, И.В. Андреева, О.Г. Томилова // КолосС, – М.,- 2004. – 264 с.
129. Abalos, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes / A. Abalos, A. Pinazo, M. Infante R. et al. // Langmuir. - 2001. - V. 17, N 5. - P.1367-1371.
130. Anandaraj, B. Studies on influence of bioinoculants (*Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium* sp., *Bacillus megaterium*) in green gram. / B. Anandaraj, A. Leema Rose Delapierre. // J. Biosci. Tech.- Vol 1 (2).- 2010.-P. 95-99.
131. Bailey, K.L. Social and economic drivers shaping the future of biological control: A Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides [K.L. Bailey, S.M. Boyetchko, T. Langle // Biological Control.- 2010.-V.52.-P.221-229.
132. Banat, I. M. Potential commercial applications of microbial surfactants / I.M. Banat, R. Makkar, S. Cameotra // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2000. - V. 53, N 5. - P. 495-508.
133. Banik, S. Available phosphate content of an alluvial soil is influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms / S. Banik, B.K. Dey. // Plant Soil. - 1982. - V.69. - P. 353-364.
134. Barea, J.M Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens / J.M. Barea, G. Andrade, V. Bianciotto, D. Dowling, S. Lohrke, P. Bonfante, F. O’Gara, C. Azcon-Aguilar // Appl. Environ. Microbiol. 1998. 64(6): 2304-2307.
135. Benizri, E. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. / E. Benizri, E. Baudoin, A. Guckert // Biocontrol Science and Technol. - 2001. - 11(5). – P.557-574.
136. Berg, G. Endophytic and ectophytic potato associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi / G. Berg, A. Krechel, M. Ditz, R.A. Sikora, A. Ulrich, J. Hallmann // FEMS Microbiology Ecology. – 2005. - 51(2). – P.215-229.
137. Bhattacharya A. Siderophore mediated metal uptake by *Pseudomonas fluorescens* and its comparison to iron (III) chelation. // Cey. J. Sci. (Bio. Sci.) 39 (2): 147-155, 2010.
138. Blakeman, J.P. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. / C.E. Windels, S.E. Lindow // Biological control on the phylloplane. - St. Paul MI: Amer. Phytopathol. Soc. 1985. - 6p.
139. Bleakley, B.H. Control of Fusarium head blight with biological antagonists / B.H. Bleakley, M.A. Draper, K.R. Ruden // In: Proceedings of National Fusarium Head Blight Forum, USA, 2000. - P. 75–76.
140. Bloemberg, G.V. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. // G.V. Bloemberg, G.A. O’Tool, B.J.J. Lugtenberg, R. Kolter // Appl. Environ. Microbiol.- 1997.- 63.- 4543-4551.

141. Bottalico, A. *Fusarium* species and their mycotoxins in infected cereals in the field and in stored grains // A. Bottalico, A. Logrieco, A. Visconti // *Fusarium mycotoxins, taxonomy, and pathogenicity* / Ed. Chelkowski J. - New York: Elsevier, 1989. - P. 85-119.

142. Bumb, B.L, The Role of Fertilizer in Sustaining Food Security and Protecting the Environment / B.L. Bumb, C.A. Baanante // Food, Agriculture and the Environment Discussion Paper 17. International Food Policy Research Institute, Washington, DC - 1996.

143. Campbell, R. Anatomy and community structure of the rhizosphere / R. Campbell, M.P. Greaves // *The Rhizosphere*. Ed. by Lynch, J.M. / Chichester: Willey & Sons. 1990. - P. 11-34.

144. Carrie, S. Phenazines are not essential for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*, but do play a role in biofilm formation / S.Carrie, R. Habibian, N. Poritsanos, S. N.P. Athukorala, D. Fernando // *FEMS Microbiol Ecol* 71. 2010. – P.73-83.

145. Chung, H. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea / H. Chung, M. Park, M. Madhaiyan, S. Seshadri, J. Song, H. Cho, T. Sa // *Soil Biol. Biochem.* - 2005. - V. 37. - P. 1970-1976.

146. Cook, R.J. The nature and practice of biological control of plant pathogens / R.J. Cook, K.F. Baker // St. Paul (Minn.): Amer. Phytopathol. SoCh. – 1983. – 539 p

147. Costacurta, A. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria / A. Costacurta, J. Vanderleyden // *Critical Rev. Microbiol.* -1995.- 21, – P. 1-18.

148. Crowley, D.E. Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. / D.E. Crowley, C.P.P. Reid, P.J. Szaniszlo // *Plant Physiol.* 1988. 87, - P. 680-685.

149. 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.

150. Dunne C. Mechanisms involved in biocontrol by microbial inoculants / C. Dunne, I. Delany, A. Fenton, F. O'Gara // *Agronomie.* - 1996.- 16(10).- P. 721-729.

151. Egamberdieva D. *Pseudomonas chlororaphis*: a salt-tolerant bacterial inoculant for plant growth stimulation under saline soil conditions. // *Acta Physiol Plant.*- 2012.

152. Emmert, E.A.B Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective / E.A.B. Emmert, J. Handelsman // *FEMS Microbiol. Letters.* -1999.- 171(1), – P. 1-9.

153. Figueiredo, M.D.V.B Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications / M.D.V.B. Figueiredo, L. Seldin, F.F. de Araujo, R.D.L.R. Mariano // *Plant growth and health promoting bacteria*..-2010.- 18. - P. 21-43.

154. Fuller, A.T. Rod Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens* / A.T. Fuller, G. Mellows, M. Waif // *Nature.*- 1971.- 234, N 5329.- P. 416

155. Griffiths, B. S., Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates / B. S. Griffiths, K. Ritz, N. Ebbelwhite, G. Dobson. // *Soil Biol. Biochem.*- 1999.- 31.- P. 145–153.

156. Goldstein, A.H. Mining by microbe / A.H. Goldstein, R.D. Rogers, G. Mead // Bio-Technology. - 1993. - V.11. - P. 1250-1254.
157. Gyaneshwar, P. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants / P. Gyaneshwar, G. Naresh Kumar, L. J. Parekh & P. S. Poole. // Plant and Soil 245: 83–93, 2002.- Kluwer Academic Publishers
158. Guetsky, R. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression / R. Guetsky, D. Shtienberg, Y. Elad, E. Fischer, A. Dinor // Phytopathol. - 2002. – V. 92. – P. 976-985.
159. Hai-Ming Liu Phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* GP72 is positively regulated by the sigma factor RpoN / Hai-Ming Liu An Yan Xue-Hong Zhang Yu-Quan Xu // World J Microbiol Biotechnol (2008) 24:1961–1966
160. Hattori, T. The physical environment in soil microbiology: An attempt to extend principles of microbiology to soil microorganisms / T. Hattori, R. Hattori // CRC Crit. Rev. Microbiol. – 1976. - V.4. - P. 423-461.
161. High throughput screen of 100,000 compound library to identify inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Электронный ресурс: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1949>. – BioAssay Record for AID 1949.- 2009.
162. Ho, W.C. Soil microbiostasis: Effects of environmental and edaphic factors / W.C. Ho, W.H. Ko // Soil Biol. Biochem. – 1985. - V.17. - P. 167-170.
163. Hwangbo, H. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedius*. / H. Hwangbo, R.D. Park, Y.W. Kim, Y.S. Rim, K.H. Park, T.H. Kim, J.S. Suh, K.Y. Kim // Curr. Microbiol. – 2003. - V. 47. - P. 87-92.
164. Itoh, S. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C₁₂, C₁₃ and C₁₄ fractions) / S. Itoh, H. Honda, F. Tomita, T. Suzuki // J. Antibiot. Int. J.- 1971.- 24, N 12.- P. 855-859.
165. Kanner, D. Pattern of phenazine pigment production by a strain of *Pseudomonas aeruginosa* / D. Kanner, N. Gerber, R. Bartha // J. Bacteriol.- 1978.- 134.- N 2.- P. 690.
166. Kim, K. J. Characteristics of sophorolipid as an antimicrobial agent / K.J. Kim, D. S. Yoo, Y. B. Kim // J. Microbiol. Biotechnol. -2002. - V. 12, N 2. - P. 235-241.
167. Кіпріанова, О.А. Комплекс антибіотичних речовин, утворюваних *Pseudomonas* species / О.А. Кіпріанова, О.Н. Бойко, А.С. Рабінович, Б.Ю. Айзенман // 11 - 1974.- 36, No 6.- С. 781-783.
168. Kitamura, S. Studies of lipoxygenase inhibitors. II. KF 8940 (2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide), a potent and selective inhibitor of 5-lipoxygenase, produced by *Pseudomonas methanica* / S. Kitamura, K. Hashizuma // Ibid.- 1986.- 39, N 8.- P. 1160-1167
169. Kloepper, J.W. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production / J.W. Kloepper, R. Lifshits, M.N. Schroth // ISI Atlas Sci. Anim. Plant Sci. -1988.- P. 60-64.
170. Klykov, S.P. A Cell Population Structuring Model to Estimate Recombinant Strain Growth in a Closed System for Subsequent Search of the Mode to Increase

Protein Accumulation during Protealysin Producer Cultivation / S.P. Klykov. et al. // Biofabrication 3 (045006) – 2011. - .12 p.

171. Kondo, S. A new antitumor antibiotic bactobolin produced by *Pseudomonas* / S. Kondo, Y. Horuichi, M. Hamada et al. // J. Antibiot.— 1979.— 32, N 12.— P. 1069— 1071.

172. Lalande, R Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promotion potential / R. Lalande, N. Bissonette, D. Coutlee, H. Antoun // Plant. Soil. 1989. -. 115 - P.7-11.

173. Lambrecht, M. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions / M. Lambrecht, Y. Okon, A. Vande Broek, J. Vanderleyden // Trends in Microbiology. 2000. 8(7), - P. 298-300.

174. Lee, I.I. Effects of gibberellin biosynthesis inhibitors on native gibberellin content, growth and floral initiation in *Sorghum bicolor* / I.I. Lee, K.R. Foster, P.W. Morgan // J. Plant Growth Regul. -1998.- Vol. 17. P. 185-195

175. Lugtenberg, B.J.J. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? / B.J.J. Lugtenberg, L.C. Dekkers // Environ. Microbiol.- 1999.- 1(1).- P.9-13.

176. Luz W.C. da. Biocontrol of fungal pathogens of wheat with bacteria and yeasts / In: 5th International Congress of Plant Pathol. - Kyoto, Japan, 1988. - P. 348.

177. Luz, W.C. da Biological control of *Fusarium graminearum*/ In: *Fusarium* head blight of wheat and barley / W.C. da Luz, C.A. Stockwell, C.A. Bergstrom // APS Press, 2003.- P. 381-394.

178. Maddula, V.S.R.K. Altering the Ratio of Phenazines in *Pseudomonas chlororaphis (aureofaciens)* Strain 30-84: Effects on Biofilm Formation and Pathogen Inhibition. / V.S.R.K. Maddula, E.A. Pierson, L.S. Pierson // Journal of Bacteriology.- Apr. -2008.- Vol. 190, No. 8.- P. 2759-2766.- doi:10.1128

179. Manal, M. A. Antipneumonia agent(s) from marine bacteria / M.A. Manal. El-Naggar* Khoulood, M.I. Barakat // Journal of Natural Products.- 2009.- Vol. 2.- P. 40-48.

180. Marasas, W.F.O. Toxigenic *Fusarium* species. Identity and mycotoxicology. / W.F.O. Marasas, P.E. Nelson, T.A. Toussoun. // The Pennsylvania State Univ. Press, London, 1984. - 328 p.

181. Mayer, H. “Unusual” Lipid A’S : structures, taxonomical relevance and potential value for endotoxin research / H. Mayer, Weckesser // Handbook of Endotoxin. Chemistry of Endotoxin / Ed. E. T. Rietschel.- Amsterdam: Elsevier sci publ., 1984.- P. 221-247.

182. Nidhi, Vijayan P.Arumugam. Screening of Marine bacteria for multiple Biotechnological applications / Nidhi Vijayan, E.Sagadevan // Youth Education and Research Trust (YERT).- November -2012.

183. Parker, N. L. Gepacin A and Cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia* / N. L. Parker, M. L. Rathum, V. Seiner. et al. // J. Antibiot.- 1984.- 37,N 5.- P. 431-440,

184. Paul, E.A. Soil microbiology and biochemistry. / E.A. Paul, F.E. Clark // Academic Press, San Diego, Calif.- 1996.

185. Paul, C. Appropriate farm management practices for alleviating N and P deficiencies in low-nutrient soils of the tropics / C. Smithson Paul, E. Giller Ken // *Plant and Soil*.- 2002.- V. 245.- P.169–180.
186. Pierson, L.S. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. / L.S. Pierson, L.S. Thomashow // *Mol. Plant-Microbe Interact.*- V. 5.- P. 330-339.
187. Pistrup-Anderson, P. Pistrup-Anderson, P. The world food situation: recent developments, emerging issues and long-term prospects. Vision 2020: Food Policy Report / P. Pistrup-Anderson, R. Pandey-Lorch, M.W. Rosegrant // International Food Policy Research Institute, Washington, DC.- 1997.- 36 p.
188. Raupach, G.S. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens / G.S. Raupach, J.W. Kloepper // *Phytopathol.* - 1998. - V. 88. - P. 1158-1164.
189. Rodríguez, H. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion / H. Rodríguez, R. Fraga // *Biotechnol. Adv.* – 1999. - V.17. - P. 319–339.
190. Rodrigues, L. Biosurfactants: potential applications in medicine / L. Rodrigues, I.M. Banat, J. Teixeira, R. Oliveira // *J. Antimicrob. Chemother.* - 2006. - V. 57, N 4. - P. 609-618.
191. Rosas Susana, B. Efficacy of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* SR1 for Improving Productivity of Several Crops. / B. Rosas Susana, A. Pastor Nicolás, B.L. Guñazú, A.A. Javier., E. Carlier, V. Vogt, J. Bergesse, M. Rovera. // *Crop Production Technologies*.- 2012.- P. 209-212.
192. Sahn, U. Isolation and characterization of the methionine antagonist 1-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid from *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. / U. Sahn, G.t. Knobloch, F. Wagner // *J. Antibiot.*- 1973.- 26, N 7.- P. 389.
193. Schisler, D.A. Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes / D.A. Schisler, P.J. Slininger, R.J. Bothast // *Phytopathol.* -1997. –V. 87. - P. 177 – 183.
194. Singh, P. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences / P. Singh, S. Cameotra // *Trend. Biotechnol.* - 2004. - V. 22.- N 3. - P. 142-146.
195. Simons, M. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria / M. Simons, A.J I. van der Bij, Brand, L.A. de Weger, C.A. Wijffelman, B.J.J. Lugtenberg // *MPMI*. 1996. 9: - P.600-607.
- 196/ Stockwell, C.A. Biocontrol of wheat scab with microbial antagonists / C.A. Stockwell, W.C. Luz, G.C. Bergstrom // *Phytopathol.* – 1997. - V. 87, - P. 94-98.
197. Suslow, T.W. Rhizobacteria of sugar beet: effects of seed application and root colonization on yield / T.W. Suslow, M.N. Schroth // *Phytopatology*.- 1982.- Vol. 72.- № 2.- P. 199-206.
198. T.de Kievit. Using Molecular Techniques to Understand and Enhance Biological by *Pseudomonas* spp / T. de Kievit, H. Bee., S. Carrie // *Plant Science and Biotechnology*.- 2011.
199. Thomashow, L.S. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites / L.S. Thomashow, D.M. Weller // *Plant Microbe Interactions*. Ed. by Stacey G., Keen N. - New York: Chapman and Hall. 1995. №1.- P.187–235.

200. Thrane, U. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. / U. Thrane, A. Adler, P. E. Clasen, F. Galvano et al. // Intern. J. Food Microbiol. – 2004. - V. 95. - P. 257–266.
201. Tilman, D. Forecasting agriculturally driven global environmental change / D. Tilman, J. Fargione, B. Wolff, C. D'Antonio, A. Dobson, R. Howarth, D. Schindler, W.H. Schlesinger, D. Simberloff, D. Swackhamer // Science.- 2001.- 292.- P. 281–284.
202. Trusal L.R. Stability of T-2 mycotoxin in aqueous media. // Appl. Environ. Microbiol. – 1985. - V. 50, №5. - P. 1311–1312.
203. Turner J. M. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production // Adv. Microb. Physiol. – 1986. – Vol. 27. – P. 211 – 275.
204. Utkhede, R. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes / R. Utkhede, C. Koch // Biol. Control. – 2004. – V. 49. – P. 305-313.
205. Vance C.P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. // Plant Physiology -2001.- 127.- P. 390-397.
206. Vassilev, N. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends / N. Vassilev, M. Vassileva, J. Nikolaeva // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2006. - V. 71. - P.137-144.
207. Vassilev, N. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial waste / N. Vassilev, M. Vassileva // Appl Microbiol Biotechnol (2003) 61, - P.435–440.
208. Vidaver, A.K. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinae* and *P. phaseolicola* II. / A.K. Vidaver, M.L. Mathys, M.E. Thomas, M.L. Schuster // Can. J. Microbiol.- 1972.- 18, N 6.- P. 705-713.
209. Wakulinski W. Phytotoxicity of the secondary metabolites of fungi causing wheat head fusariosis (head blight) // Acta Physiol. Plant.- 1989.- V. 11.- № 4.- P. 301-306.
210. Weller David M. *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Year / Symposium The Nature and Application of Biocontrol Microbes III: *Pseudomonas* spp. 2007.
211. Whipps J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // J. of Experim. Bot. – 2001. – V. 52 – P. 487-511.
212. Yang, C-H. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status / C-H. Yang, D.E. Crowley // Appl. Environ. Microb.- 2000.-№ 66.- P. 345-351.
213. 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.

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 // Агрохимия.- 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.

Изоляты из коллекции ФРМ, использованные для скрининга
психрофильного штамма-антагониста как потенциального продуцента
микробного препарата

№№ п/п	Название изолята в коллекции ФРМ	Идентификация по биохимическим тестам
1	Apt-AB	не идентифицирован
2	Apt-AIL	не идентифицирован
3	Сrn-8a	не идентифицирован
4	Нор-2в	не идентифицирован
5	Нор-7а	<i>Pseudomonas</i> sp.
6	Нор-7в	не идентифицирован
7	Нор-11b	дрожжи
8	Нор-12с	не идентифицирован
9	Нор-13	<i>Enterobacter</i> sp.
10	Нор-14	<i>Enterobacter</i> sp.
11	Нор-16	<i>Enterobacter</i> sp.
12	Hrv-1 b	<i>Enterobacter</i> sp.
13	Kav-8	<i>Pseudomonas</i> sp.
14	Kav-15a	дрожжи
15	Kav-30	не идентифицирован
16	Kav-56a	<i>Candida</i> sp.
17	Kav-56	<i>Enterobacter</i> sp.
18	Kav-86	не идентифицирован
19	Kav-88b	<i>Bacillus</i> sp.
20	Kav-89	<i>Enterobacter</i> sp.
21	Kav-90	не идентифицирован
22	Kav-91	не идентифицирован
23	Kav-97	<i>Pseudomonas</i> sp.
24	Kav-123	не идентифицирован
25	Kav-170	<i>Pantoea agglomerans</i>
26	Kav-171	<i>Klebsiella</i> sp.
27	Kav-179	<i>Enterobacter</i> sp.
28	Kav-192	не идентифицирован
29	Kav-199	<i>Enterobacter</i> sp.
30	Kav-203	не идентифицирован
31	Kav-210	<i>Pseudomonas</i> sp.
32	Kav-211	не идентифицирован
33	Kav-220	<i>Pseudomonas</i> sp.
34	Kav-232	не идентифицирован
35	Kav-242	<i>Enterobacter</i> sp.
36	Kav-243	<i>Enterobacter</i> sp.
37	Kav-246	не идентифицирован

38	Kav-249	<i>Klebsiella</i> sp.
39	Kav-256	<i>Pseudomonas</i> sp.
40	Kav-261	<i>Enterobacter</i> sp.
41	Kav-266	<i>Enterobacter</i> sp.
42	Kav-277	<i>Enterobacter</i> sp.
43	Kav-279	не идентифицирован
44	Kav-282	<i>Klebsiella</i> sp.
45	Kav-286	не идентифицирован
46	Kav-289	<i>Enterobacter</i> sp.
47	Kav-291	<i>Enterobacter</i> sp.
48	Kav-305	<i>Acinetobacter</i> sp.
49	Krl-16	не идентифицирован
50	Krl-42	<i>Enterobacter</i> sp.
51	Krl-107	не идентифицирован
52	Krl-163	<i>Bacillus</i> sp.
53	Krl-164	Krl
54	Krl-181a	<i>Pseudomonas</i> sp.
55	Krl-194	не идентифицирован
56	Krl-198	не идентифицирован
57	Krl-199	не идентифицирован
58	Krl-200	не идентифицирован
59	Krl-201	<i>Enterobacter</i> sp.
60	Krm-48	<i>Pseudomonas</i> sp.
61	Krm-53	не идентифицирован
62	Krm-57	не идентифицирован
63	Krm-62	не идентифицирован
64	Krm-71	не идентифицирован
65	Krm-77	не идентифицирован
66	Krm-132	<i>Bacillus</i> sp.
67	Krm-136	не идентифицирован
68	Krm-141	не идентифицирован
69	Krm-154	не идентифицирован
70	Krm-168	не идентифицирован
71	Krm-194	не идентифицирован
72	Krm-197	не идентифицирован
73	Lev-16	<i>Candida lambica</i>
74	Lhv-10	не идентифицирован
75	Lhv-44	не идентифицирован
76	Lhv-47	не идентифицирован
77	Lhv-71b	<i>Bacillus megaterium</i>
78	Lhv-86	не идентифицирован
79	Lhv-88	не идентифицирован
80	Lhv-97	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>

81	Lhv-98a	<i>Bacillus megaterium</i>
82	Lhv-109	не идентифицирован
83	Lhv-115	не идентифицирован
84	Lhv-117	не идентифицирован
85	Lhv-121b	не идентифицирован
86	Lhv-124b	не идентифицирован
87	Lhv-125a	не идентифицирован
88	Lhv-128	не идентифицирован
89	Lhv-130a	не идентифицирован
90	Lhv-132	не идентифицирован
91	Lhv-133a	не идентифицирован
92	Lhv-135b	не идентифицирован
93	Lhv-140	<i>Bacillus</i> sp.
94	Lhv-141	не идентифицирован
95	Lhv-151	<i>Brevibacillus</i> sp.
96	Lhv-159	<i>Enterobacter</i> sp.
97	Lhv-166	<i>Klebsiella</i> sp.
98	Lhv-178	<i>Enterobacter</i> sp.
100	Lhv-180c	не идентифицирован
101	Lhv-181a	не идентифицирован
102	Lhv-182	не идентифицирован
103	Vsk-4a	не идентифицирован
104	Vsk-8	не идентифицирован
105	Vsk-11	не идентифицирован
106	Vsk-16	не идентифицирован
107	Vsk-17b	не идентифицирован
108	Vsk-22a	не идентифицирован
109	Vsk 24	<i>Enterobacter</i> sp.
110	Vsk 26a1	<i>Bacillus subtilis</i>
112	Vsk-26a3	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
112	Vsk-27	не идентифицирован
113	Vsk 35	<i>Bacillus cereus</i>
114	Vsk-36	не идентифицирован
115	Vsk=43a	не идентифицирован
116	Vsk-48	не идентифицирован

Патогены, использованные в исследовании антимикробной активности
Pseudomonas chlororaphis Vsk-26a3

№№	Название штамма	Происхождение
1	<i>Acinetobacter baumannii</i> 1005	коллекция ГКПМ
2	<i>Acinetobacter lwoffii</i> 54	коллекция ГКПМ
3	<i>Bacillus coagulans</i> E-69	коллекция ГКПМ
4	<i>Bacillus anthracis</i> СТИ-1	коллекция ГКПМ
5	<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168	коллекция ГКПМ
6	<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	коллекция ГКПМ
7	<i>Erwinia cancerogena</i> 1038	коллекция ГКПМ
8	<i>Erwinia carotovora</i> 567	коллекция ГКПМ
9	<i>Erwinia carotovora</i> 6	коллекция ГКПМ
10	<i>Erwinia herbicola</i>	коллекция ГКПМ
11	<i>Enterobacter cloacae</i> A-186	коллекция ГКПМ
12	<i>Esheria coli</i> AW 518	коллекция ГКПМ
13	<i>Esheria coli</i> HB 101	коллекция ГКПМ
14	<i>Esheria coli</i> ATCC 25922	коллекция ГКПМ
15	<i>Esheria coli</i> HB101(С6)	коллекция ГКПМ
16	<i>Esheria coli</i> BL 21	коллекция ГКПМ
17	<i>Esheria coli</i> 6ЖР	коллекция ГКПМ
18	<i>Esheria coli</i> Я-63	коллекция ГКПМ
19	<i>Esheria coli</i> 3R	коллекция ГКПМ
20	<i>Haemophilus influenzae</i> 411	коллекция ГКПМ
21	<i>Haemophilus influenzae</i> Tipe B423	коллекция ГКПМ
22	<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 13883	коллекция ГКПМ
23	<i>Klebsiella pneumonia</i> 244 2(17)	коллекция ГКПМ
24	<i>Klebsiella pneumonia</i> 969R	коллекция ГКПМ
25	<i>Listeria monocytogenes</i> 766/1	коллекция ГКПМ
26	<i>Micrococcus luteus</i> B72 МГУ-1	коллекция ГКПМ
27	<i>Micrococcus luteus</i> МГУ-4	коллекция ГКПМ
28	<i>Morganella morganii</i>	коллекция ГКПМ
29	<i>Mycobacterium smegmatis</i> 53/55	коллекция ГКПМ
30	<i>Pasteurella multocida</i>	коллекция ГКПМ
31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	коллекция ГКПМ
32	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	коллекция ГКПМ
33	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 466	коллекция ГКПМ
34	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> L-23	коллекция ГКПМ
35	<i>Salmonella gallinarum pulorum</i>	коллекция ГКПМ
36	<i>Salmonella enteritidis</i> 89	коллекция ГКПМ
37	<i>Salmonella enteritidis</i> 204	коллекция ГКПМ

38	<i>Salmonella enteritidis</i> 237	коллекция ГКПМ
39	<i>Salmonella typhimurium</i> 4,5,12 ВОЗ	коллекция ГКПМ
40	<i>Salmonella typhimurium</i> 490/60	коллекция ГКПМ
41	<i>Salmonella typhimurium</i> 79	коллекция ГКПМ
42	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100	коллекция ГКПМ
43	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	коллекция ГКПМ
44	<i>Shigella dysenteriae</i> I 1361	коллекция ГКПМ
45	<i>Shigella sonnei</i> S-форм	коллекция ГКПМ
46	<i>Stachibotrys chartarum</i> F-410	коллекция ГКПМ
47	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 208P	коллекция ГКПМ
48	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	коллекция ГКПМ
49	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 538P	коллекция ГКПМ
50	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p	коллекция ГКПМ
51	<i>Staphylococcus aureus</i> MR 17R	коллекция ГКПМ
52	<i>Staphylococcus aureus</i> 17R	коллекция ГКПМ
53	<i>Staphylococcus aureus</i> 93R	коллекция ГКПМ
54	<i>Staphylococcus aureus</i> 113R	коллекция ГКПМ
55	<i>Staphylococcus aureus</i> 132R	коллекция ГКПМ
56	<i>Staphylococcus aureus</i> 194R	коллекция ГКПМ
57	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043	коллекция ГКПМ
58	<i>Streptococcus faecalis</i> B-602	коллекция ГКПМ
59	<i>Xantomonas phaseoli</i> B-627	коллекция ГКПМ
60	<i>Xantomonas vasculorum</i> B-631	коллекция ГКПМ
61	<i>Yersinia enterocolitica</i> 287	коллекция ГКПМ
62	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> 693	коллекция ГКПМ
63	<i>Yervinia enterocolitica</i>	коллекция ГКПМ
64	<i>Alternaria brasivicola</i> MF-P156011	коллекция ГКПМ
65	<i>Alternaria porri</i> MF-P176011	коллекция ГКПМ
66	<i>Alternaria solani</i> MF-P048011	коллекция ГКПМ
67	<i>Alternaria tenuissima</i> MF-P127012	коллекция ГКПМ
68	<i>Alternaria radicina</i> MF-P196011	коллекция ГКПМ
69	<i>Candida albicans</i> I	коллекция ГКПМ
70	<i>Candida albicans</i> 1711	коллекция ГКПМ
71	<i>Candida guilermundii</i> 3008	коллекция ГКПМ
72	<i>Candida krusei</i> 2531	коллекция ГКПМ
73	<i>Candida pseudotropikalis</i> 3282	коллекция ГКПМ
74	<i>Fusarium culmorum</i> №23	коллекция ГКПМ
75	<i>Fusarium culmorum</i> №36	коллекция ГКПМ
76	<i>Fusarium culmorum</i>	ВИЗР
77	<i>Fusarium moniliforme</i> №5	коллекция ГКПМ
78	<i>Fusarium oxysporum</i> B-329	коллекция ГКПМ
79	<i>Fusarium poae</i>	ВИЗР
80	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	ВИЗР

81	<i>Fusarium proliferatum</i>	ВИЗР
82	<i>Fusarium graminearum</i> VL-1735	коллекция ГКПМ
83	<i>Fusarium graminearum</i> №32	коллекция ГКПМ
84	<i>Fusarium graminearum</i> №33	коллекция ГКПМ
85	<i>Fusarium graminearum</i>	коллекция ГКПМ
86	<i>Fusarium graminearum</i> ВИЗР	ВИЗР
87	<i>Fusarium solani</i> B-263	коллекция ГКПМ
88	<i>Microdochium nivale</i> 4995	ВНИИ Генетика
89	<i>Microdochium nivale</i> Ряз	коллекция ГКПМ
90	<i>Microdochium nivale</i> F1294	коллекция ГКПМ
91	<i>Penicillium commun</i>	коллекция ГКПМ
92	<i>Penicillium morfensii</i> №26	коллекция ГКПМ
93	<i>Trichophyton terrestre</i> AS-496	коллекция ГКПМ

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Федеральное бюджетное учреждение науки

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

(ФБУН ГНЦ ПМБ)

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН ГНЦ ПМБ

чл.-кор. РАН, д-р мед. наук, проф.

И.А. Дятлов

2015 г.



ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство комплексного биопрепарата против
снежной плесени на основе *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3

ЛР 78095326-153-2015

Срок действия регламента до « _____ » _____ 2020 г.

**Российская академия сельскохозяйственных наук
Государственное научное учреждение –
Рязанский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
(ГНУ Рязанский НИИСХ)**

Утверждаю
Директор ГНУ Рязанский НИИСХ
О.В. Гладышева
« 6 » *июля* 2013 г.



А К Т

о результатах полевых испытаний экспериментальных образцов бактериальных микроорганизмов, обладающих фунгицидным действием против возбудителей грибных и бактериальных болезней яровой мягкой пшеницы

Цель испытаний: Оценить в полевых условиях биологическую эффективность 2 экспериментальных образцов бактериальных микроорганизмов в 2-х концентрациях, обладающих фунгицидным действием против возбудителей грибных и бактериальных болезней яровой мягкой пшеницы.

Метод проведения испытаний:

Экспериментальную часть исследований проводили на опытном поле отдела селекции и семеноводства зерновых культур и многолетних трав Рязанского НИИСХ.

Закладку опыта осуществили в селекционном севообороте на темносерой лесной тяжелосуглинистой почве со следующими агрохимическими показателями: рН солевой вытяжки 5,15; содержание гумуса в слое 0-40см (по Тюрину) — 5,09 %, подвижного фосфора (по Кирсанову) — 308 мг/ кг почвы, подвижного калия — 132 мг/ кг почвы.

Предшественник — чёрный пар. Посев осуществили по технологии, рекомендованной для возделывания яровой мягкой пшеницы, с учетом погодных условий.

Посев делянок проводили сеялкой ССФК-7М. Учетная площадь делянки 12 м², повторность четырехкратная. Норма высева 6 млн. всхожих зерен на гектар. Всхожесть семян составляла 98,2 %.

Уборку делянок проводили комбайном «САМПО-130». Урожайные данные пересчитывали с учетом 14% влажности.

**Российская академия сельскохозяйственных наук
Государственное научное учреждение –
Рязанский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
(ГНУ Рязанский НИИСХ)**

Утверждаю:
Директор ГНУ Рязанский НИИСХ
Гладышева О.В.
«15» _____ 2013 г.



АКТ

**о результатах полевых испытаний экспериментальных образцов
бактериальных микроорганизмов, обладающих фунгицидным
действием против возбудителей грибных и бактериальных болезней сои**

Цель испытаний: Оценить в полевых условиях биологическую эффективность 2-х экспериментальных образцов бактериальных микроорганизмов, обладающих фунгицидным действием против возбудителей грибных и бактериальных болезней сои.

1. Метод проведения исследований

Полевые опыты проведены на опытном поле лаборатории селекции сои Рязанского НИИСХ в селекционном севообороте отдела селекции и первичного семеноводства. Почва опытного участка темно-серая лесная, тяжелосуглинистая по гранулометрическому составу. Реакция почвенного раствора - $pH_{\text{сол.}}$ 5,25, содержание гумуса (по Тюрину) – 5,3%. Содержание подвижного фосфора (по Кирсанову) – 34,0 мг/100г почвы, содержание подвижного калия (по Кирсанову) – 19,2 мг/100г почвы. Предшественник – озимая пшеница. Опыты проведены по инновационной технологии возделывания сои для хозяйств Рязанской области.

Повторность в опытах 4-х кратная, размещение вариантов систематическое, площадь делянки 25,6 м², учетная площадь делянки – 16,3 м².

Тест-культура: Соя. Сорт Касатка.

Испытываемые экспериментальные образцы биопрепаратов представлены в виде сухих порошков, приготовленных на основе штаммов Vsk 26a3 и Lhv 97, выделенных из природных источников, в дозах 1,0 и 0,5 кг/т.

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ П.А. КОСТЫЧЕВА»

Утверждаю
Ректор

Н.В. Бышов
«*Иванов*» 2014 г.

А К Т

о результатах полевых испытаний экспериментальных образцов биопрепаратов, содержащих микроорганизмы, приготовленные на основе штаммов Vsk 26a3 и Lhv 97, выделенных из природных источников, обладающих фунгицидным действием против возбудителей снежной плесени озимой пшеницы

Цель испытаний: 1. Оценить в полевых условиях биологическую эффективность 2-х экспериментальных образцов бактериальных микроорганизмов, приготовленных на основе штаммов Vsk 26a3 и Lhv 97, выделенных из природных источников в 2-х концентрациях, обладающих фунгицидным действием против возбудителей снежной плесени озимой пшеницы.

2. Определить влияние экспериментальных препаратов на элементы структуры урожая и урожайность нового сорта озимой мягкой пшеницы Виола.

Метод проведения испытаний:

Экспериментальная часть исследований проводили на опытном поле Агротехнологической станции РГАУ.

Закладку опыта осуществили в селекционном севообороте на серой лесной тяжелосуглинистой почве со следующими агрохимическими показателями: рН солевой вытяжки – 5,17; содержание гумуса в слое 0-20 см (по Тюрину) – 3,13 %, подвижного фосфора (по Кирсанову) – 142 мг/ кг почвы, подвижного калия – 182 мг/ кг почвы.

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ П.А. КОСТЫЧЕВА»



Утверждаю
Ректор

Н.В. Бышов

_____ 2015 г.

А К Т

о результатах оценки в полевых условиях биологической эффективности экспериментальных образцов бактериальных препаратов, обладающих фунгицидным действием против возбудителей снежной плесени озимой пшеницы с использованием искусственного инфекционного фона

Цель испытаний – оценить в полевых условиях биологическую эффективность экспериментальных образцов двух бактериальных препаратов для борьбы с возбудителем снежной плесени озимой пшеницы в условиях создания искусственного инфекционного фона. Образцы бактериальных препаратов приготовлены на основе штаммов *Pseudomonas chlororaphis* Vsk 26a3 и *Geobacillus thermoglucosidasius* Lhv 97, обладающих выраженным фунгицидным действием против возбудителей снежной плесени.

Метод проведения испытаний:

Экспериментальную часть исследований проводили на опытном поле Агротехнологической станции РГАТУ.

Закладку опыта осуществили в селекционном севообороте на серой лесной тяжелосуглинистой почве со следующими агрохимическими показателями: рН солевой вытяжки – 5,13; содержание гумуса в слое 0-20 см (по Тюрину) – 3,1 %, подвижного фосфора (по Кирсанову) – 139 мг/ кг почвы, подвижного калия – 162 мг/ кг почвы.

Предшественник — чёрный пар. Посев осуществили по технологии, рекомендованной для возделывания озимой мягкой пшеницы, с учетом погодных условий.