

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

ЛЕВ

Игорь Олегович

**ПОИСК НОВЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ-АНТАГОНИСТОВ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КАНДИДОЗОВ С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ
АНТИМИКОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

Специальность:

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

03.02.03– микробиология

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор технических наук В.Д. Похиленко

Научный руководитель: кандидат биологических наук И.А. Дунайцев

Оболенск – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Микозы – заболевания, вызываемые грибными патогенами.....	14
1.1.1. Классификация представителей микромицетов, способных вызывать микозы.....	15
1.1.2. «Группы риска» при микозах	15
1.1.3. Группы микозов.	16
1.1.4. Существующие средства борьбы с микозами человека и животных и их классификация.....	16
1.2. Противогрибковые химиопрепараты, применяемые в медицине.....	18
1.2.1. Полиены.....	18
1.2.2. Азолы.....	19
1.2.3. Аллиламины.....	19
1.2.4. Препараты разных групп.....	20
1.3. Патологии животных, вызываемые микромицетами, и способы их лечения.....	20
1.4. Борьба с патогенными грибами в растениеводстве.....	22
1.5. Использование антимикотических веществ в пищевой промышленности	24
1.6. Недостатки существующих антифунгальных препаратов	25
1.7. Бактерии рода <i>Bacillus</i>	26
1.7.1. Проблемы классификации бацилл.....	26
1.7.2. Группы патогенности бацилл.....	27
1.7.3. Биосинтез бактериями рода <i>Bacillus</i> ферментов и липопептидов	28
1.7.4. Антибиотики и бактериоцины бактерий рода <i>Bacillus</i>	32
1.7.5. Аминогликозиды	33
1.8. Заключение по обзору литературы.....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	37
2.1. Штаммы микроорганизмов	37
2.2. Питательные среды для культивирования микроорганизмов.....	38
2.3. Определение биологических свойств штамма Lhv-97.....	38
2.3.1. Определение вида штамма Lhv-97 по ДНК-последовательности участка гена 16S рРНК.....	39
2.3.2. Биобезопасность штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97.....	40
2.4. Определение активности штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97 в	

	отношении патогенов человека и животных.....	41
	2.5. Исследование устойчивости антимикробной активности <i>B. mojavensis</i> Lhv-97 к различным факторам.....	42
	2.5.1. Термоустойчивость.....	42
	2.5.2. Устойчивость к протеолизу.....	42
	2.5.3. Влияние диализного разделения на метаболическую активность.....	42
	2.6. Выделение и определение состава действующего вещества штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97.....	43
	2.6.1. Экстракция БФ КЖ различными растворителями.....	43
	2.6.2. Разделение активных метаболитов штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97 методом обращенно-фазовой хроматографии низкого давления.....	43
	2.6.3. Разделение активных метаболитов штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97 методом обращенно-фазовой хроматографии высокого давления.....	44
	2.6.4. Разделение активных метаболитов <i>B. mojavensis</i> Lhv-97 методом эксклюзионной хроматографии низкого давления.....	44
	2.6.5. Определение чистоты и молекулярной массы активного компонента.....	44
	2.6.6. Газохроматографическое определение структуры активного компонента штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97.....	45
	2.7. Подбор состава питательных сред и эффективных условий культивирования в колбах.....	45
	2.8. Периодическое культивирование <i>B. mojavensis</i> Lhv-97 в ферментере с целью получения антимикробных метаболитов.....	46
	2.9. Методы получения прототипов биопрепаратов на основе штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97.....	47
	2.9.1. Получение сухого препарата на основе клеток штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97.....	47
	2.9.2. Получение альгинатных и хитозановых гранул и оценка их свойств.....	47
	2.9.3. Получение липосом на основе АМВ штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97.....	50
	2.10. Методика определения активности препарата на основе штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97 <i>in vivo</i>	51
ГЛАВА 3	ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	53
	3.1. Поиск нового штамма-антагониста, как потенциального продуцента антимикотических веществ.....	53
	3.1.1. Оценка антагонистических свойств микроорганизмов из коллекции ФРМ в отношении грибных патогенов.....	53
	3.1.2. Спектр активности штамма Lhv-97 в отношении грибных и бактериальных патогенов человека, животных и	

растений.....	56
3.1.3. Биологическая безопасность штамма Lhv-97.....	58
3.1.4. Заключение по разделу 3.1.....	59
3.2. Видоидентификация штамма Lhv-97.....	59
3.2.1. Культурально-морфологические и биохимические свойства штамма Lhv-97.....	59
3.2.2. Биофизический метод видоидентификации штамма Lhv-97.....	60
3.2.3. Генетический анализ участка гена 16S рРНК с целью видоидентификации штамма Lhv-97.....	60
3.2.4. Результаты видоидентификации.....	60
3.3. Подбор сред и условий культивирования штамма <i>V. mojavensis</i> Lhv-97.....	60
3.3.1. Подбор источников углерода и азота.....	61
3.3.2. Подбор температуры культивирования штамма <i>V. mojavensis</i> Lhv-97.....	62
3.3.3. Подбор концентрации дрожжевого экстракта.....	64
3.3.4. Изучение динамики продукции антифунгальных метаболитов в процессе ферментации.....	64
3.3.5. Заключение по разделу 3.3.....	65
3.4. Исследование стабильности антифунгальных метаболитов штамма <i>V. mojavensis</i> Lhv-97 под влиянием различных факторов.....	65
3.4.1. Термоустойчивость.....	65
3.4.2. Устойчивость к протеолизу.....	66
3.4.3. Определение размеров молекул активных метаболитов штамма <i>V. mojavensis</i> Lhv-97 методом диализа.....	66
3.4.4. Заключение по разделу 3.4.....	67
3.5. Очистка действующего вещества штамма <i>V. mojavensis</i> Lhv-97 и определение его химической структуры.....	67
3.5.1. Обращенно-фазовая хроматография низкого давления.....	67
3.5.2. Использование ВЭЖХ.....	70
3.5.3. Эксклюзионная хроматография.....	74
3.5.4. Определение чистоты и молекулярной массы выделенного антимикотического компонента штамма Lhv-97.....	75
3.5.5. Использование газовой хроматографии для определения состава антимикотического компонента штамма Lhv-97.....	77
3.5.6. Заключение по разделу 3.5.....	88
3.6. Исследование активности выделенного антимикотического вещества штамма <i>V. mojavensis</i> Lhv-97..	89
3.6.1. Определение минимальной подавляющей	

концентрации АМВ штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97.....	89
3.6.2. Сравнение активности АМВ штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97 с применяемыми в медицине препаратами.....	89
3.7. Создание прототипов биопрепаратов на основе штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97.....	91
3.7.1. Приготовление и испытания сухого препарата на основе клеток штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97 для защиты растений.....	93
3.7.2. Разработка инкапсулированных форм прототипа препарата на основе АМВ штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97.....	94
3.7.2.1. Разработка альгинатных и хитозановых гранул.....	95
3.7.2.2. Разработка липосомальной формы прототипа препарата на основе штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97.....	98
3.7.3. Заключение по разделу 3.7.....	102
3.8. Испытания препарата на основе АМВ штамма <i>B. mojavensis</i> Lhv-97 против кандидоза ротовой полости у мышей.....	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	105
ВЫВОДЫ.....	108
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	109
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ...	125
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	128
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	129
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	143

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ,
СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

АмВ	– амфотерицин В
АМВ	– антимикотическое вещество
БФ КЖ	– бесклеточный фильтрат культуральной жидкости
ВИЗР	– Всероссийский институт защиты растений
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ГНЦПМБ	– Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
ГРМ	– гидролизат рыбной муки
ГХ	– газовая хроматография
ДЭ	– дрожжевой экстракт
КБФ КЖ	– концентрат бесклеточного фильтрата культуральной жидкости
КГА	– картофельно-глюкозный агар
КЖ	– культуральная жидкость
КОЕ	– колониеобразующие единицы млрд/мл, млрд/г
ЛС	– лекарственное средство
МИК	– минимальная ингибирующая концентрация
м.к.	– микробные клетки
МПА	– мясопептонный агар
МС	– маннозидострептомицин
НИИСХ	– научно-исследовательский институт сельского хозяйства
НСР ₀₅	– наименьшая существенная разница при 5%-ном уровне значимости
ОП	– оптическая плотность
ПАВ	– поверхностно-активное вещество
РГАТУ	– Рязанский государственный агротехнологический университет им. П.А. Костычева
СЗР	– средства защиты растений

ТМС	–	триметилсилан, триметилсилильный(ные)
УФ	–	ультрафиолет, ультрафиолетовый
ФИТЦ		флуоресцеина изотиоцианат
ФРМ	–	фосфатрастворяющие микроорганизмы
pH	–	показатель активности ионов водорода, количественно отражающий кислотность среды
pO ₂	–	показатель парциального давления растворённого в среде кислорода

ВВЕДЕНИЕ

Работа выполнена в отделе биологических технологий ФБУН ГНЦ ПМБ в рамках отраслевых программ: «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (на 2011-2015 гг.) и «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» (на 2016-2020 гг.).

Актуальность проблемы

Рост распространенности микотических инфекций представляет собой серьезную проблему медицинского и научного характера. По оценкам экспертов микозами страдает 10-20% взрослого населения и до 50% людей в возрастной группе 70 и более лет [29]. Способствует этому ряд причин, таких как возрастание в популяции лиц с иммуносупрессией и иммунодефицитными состояниями, вызванных широким спектром заболеваний, таких как хронические бактериальные и вирусные инфекции, СПИД, а также атопическими состояниями и длительными стероидными терапиями. Также сыграло свою роль ухудшение экологической обстановки, материальных и социальных условий, что привело к росту фоновых соматических заболеваний, способствующих развитию микозов [99].

Остро стоит проблема устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам. Исходная устойчивость является, как правило, видовой характеристикой, или встречается у части штаммов вида, остальные штаммы которого чувствительны к препарату. Приобретенная устойчивость развивается во время лечения препаратом у штаммов изначально чувствительных к нему, и это является одной из основных причин неэффективности антимикотической терапии. Причиной приобретенной устойчивости являются мутации грибов, приводящие к появлению и отбору штаммов с необычно высокой минимально подавляющей концентрацией [8,78,131].

Кроме того, использование против микозов в обычных терапевтических дозах наиболее эффективных в настоящий момент препаратов, таких как амфотерицин В, кетоконазол (низорал), флуконазол и др., часто вызывает побочные эффекты в виде озноба, лихорадки, головной боли, тошноты, рвоты (особенно при первых приемах). Возможны также мышечные боли, судороги, падение артериального давления, кишечные кровотечения, загрудинные боли. Помимо общих желудочно-кишечных расстройств, установлено также токсическое действие имеющихся на рынке антимикотических препаратов на другие органы и системы. Это гепатотоксичность, которая характеризуется транзиторным повышением уровня трансаминаз и щелочной фосфатазы, миелотоксичность (в виде гемолиза, анемии и тромбоцитопении), нефротоксичность (развитие интерстициального нефрита, табулярного ацидоза и повышение уровня мочевины, остаточного азота и креатинина в сыворотке крови). Эти побочные эффекты требуют проведения профилактических мероприятий или даже отмены препарата, что часто делает лечение малоэффективным или не эффективным вообще [58].

Все это в совокупности делает необходимой дальнейшую разработку новых и безопасных средств борьбы с опасными микроорганизмами, и в частности, грибными патогенами, из которых наибольшее распространение получили дерматомицеты рода *Candida* [59,93,130].

Степень разработанности темы исследования

Разработка антимикотических препаратов активно ведется в последние десятилетия во многих странах. Тем не менее, распространенность грибных инфекций продолжает возрастать, и эта проблема требует дополнительных исследований и разработок. Биологическое разнообразие организмов остается еще мало использованным ресурсом, и одним из решений задачи разработки новых антимикотических средств является поиск и выделение продуцентов из природных ниш, отличающихся высокой конкуренцией в биоценозе. В этом ключе, все больший интерес представляют бактерии семейства *Bacillaceae*, способные синтезировать широкий спектр разнообразных соединений, в том

числе антибактериальных и антимикотических, и хорошо зарекомендовавшие себя как технологичные промышленные продуценты [1]. В практическом здравоохранении все шире находят применение препараты на основе живых культур бактерий и их метаболитов, которые способны контролировать болезни человека и животных. Помимо препаратов на основе нормофлоры (например, Бактисубтил, Бификол, Типалинекс), восстанавливающих нормобиоту кишечника и содержащих такие микроорганизмы, как *Bacillus cereus* sp. штамм IP 5832, *Lactobacillus acidophilus* и др., применяются такие средства как Коредон - биофармацевтический препарат на основе живой культуры *Bacillus subtilis* для лечения бактериальной, вирусной инфекции и иммунодефицитного состояния, Споробактерин – пробиотик на основе живой культуры *Bacillus subtilis* 534 [22].

В отделе биологических технологий ФБУН ГНЦПМБ накоплен опыт разработки антимикробных препаратов, и создана рабочая коллекция микроорганизмов, в том числе бацилл, выделенных из различных конкурентных экологических ниш, в том числе из бедных и эрозионных минеральных пород, ризосферной зоны растений, где особенно велика доля микроорганизмов-антагонистов [18]. Уже первичный скрининг активности таких микроорганизмов в отношении широкого спектра бактериальных и грибных патогенов показал перспективность селекции промышленно значимых продуцентов и создания препаратов с использованием факторов их активности [19,49,50].

Цель исследования - поиск новых бактериальных штаммов, обладающих выраженной антагонистической активностью в отношении наиболее распространенных возбудителей кандидозов, изучение их биологических свойств и природы антагонистической активности, а также разработка на их основе антимикотических биопрепаратов.

Задачи исследования:

1. Провести скрининг бактериальных штаммов-антагонистов из рабочей коллекции отдела биологических технологий ФБУН ГНЦ ПМБ на наличие антимикотической активности с целью отбора перспективного продуцента против грибных патогенов, в том числе дерматомицетов рода *Candida*.

2. Изучить культурально-морфологические и биохимические свойства, таксономическую принадлежность отобранного штамма. Проверить выбранный штамм на безопасность для теплокровных.

3. Исследовать влияние параметров культивирования выбранного штамма на его рост и биосинтез антимикотических соединений.

4. Выявить факторы, ответственные за антимикотическую активность выбранного штамма. Выделить и очистить активные метаболиты штамма, изучить их физико-химические, биологические свойства, провести исследования по определению их структуры.

5. Изучить эффективность прототипа биопрепарата против кандидоза на основе активных метаболитов в опытах на животных.

6. Разработать на основе живой культуры штамма-продуцента прототип биопрепарата и испытать его активность.

Научная новизна

Отобран новый бактериальный штамм, проявляющий высокую активность в отношении грибных патогенов человека и животных. Впервые показано, что культура *Bacillus mojavensis* синтезирует антимикробные вещества класса аминогликозидов. Впервые обнаружена продукция бактериями рода *Bacillus* аминогликозида с молекулярной массой свыше 600 Да. Показана эффективность использования препарата на основе антимикотического вещества штамма *B. mojavensis* для лечения кандидоза ротовой полости у мышей. Доказана эффективность использования антагонистических свойств *B. mojavensis* в отношении фитопатогенных грибов, в том числе возбудителя снежной плесени *Microdochium nivale*.

Практическая значимость и внедрение результатов

Отобран активный штамм Lhv-97 с антимикробными свойствами и депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов «ГКПМ - Оболенск» под номером В-8101 как *Bacillus mojavensis* (свидетельство о депонировании №45 от 26 июня 2017). Подана заявка о выдаче патента на штамм *B. mojavensis* (Федеральный уровень внедрения).

Оптимизирован биосинтез антимикотических соединений выбранным штаммом-продуцентом. Разработан способ выделения и очистки антимикотических метаболитов, позволяющий получить препарат со степенью очистки не менее 95 %. Разработан Лабораторный регламент ЛР 78095326-188-2017 на получение антимикотического комплекса АМВ-97. Показана возможность использования прототипа препарата на основе АМВ-97 против кандидоза ротовой полости.

Продуцент использован в разработке прототипа препарата на основе живой культуры. Результаты независимых полевых испытаний на пшенице в 2013 г. на базе Рязанского НИИСХ и в 2015 г. на базе РГАТУ им. П.А. Костычева экспериментальных образцов биопрепарата на основе штамма Lhv-97 в качестве альтернативы применению химических фунгицидов оформлены актами производственных испытаний, утвержденными руководителями указанных организаций (Межучрежденческий уровень внедрения).

Положения, выносимые на защиту:

1. Вновь выделенный штамм *Bacillus mojavensis* Lhv-97 способен подавлять широкий спектр грибных и бактериальных возбудителей болезней человека, животных и растений.

2. Культура штамма *Bacillus mojavensis* Lhv-97 синтезирует антимикробный компонент класса аминогликозидов с молекулярной массой свыше 600 Да.

3. Прототип препарата на основе антимикотического метаболита штамма *Bacillus mojavensis* Lhv-97 может быть использован для лечения кандидозов у животных.

4. Прототип препарата на основе живой культуры *Bacillus mojavensis* Lhv-97 может обеспечить повышение урожайности растительных культур в полевых условиях, а также защиту от фитопатогенов, в том числе от возбудителей снежной плесени.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на пяти российских и международных научных конференциях: Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVI Кашкинские чтения) (19 – 21 июня 2013 г., г. Санкт-Петербург); VI Всероссийском конгрессе по медицинской микологии (8-10 апреля 2014 г., г. Москва); VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора: «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины» (22-24 октября 2014 г., г. Ставрополь), на IX Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (13-15 марта 2017 г., г. Москва); 4 съезде микологов России (12-14 апреля 2017 г., г. Москва).

Публикации

Основное содержание работы представлено в 14 научных публикациях, включая 6 статей в реферируемых научных журналах (в том числе 2 в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки РФ и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени), 1 патента Российской Федерации на изобретение и 1 поданной заявки на патент Российской Федерации.

Объем и структура диссертации:

Диссертация изложена на 161 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 77 работ отечественных и 72 работы зарубежных авторов, и трех приложений. Работа иллюстрирована 40 рисунками и 11 таблицами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Микозы – заболевания, вызываемые грибными патогенами

Группа инфекций, вызываемых большим числом видов различных патогенных и условно-патогенных микромицетов называется микозами [5]. Микромицетами называют грибы и грибообразные организмы микроскопических размеров (термин употребляется исключительно для удобства микологов и не несет какой-либо систематической нагрузки). Количество микромицетов приблизительно оценивают в 1,5 млн видов. В настоящее время идентифицировано около 100 000 видов. Ежегодно описывают более 1500 видов. Спектр возбудителей микозов быстро расширяется. Уже известно более 500 видов грибов, вызывающих заболевания у человека. Из них более 100 видов микромицетов способны вызывать заболевания у иммунокомпетентных пациентов [27].

Оппортунистические (заболевания, вызванные преимущественно условно-патогенными возбудителями на фоне значительного снижения иммунитета) микозы являются серьезным осложнением, и самым опасным вариантом считаются инвазивные микозы, которые приводят к смертельным исходам в 0,7-23% случаев заболевания [136]. Чаще всего причинами данных заболеваний служат грибы родов *Candida* или *Aspergillus*, причем на долю первой группы приходится примерно 50-60% всех случаев инвазивных микозов, зарегистрированных при пересадке органов, по данным van Hal [145]. Стоит отметить, что данная частота возрастает до 62-88% после операций по пересадке печени [106]. Вид *Candida albicans* является причиной инвазивных кандидозов примерно в половине случаев, за ним по частоте случаев следуют виды *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. Грибы рода *Aspergillus*, в свою очередь, выявляются в 1-15% случаев микозов, связанных с трансплантацией органов и тканей, причем инвазивные аспиргиллезы характеризуются высокой смертностью – 65-92% [129].

1.1.1. Классификация представителей микромицетов, способных вызывать микозы

Существует несколько классификаций возбудителей микозов. Вызывающие заболевания у людей микромицеты разделяют по морфологическим признакам, степени патогенности, способности вызывать поражения различных органов и их систем.

По морфологическим признакам выделяют дрожжевых (*Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Blastoschizomyces* spp. и др.), мицелиальных (дерматомицеты, зигомицеты, гиалогифомицеты, феогифомицеты) и диморфных (*Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatidis* и др.) возбудителей микозов. Наиболее распространенными возбудителями микозов среди дрожжевых микромицетов являются представители *Candida* spp. Другие, например, *Cryptococcus* spp., актуальны для отдельных категорий иммунокомпromетированных больных или встречаются очень редко.

1.1.2. «Группы риска» при микозах

У иммунокомпromетированных больных дерматомикозы и другие виды микозов возникают значительно чаще, отличаются прогрессирующим или рецидивирующим течением, труднее поддаются лечению [27]. Основными группами иммунокомпromетированных больных являются:

- больные сахарным диабетом;
- ВИЧ-инфицированные;
- люди, перенесшие пересадку органов;
- онкологические больные;
- пациенты с хроническими заболеваниями, сопровождающимися развитием вторичных иммунодефицитных состояний;
- люди, которые длительно принимали антибиотики, оральные контрацептивы, глюкокортикоиды;
- люди, страдающие от ожирения и повышенной потливости [5].

1.1.3. Группы микозов

Грибковая инфекция может поражать кожу, слизистые оболочки, ногти, волосы, а в тяжелых случаях при глубоких иммунодефицитах – внутренние органы. Различают следующие группы микозов: онихомикозы (грибковое поражения ногтей); кератомикозы, (поражаются самые поверхностные участки рогового слоя и кутикула волос); дерматомикозы (микозы кожи и ее придатков, обусловленные дерматомицетами); отомикоз (поверхностное микотическое поражение наружного слухового канала); кандидоз; бластомикоз (тяжелое заболевание, вызываемое почкующимися аспорогенными дрожжеподобными грибами, с преимущественным поражением центральной нервной и дыхательной систем); гистоплазмоз (заболевание представляет собой глубокий микоз преимущественно ретикуло-эндотелиальной системы человека и некоторых животных); плесневые микозы (аспергиллезы, пенициллииозы и мукорозы); споротрихоз (заболевание регистрируется, в основном, во Франции и Северной Америке); редкие микозы (риноспоридиоз, хромомикоз) [9].

По результатам анализа на основе данных свидетельств о смерти в США с 1980 по 1997 год число смертей в результате грибковой инфекции увеличилось в 3,4 раза с 1,577 до 6,577, а смертность увеличилась с 0,7 до 2,4 на 100 000 человек. Принимая во внимание сложность диагностики микозов, многочисленные случаи грибковых инфекций не были должным образом диагностированы среди тех, кто неизлечимо болен, в связи с чем результаты, скорее всего, занижены. Было обнаружено, что уровень смертности от инвазивного микоза также высок и составляет 22,4% [116]. Согласно данным, представленным на Первом съезде микологов России, в 10% случаев микозы являются причиной смертности детей первого года жизни [7].

1.1.4. Существующие средства борьбы с микозами человека и животных и их классификация

Противогрибковые средства (антимикотики) — лекарственные средства, обладающие фунгицидным или фунгистатическим действием и применяемые для профилактики и лечения микозов [6].

В настоящее время на прилавках российских аптек представлено более 50 торговых наименований противогрибковых средств, производимых более чем 40 компаниями. Данные исследовательского агентства IMS Health1 позволяют считать рассматриваемый рынок препаратов динамично растущим (<http://www.pharmexec.com/ims-health-1>).

Лечение микозов может быть местным, системным и комбинированным. Местное лечение проводится при поверхностном ограниченном поражении кожных покровов без вовлечения в патологический процесс придатков кожи (волос, ногтей), а также пациентам, которым противопоказаны системные препараты. С целью повышения эффективности лечения системными препаратами, сокращения сроков лечения и профилактики рецидивов заболевания назначается комбинированная терапия [5].

Все антимикотики можно классифицировать:

- по способу использования на: средства наружного (местного) и системного (внутрь, внутривенно) применения;
- по характеру противомикробного действия: на специфические (подавляют жизнедеятельность только грибковой клетки) и неспецифические (активны против большинства микроорганизмов);
- по типу противогрибкового действия на: фунгицидные и фунгистатические, соответственно вызывающие гибель возбудителя микоза или препятствующие его размножению;
- по спектру противогрибковой активности - широкого (действуют на подавляющее число грибов) и узкого (действуют на определенные роды и виды грибов) спектра;
- по способу получения: на природные (полиеновые и неполиеновые антибиотики) и синтетические (химические) антимикотики [41];
- по основным показаниям к применению [70].

Также антимикотические вещества классифицируют по мишеням в клетке, на которые они воздействуют: на клеточную мембрану действуют полиены и

азолы, на клеточную стенку – эхинокандины, на синтез ДНК/РНК – фторпиримидины [8].

1.2. Противогрибковые химиопрепараты, применяемые в медицине

Антимикотики, или противогрибковые препараты, представляют собой обширный класс различных химических соединений природного происхождения и полученных в результате химического синтеза, обладающих специфической активностью против патогенных микромицетов. В зависимости от химического строения антимикотики подразделяются на несколько групп, различных по фармакокинетике и спектру активности [2].

1.2.1. Полиены

К полиенам относятся *нистатин*, *леворин*, *натамицин* и *амфотерицин В* (АмВ). Данные препараты в зависимости от концентрации оказывают как фунгистатическое, так и фунгицидное действие, при связывании препарата с эргостеролом грибковой мембраны, что приводит к ее разрушению и гибели клетки. Полиены характеризуются широким спектром противогрибкового действия: при системном применении к препаратам (*амфотерицин В*) чувствительны *Candida* spp. (среди *C. lusitaniae* встречаются устойчивые штаммы), *Aspergillus* spp. (*A. terreus* может быть устойчивым), *Cryptococcus neoformans*, возбудители мукомикоза (*Mucor* spp., *Rhizopus* spp. и др.), *S. schenckii*, возбудители эндемичных микозов (*B. dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*) и некоторые другие грибы. При местном применении препараты (нистатин, леворин, натамицин) действуют преимущественно на *Candida* spp. Полиены активны также в отношении некоторых простейших — трихомонад (натамицин), лейшманий и амеб. К полиенам устойчивы грибы-дерматомицеты и псевдоаллешерия (*P. boydii*) [9].

Недостатком данной группы антимикотических препаратов является высокая частота проявления аллергических реакций при их применении. Так, при применении АмВ дополнительно могут возникать нарушения функций печени, почек, возможно развитие сахарного диабета.

1.2.2. Азолы

Азолы – группа синтетических антимикотических препаратов, к которым относятся *флуконазол*, *кетоконазол*, *итраконазол*, *бифоназол*, *изоконазол*, *клотримазол*, *миконазол*, *оксиконазол* и *эконазол*. Данная группа обладает в основном фунгистатическим действием, ингибируя Р-450-зависимую 14 α -деметилазу, катализирующую превращение ланостерола в эргостерол — основной структурный компонент грибковой мембраны [103]. Азолы характеризуются широким спектром противогрибковой активности, они используются местно, активны преимущественно в отношении *Candida* spp., дерматомицетов (*Malassezia furfur*), действуют на ряд других грибов, вызывающих поверхностные микозы. К ним чувствительны также некоторые грамположительные кокки и коринебактерии. *Клотримазол* умеренно активен в отношении некоторых анаэробов (бактероиды, *G. vaginalis*) и трихомонад.

Препараты группы азолов обладают следующим списком нежелательных реакций: от жжения, зуда и отеков до аллергий, поражений желудочно-кишечного тракта, центральной нервной системы, поражений печени, нарушений в функционировании эндокринной системы [58].

1.2.3. Аллиламины

К данной группе синтетических антимикотиков относятся *тербинафин* и *нафтифин*, основными показаниями к их применению являются дерматомикозы. Аллиламины оказывают фунгицидное действие, связанное с нарушением синтеза эргостерола. Препараты обладают широким спектром противогрибковой активности: к ним чувствительны дерматомицеты (*Epidermophyton* spp., *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp.), *M. furfur*, кандиды, аспергиллы, гистоплазмы, бластомицеты, криптококк, споротрикс, возбудители хромомикоза. *Тербинафин* активен *in vitro* против ряда простейших.

Нежелательные реакции при приеме таких препаратов могут выражаться в зуде, жжении и сухости кожи, нарушениях работы желудочно-кишечного тракта, центральной нервной системы, может нарушаться работа печени вплоть до

развития печеночной недостаточности. Возможно развитие аллергических реакций [55].

1.2.4. Препараты разных групп

Одним из ранних природных антимикотических средств является *гризофульвин*, характеризующийся узким спектром своего действия. Продуцируется грибом рода *Penicillium* и применяется только при дерматомикозах, вызванных *Epidermophyton* spp., *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. Другие грибы к препарату устойчивы. Может оказывать нежелательное влияние на кожу, желудочно-кишечный тракт, нервную систему и печень [58].

Другим препаратом является *циклопирокс*, имеющий синтетическое происхождение, применяемый местно против *Candida* spp., различных дерматомицетов (*M. furfur*, *Cladosporium* spp.) и многих других грибов. Препарат также действует на некоторые грамположительные и грамотрицательные бактерии, микоплазмы и трихомонады, однако это не имеет практического значения. Может вызывать местные нежелательные реакции в виде жжения, зуда и раздражения [55].

1.3. Патологии животных, вызываемые микромицетами, и способы их лечения

Патологии животных, вызванные микроскопическими грибами, разнообразны, как и у человека. Их можно подразделить следующим образом:

- микозы, вызываемые патогенными грибами. Примеры: кандидомикоз, аспергиллез, стригущий лишай. К возбудителям дерматофитозов относят микроскопические грибы родов *Microsporum* и *Trichophyton*, заболевания могут передаваться человеку;

- микотоксикозы – заболевания животных, возникающие при употреблении животными кормов, пораженных грибами, производящими микотоксины в количествах, достаточных для проявления токсикоза у животных. Примеры: фузариотоксикоз, аспергиллотоксикоз, эрготизм;

- аллергии – атопические заболевания животных, как и человека, могут быть вызваны как спорами, вегетативной частью гриба, так и продуктами его метаболизма [25].

Микотоксикозы представляют собой отдельную большую проблему, острота которой в последнее время только возрастает [11,62]. Ветеринарной службой России постоянно регистрируются многочисленные отравления микотоксинами крупного рогатого скота и свиней, а также массовые хронические интоксикации поголовья сельскохозяйственной птицы [28].

Отравление микотоксинами вызывает поражение центральной нервной системы, пищеварительной, кроветворной и иммунной систем, подавление синтеза белка, нарушение воспроизводительной функции [40,43, 63,101]. При этом животные отказываются от пищи, что в конце концов приводит к смерти [67,96]. При постоянном потреблении кормов, содержащих микотоксины, у животных понижается иммунный статус, нарушается белковый обмен, поражаются почки и печень. У таких особей токсины обнаруживались в мясе, молоке, яйцах [98,117,119,138]. Интерес к изучению влияния микотоксинов на животных резко возрос после выявления их связи с заболеваниями животных: размягчение мозга у лошадей, отек легких у свиней и рак печени у крыс [118].

Зачастую в ветеринарии животных лечат только при легком течении заболевания микозами. Тяжелобольных лечить нецелесообразно, и их выбраковывают на убой. Так, животных не лечат при эпизоотическом лимфангите (хроническом микозе однокопытных животных, характеризующимся воспалением лимфатических сосудов кожи и подкожной клетчатки с образованием гнойных фокусов и язв) или бластомикозе (хроническом висцеральном микозе), характеризующимся пиогрануломатозными поражениями в различных тканях.

Профилактика микозов в ветеринарии сводится к комплексу мероприятий, при котором основное внимание направлено на организацию правильного содержания и полноценного кормления маточного поголовья и молодняка, стимуляцию их естественной резистентности, ликвидацию различных стрессовых воздействий [25]. Наряду с этим проводят специальные мероприятия,

направленные на недопущение и ликвидацию микозов в хозяйстве: дезинфекцию помещений и оборудования с использованием фунгиостатических препаратов, систематический контроль за качеством кормов и проведение периодических микологических исследований маточного поголовья и молодняка на носительство гриба рода *Candida*. В птицеводческих хозяйствах необходимо обеззараживать инкубационное яйцо с использованием фунгицидных средств. Проведение этих мероприятий приобретает особенно важное значение в тех случаях, когда возникает необходимость массового и длительного применения антибиотиков широкого спектра действия.

Наряду с такими средствами, как раствор сока чеснока, растворы йода или борной кислоты активно используют *леворин* или *нистатин* – антимикотики, оказывающие фунгиостатическое и фунгицидное действие на грибы рода *Candida*. Из других лекарственных средств (ЛС), которые назначают при кандидомикозах собак и кошек, известны: *миконазол*, *декамин*, *ундецин*, *нитрофунгин*, *фурагин*, *нистатин*, *леворин* и *АмВ*, *орунгал*, *монклавит* [25].

1.4. Борьба с патогенными грибами в растениеводстве

Микроскопические грибы наносят также большой вред сельскохозяйственным растениям, что может приводить даже к полной потере урожая [11,13,62]. Основные продовольственные культуры, такие как пшеница, кукуруза и ячмень, составляющие две трети мирового производства злаковых, наиболее подвержены заболеваниям, вызываемым фитопатогенными грибами [119]. Возбудителями фузариозов колоса и зерна пшеницы, а также початков кукурузы являются, в основном, грибы рода *Fusarium*: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* [24,82]. 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 [62].

Однако наибольшая вредоносность фузариозов обусловлена, как уже упоминалось выше, загрязнением зерна и сопутствующей продукции микотоксинами [95,111]. Свою ценность из-за загрязнения микотоксинами теряет

также солома и солома, которые не должны использоваться на корм скоту, поскольку микотоксины накапливаются не только в зерне, но и колосковых чешуях, стержнях колосьев и соломе [34,39].

Опасность микотоксинов для здоровья человека и животных признана во всем мире [68,94,118,144]. В разных странах имели место случаи массового острого отравления микотоксинами людей и животных, приведшие к смертельному исходу. Хроническая интоксикация микотоксинами также представляет серьезную опасность.

Одним из наиболее известных методов борьбы с фитопатогенными грибами является химический – то есть применение химических фунгицидов [53]. Однако, фунгицидов, способных достаточно эффективно защищать зерно от проникновения патогена, немного [11]. Усложняют эффективное использование фунгицидов постоянное и повсеместное распространение инфекции, растянутый период восприимчивости к ней растений, быстрое ее проникновение во внутренние ткани колоса; короткий период от обработки до уборки и использования урожая и другие факторы [114,137].

Кроме того, имеются сведения, что фунгициды в популяции фитопатогена уничтожают прежде всего его слабовирулентные типы, которые составляют конкуренцию высоковирулентным и/или более токсиногенным формам гриба. Также, использование фунгицидов, очевидно, приводит к накоплению в микробиоценозе пшеницы более вредоносных видов патогенов, поскольку под их воздействием в биоценозе подавляются чувствительные к фунгицидам микромицеты-сапротрофы, которые являются конкурентами возбудителей фузариозов [56].

Более того, данные о влиянии химических фунгицидов на содержание фузариотоксинов в урожае пшеницы противоречивы. Из-за ингибирования отдельными фунгицидами роста мицелия вредоносность гриба может не только не снижаться, но даже возрастать вследствие интенсификации токсинообразования [44,64,105]. По-видимому, при возникновении неблагоприятных условий существования гриб может усиливать выработку

токсичных вторичных метаболитов [73,97,121]. Очевидно, что не все химические фунгициды и не всегда повышают концентрацию микотоксинов в урожае, но возможность такого развития событий существует.

Поскольку применение химических фунгицидов против фитопатогенных грибов не всегда эффективно и далеко не всегда препятствует накоплению микотоксинов в урожае, уже более 40 лет разрабатывается стратегия использования для этой цели микроорганизмов [85]. Биологические препараты на основе природных микробов-антагонистов безопасны для растений, животных и человека. Они обладают специфичностью и высокой эффективностью, что позволяет избежать многих нежелательных последствий в биоценозах и снизить загрязнение окружающей среды [4].

Известные природные бактерии - антагонисты фитопатогенов в основном принадлежат родам *Bacillus* и *Pseudomonas* [35,61,126,147]. Перспективным считается использование в качестве агентов средств защиты растений (СЗР) прежде всего спорообразующих бактерий, то есть бацилл, из-за их большей адаптивности и стабильности [45,69]. В защите растений от болезней, вызываемых как грибами, так и бактериями, одними из главных действующих агентов являются антибиотики различной природы [36,113,143].

Кроме того, важной составляющей действия микроорганизмов на растения является повышение иммунитета [107]. Показана также способность некоторых видов бактерий подавлять синтез микотоксинов, однако механизм этого явления неясен [143].

Также было многократно показано, что некоторые микробы-антагонисты могут в значительной степени стимулировать рост и развитие растений, что повышает не только иммунитет их, но и урожай, улучшает его качество [102]. Такими свойствами обладают как грибные, так и бактериальные культуры [31,35,102].

1.5. Использование антимикотических веществ в пищевой промышленности

Микромицеты могут не только приводить к непосредственной порче продуктов питания в процессе их хранения, но и вызывать заражение продуктов

своими вторичными метаболитами – микотоксинами. Кроме грибов рода *Fusarium* активно продуцируют микотоксины также грибы родов *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *A. penicilliodes*, *A. oryzae*, *A. ustus*, *A. awamori*, *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. fischeri*, *A. niveoglaucus*, *Eurotium herbariorum* [37]. К настоящему моменту известно свыше 400 микотоксинов и более 200 видов микромицетов, их продуцирующих [60].

Для защиты продуктов питания также могут найти применение антимикотические препараты. Разработаны технологии обработки поверхности мясных продуктов специальными защитными препаратами, обеспечивающими надежную антимикотическую защиту поверхности различного рода колбас и мясных деликатесов в процессе производства, хранения, транспортировки и реализации. Применение антимикотических составов для ухода за твердыми сычужными сырами в период созревания, хранения, транспортировки позволяет полностью исключить трудоемкий процесс мойки поверхности сыров и предотвратить их зачистку перед упаковкой. Следовательно, использование средств антимикотической защиты позволяет не изменять традиционную технологию получения мясных и молочных продуктов питания и производить продукцию, отличающуюся экологической и санитарно-гигиенической доброкачественностью [32].

1.6. Недостатки существующих антифунгальных препаратов

Антимикотические препараты обладают своими недостатками, которые можно разделить на несколько направлений: ограничение спектра действия препарата, негативное влияние препарата на макроорганизм и формирующаяся устойчивость патогенного микроорганизма к лекарственному веществу.

Так, азолы, а одной стороны, продолжают оставаться наиболее развивающейся группой антимикотиков, и появление, в частности такого препарата, как *позаконазол*, открывает новые возможности терапии зигомикозов. Новые препараты (*микафунгин*, *анидулафунгин*) не имеют существенных преимуществ перед первым представителем этой группы – *каспофунгином*, в связи с чем вряд ли стоит рассматривать их как замену *каспофунгину* в случае его

неэффективности [9]. Применение полиенов же следует ограничить теми ситуациями, когда у клинициста действительно не имеется в распоряжении других препаратов, так как использование обычного АмВ небезопасно, а его липидные формы труднодоступны с финансовой точки зрения. Флуцитозин, несмотря на то, что одобрен для терапии рефрактерного кандидоза и криптококкоза, по всей видимости, в силу неприемлемого профиля переносимости должен оставаться только препаратом глубокого резерва для комбинированной терапии криптококкового менингита [8].

В дополнение к этому, наблюдается рост частоты выявления множественно лекарственно устойчивых штаммов патогенных грибов, которые быстро распространяются не только в пределах стационара, города или страны, но и по всему миру. Примерно такое распространение множественно резистентного к антимикотическим препаратам нового для США вида, вызывающего кандидоз – *C. auris*, описано в [139]. Впервые данный патоген был описан в 2009 г. в Японии [132], затем появились сообщения о *C. auris* в других странах, включая Колумбию, Индию, Израиль, Кению, Пакистан, Южную Африку, Южную Корею, Венесуэлу и Великобританию. К 2013 году появились случаи заражения *C. auris* на территории США [86,88,90,115].

1.7. Бактерии рода *Bacillus*

1.7.1. Проблемы классификации бацилл

В настоящее время род *Bacillus* включает в себя грамположительные прямые палочковидные бактерии, размеры которых варьируют в пределах 0,3-2,2,х1,2-7,0 мкм, большинство из них подвижны, с перитрихально расположенными жгутиками [149]. Способны образовывать не более одной эндоспоры, что не подавляется присутствием в среде кислорода. Бактерии рода *Bacillus* не нуждаются в факторах роста и способны ассимилировать минеральные формы азота. Метаболизм строго дыхательный, строго бродильный или дыхательный и бродильный одновременно в присутствии разных субстратов. Содержание GC-пар в ДНК типичных представителей данного рода варьирует от 32 до 62 мол.%. Типовой вид рода – *Bacillus subtilis* [30, 75].

На сегодняшний день внутри данного рода происходят активные переосмысления классификации. Много вопросов вызывают факты близкого генетического родства бацилл, значительно различающихся фенотипически. Так, например, первые эксперименты по ДНК-ДНК гибридизации бацилл показали ДНК-ДНК подобие на уровне одного вида для *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis*, классифицированных как самостоятельные таксоны на основании фенотипических признаков, значительная часть которых детерминирована плазмидными генами, и экологических особенностей штаммов. Филогенетические исследования 3 видов бацилл свидетельствуют о более чем 99 % гомологии их 16S рРНК. Сравнительный анализ геномов показывает сохранение набора общих генов (75–80 %) между видами, что, вероятно, связано с недавним расхождением от общей предковой формы [14].

Существуют исследования, описывающие разницу в видоидентификации одних и тех же штаммов различными способами, так авторы одной из подобных работ сравнивали результаты видоопределения с помощью биохимического API теста с результатами секвенирования бактериальной хромосомы [87]. В результате чего А.Boyd и соавторами был сделан вывод о фенотипической вариабельности штаммов лактобацилл, в связи с чем могут возникнуть серьезные ограничения в видоидентификации штаммов на основании фенотипических признаков. Авторы рекомендуют прибегать к молекулярно-генетическим методам идентификации, таким как секвенирование гена 16S рибосомальной РНК [87].

Однако, несмотря на распространенное применение методов молекулярной идентификации, многие штаммы рода *Bacillus* окончательно не могут быть идентифицированы до вида, в связи с чем авторы штаммов часто приводят в качестве характеристик физиолого-биохимические параметры штаммов [14].

1.7.2. Группы патогенности бацилл

К бактериям группы I относятся группа *B. subtilis* и некоторые другие, часто встречающиеся бациллы. Существуют трудности с разграничением *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis*, но обычно их можно различить по признаку синтеза ДНКазы, а также по способности сбраживать лактозу и ксилозу. У

B. amyloliquefaciens первый признак отсутствует, второй имеется, третий отсутствует, тогда как у *B. subtilis* характеристики противоположные [125]. Однако наиболее надежным способом различения этих таксонов является гибридизация ДНК. Вид *Bacillus megaterium* считается гетерогенным, но клетки *B. megaterium sensu stricto* обычно можно отличить по их крупным размерам. Клетки *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* и *B. mycoides* трудно отличимы друг от друга и их ДНК действительно обнаруживают высокую степень гомологии. *B. thuringiensis* можно распознать по наличию параспорального тела, а *B. mycoides* - по ризоидному росту.

Группа II представляет собой гетерогенное собрание видов. Для *Bacillus macerans* и *B. polymyxa* характерно выделение газа в процессе сбраживания сахаров, а штаммы *B. alvei*, как правило, образуют подвижные колонии. Распознавание *B. circulans* представляет определенные трудности, так как на основе данных по гомологии ДНК в пределах этого таксона различают по крайней мере 10 групп. Попытки решить эту проблему привели к созданию видов *B. pabuli*, *B. lautus*, *B. amylolyticus* и *B. validus* [120]. В эту группу включены патогенные для насекомых *B. larvae* (вызывает американский гнилец медоносной пчелы), *B. lentimorbus* и *B. popilliae* (вызывает молочную болезнь личинок жука-навозника), которые не выживают при последовательных пересевах в питательном бульоне и не содержат каталазы. Наконец, к этой группе относится гетерогенный таксон *B. stearothermophilus* включающий, по крайней мере, три таксона в ранге вида [133].

Для штаммов *группы III* характерна сферическая форма спор. Из бактерий этой группы наиболее распространенной является, вероятно, *B. sphaericus*, но опять-таки это название относят к бактериям, которые можно разделить по гомологии ДНК примерно на семь групп. Дифференцировать эти таксоны по фенотипическим признакам в настоящее время практически невозможно. Другие организмы, образующие сферические споры - это психрофилы [69].

1.7.3. Биосинтез бактериями рода *Bacillus* ферментов и липопептидов

Спорообразующие бактерии обладают активными протеолитическими

ферментами. Они разлагают сложные белковые соединения на аминокислоты, а затем и на более простые азотистые вещества и аммиак. Способность спорообразующих бактерий к энергичному разложению сложных органических соединений до простых продуктов распада стала основой для физиологической характеристики этой группы бактерий как активных аммонификаторов. В настоящее время различные виды бацилл используются человеком в разнообразных целях. Если затрагивать промышленное производство, то на основе данных микроорганизмов получают больше большое количество активных ферментов, необходимых для разных промышленных отраслей, пробиотических препаратов (более 25 наименований препаратов, производимых в России на 2007 год), используемых в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве, и антибиотиков [54].

Одну из важнейших групп индустриальных ферментов представляют *протеиназы* микроорганизмов, широко используемые в различных областях промышленности, медицины и молекулярной биологии [100,127]. Интересна способность протеиназ к синтезу олигопептидов, поскольку направленный ферментативный синтез пептидной связи имеет ряд преимуществ перед химическим синтезом. Бактерии *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* являются известными продуцентами сериновых протеаз, в частности, субтилизиноподобных протеиназ, имеющих практическую ценность. Гены некоторых из них клонированы и секвенированы [81,122,148]. Однако недостаточно исследованы тромболитические, антикоагулянтные, пептидсинтетические свойства, а также закономерности биосинтеза внеклеточных протеиназ этих бацилл.

Гидролазы, в частности *хитиназы* — это ферменты, катализирующие деградацию хитина, действующие наиболее часто как эндоферменты, отщепляя хитоолигосахариды длиной в 2 — 6 N-ацетилглюкозаминовых остатков. Хитиназы относятся к группе O-гликозидных гидролаз, разрушающих гликозидную связь между двумя или более углеводными остатками или между углеводным и неуглеводным компонентом. Такие гидролазы объединены в

семейства в зависимости от их аминокислотной последовательности. На данный момент известно 110 семейств этих ферментов [92].

Клеточная стенка грибов, содержащая хитин в качестве основного структурного компонента, может быть разрушена под действием *бактериальных хитиназ*. Последующие эксперименты с использованием очищенных хитиназ, хитиназ-негативных мутантов и хитиназ-позитивных трансформантов чётко продемонстрировали участие хитиназ в микелизе. К настоящему времени показано, что особенно чувствительными к действию бактериальных хитиназ являются концевые участки грибных гиф, так как именно в данных частях мицелия происходит синтез волокон хитина.

Тем не менее, фактическая роль бактериальных хитиназ в миколитическом процессе до конца не ясна. Было замечено, что механизм, благодаря которому осуществляется ингибирование роста грибов хитиназами, далеко не всегда осуществляется за счёт их хитинолитической активности. В этой связи примечательно, что бактериальные хитиназы, относящиеся к семейству 18, не обладают какой-либо антифунгальной активностью. Более того, не совсем понятно, различие ли в структуре или в ферментативной активности хитиназ связано с их потенциальной антифунгальной активностью. Кроме того, бактериям для осуществления лизиса грибного мицелия требуются и другие факторы. В результате многочисленных экспериментов *in vitro* было показано, что почвенные бактерии значительно различаются по своим миколитическим свойствам. De Воег с соавторами [92] предположили, что такой широкий спектр различий может быть объяснен участием в микелизе антибиотиков. Обычно бактерии продуцируют несколько типов *эндо-* и *экзохитиназ*. Roberts и Selitrennikov [128] установили, что *эндохитиназы* оказывают более сильное действие на рост мицелия, нежели *экзохитиназы*. Однако максимальный антифунгальный эффект достигался при действии комплекса, включающего как *эндо-*, так и *экзохитиназы*.

Многие штаммы рода *Bacillus Conh* известны как продуценты биологически активных *циклических липопептидов*. По химической структуре циклические липопептиды подразделяются на лактоны, в которых N-концевой

аминокислотный остаток пептидной цепи связан амидной связью с β -гидроксижирной кислотой, а карбоксильная группа С-концевой аминокислоты ковалентно замыкает кольцо взаимодействуя с β -гидроксильной группой, и лактамы, в которых N-концевой аминокислотный остаток пептидной цепи связан амидной связью с β -аминожирной кислотой, а С-конец пептидной цепи замкнут на β -аминогруппу жирнокислотного остатка. Большинство липопептидов, продуцируемых представителями рода *Bacillus*, проявляют резко выраженные антибиотические свойства. Так, *бацилломицины* показывают сильную антигрибную активность в отношении фитопатогенных грибов. Антигрибная активность липопептидов обусловлена выраженным взаимодействием с эргостерином, который в больших количествах содержится в липидной фракции грибных мембран, чем холестерин, присутствующий у других организмов. Мелентьевым с соавторами была продемонстрирована возможность подавления развития грибов-дерматофитов липопептидами *B. Conh* таких возбудителей дерматомикозов, как *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes var gypseum*, что открывает возможность создания новых лекарственных форм для лечения микозов [12,38,79].

Некоторые штаммы способны синтезировать одновременно несколько липопептидов, что расширяет спектр их биологического воздействия, поскольку активность индивидуальных липопептидов резко возрастает при совместном действии соединений, отличающихся по химической структуре. Поскольку липопептиды по своей природе амфифильны, то они являются мембранотропными веществами. Установлено, что, например, *сурфактины* вызывают разрушение протопластов *B. megaterium*, клеток микоплазм *Mycoplasma hyorhinis* и *M. orale*. Низкая цитотоксичность сурфактина по отношению к клеткам млекопитающих позволяет специфически инактивировать микоплазмы без существенного ущерба для метаболизма и пролиферации животных клеток. Сурфактин инактивирует инкапсулированные вирусы, такие как вирусы герпеса и ретровирусы гораздо эффективнее, чем вирусы, не имеющие липидной оболочки [48].

1.7.4. Антибиотики и бактериоцины бактерий рода *Bacillus*

Многие виды бацилл вырабатывают широкий спектр антибиотиков, в настоящее время известно больше 790 таких веществ [84]. Такое огромное количество найденных антибиотических веществ объясняется тем, что 4-5% генома у бацилл, в частности у *B. subtilis*, отвечают за антибиотический синтез [142]. Бациллярные антибиотики различны по своей химической структуре и спектру активности: против одного вида бактерий, против группы – грамотрицательных или грамположительных, противогрибковые и антипротозойные. Большая часть соединений относится к классу пептидов, но встречаются и штаммы, продуцирующие антибиотические соединения других химических классов. Так, штаммы *B. subtilis* производят *бацитрацин*, *субтилин* и др.; *B. brevis* – *тиротрицин*, *B. polymixa* (*B. aërosporus*) – *полимиксин* (*аэроспорин*). Из *B. mycoides*, *B. mesentericus* и *B. simplex* были выделены разнообразные соединения: *бациллин*, *колистатин* и др. [66,141]. По количеству продуцируемых антибиотических веществ микроорганизмы рода *Bacillus* уступают лишь актиномицетам [65].

Наиболее известными их продуцентами являются *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. polymyxa*, *B. circulans*, *B. laterosporus*, *B. cereus*, *B. brevis* и др. Некоторые вещества активно применяются в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, пищевой промышленности и др. В основном это – это *полимиксины*, *бацитрацин*, *тиротрициновый комплекс*, *грамцидин С*, *субтилин*, *эдеин*, *микробациллин* и др. В связи с токсичностью лишь часть из них допущена к применению на практике [16,54].

Вторую обширную группу антагонистически активных веществ составляют бактериоцины. Лее и др. описали *полифермитицин* как термолабильный, чувствительный к протеиназе К пептид, который продуцирует штамм *B. polyfermenticus* и ингибирует другие виды *Bacillus* [110]. Pinchuk с соавторами [124] выделили из штамма *B. subtilis* два бактерицидных вещества, отличающихся устойчивостью к нагреву, резистентных к протеазе и активных *in vitro* против *Helicobacter pylori* и других бактерий. В [109] описано открытие у *B. coagulans*

бактериоциноподобного пептида *коагулина*, синтез которого был связан с плазмидой. Коагулин стабилен к нагреву, чувствителен к протеазе и обладает бактериоцидным действием в отношении *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Listeria*, *Pediococcus* и *Enterococcus*. Коагулин охарактеризовали как 44-аминокислотный пептид с N-терминальной последовательностью.

Синтезируемые бактериями рода *Bacillus* антибиотики подразделяются на следующие классы:

- основные пептиды или группа *идеинов* (например, эдеин), подавляющие образование 30S-рибосомальных комплексов и ингибирующие синтез ДНК;

- циклические олигопептиды или группа *бацитрацинов* и родственных им антибиотиков (например, *бацитрацин*), подавляющие синтез клеточных стенок;

- линейные или циклические *олигопептиды*, нарушающие функции мембран: *грамицидин*, *тироцидин В*, или ингибирующие синтез РНК - например, *тиротрицин*;

- *аминогликозидные* антибиотики – формируют ковалентные связи с белками 30S-субъединиц рибосом бактерий, нарушая биосинтез белков. Первые аминогликозиды – *стрептомицин*, *канамицин* и *неомицин*. Самым известным аминогликозидом, продуцируемым бациллой, является *бутирозин*, который производится видом *Bacillus circulans* [123].

В последние годы было достоверно установлено, что *B. subtilis* продуцирует такие антибиотики, как *атерримин*, *aspergillus-фактор*, *бацилипин*, *бацилизин*, *бацилломиксин*, *бациллин*, *бульбиформин*, *глобицин*, *датемидин*, *дебариоцидин*, *истеидин*, *итурин*, *ксантелин*, *микосубтилин*, *микобацилин*, *неоцидин*, *обутин*, *петрин*, *полихлоросубтилин*, *ризобацидин*, *ризоктониа-фактор*, *субтилин*, *субтенолин*, *субтенолизин*, *субтилизин*, *субспорин*, *токсимицин*, *трипанотоксин*, *фунгистатин*, *фунгоцин*, *флювомицин*, *эндосубтилизин*, *эумицин*, *антибиотики 49-4, 6633, 26а, В-456, 3, бацилломицин* [16].

1.7.5. Аминогликозиды

Отдельно стоит отметить класс аминогликозидных антибиотиков в связи с активным ростом количества вновь синтезируемых антибактериальных и

антифунгальных веществ данной группы. Аминогликозиды образуют необратимые ковалентные связи с белками 30S-субъединицы бактериальных рибосом и нарушают биосинтез белков в рибосомах, вызывая разрыв потока генетической информации в клетке. *Гентамицин* также может воздействовать на синтез белка, нарушая функции 50S-субъединицы рибосомы.

Подавляющее большинство аминогликозидов производится с использованием актиномицетов. Основным промышленным продуцентом аминогликозидов подгруппы стрептомицина служит *Streptomyces globisporus streptomycini*. Из препаратов этой подгруппы на практике применяют *стрептомицин* и его производные: *стрептосульмицин*, *стрептомицина хлоркальциевый комплекс* и *дигидрострептомицин* [21].

Продуцентом *канамицина* служит *S. kanamyceticus*. В культуральной жидкости продуцента имеется три соединения - *канамицины А, В и С*, из которых наиболее важным является *канамицин А*, который принадлежит к группе олигосахаридов [80].

Самыми распространенными в современной медицинской практике являются аминогликозиды II и III поколений, синтезируемые химическим путем, применяются они в основном при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, часто эффективны против стафилококков. Аминогликозиды неактивны в отношении *Streptococcus pneumoniae*, *S. maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, анаэробов (*Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. и др.) [55].

Существуют публикации, описывающие антимикотическое действие аминогликозидов, причем, как вновь синтезируемых, так и существующих на рынке препаратов. Механизмы действия данных антибиотиков на эукариотические клетки грибов исследованы в меньшей степени, чем влияние на прокариоты [110]. Отмечено антибиотическое действие *амикацина*, *гентамицина*, *канамицина А и В*, *неомицина* и *рибостамицина* против грибов рода *Fusarium* и новых препаратов, созданных на основе *канамицина*: *JL22*, *JL38*, *JL39*, *JL40*, *NEOF004*, *NEOF005* [108].

Описан препарат класса аминогликозидов FG08, синтезированный на

основе *канамицина В*, обладающий лишь антифунгальной активностью, то есть, в отличие от самого *канамицина* не оказывающий влияния на бактериальные клетки. Его действие основано на увеличении проницаемости плазматических мембран грибов, нарушении обменных процессов по всей ее площади за счет взаимодействия со специфическими липидами в составе грибной мембраны [134]. Позднее, в 2014 году, было описано вещество *K20*, обладающее расширенным спектром антимикотического действия (активен против *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *F. graminearum*, *Puccini agraminis*), однако, по аналогии с *FG08* не обладает антимикробной активностью. Описан сходный с *FG08* механизм действия на основную мишень - плазматическую мембрану грибов [135].

Как уже описывалось, аминогликозиды, если учитывать природные соединения, синтезируются в основном представителями рода *Streptomyces*, однако, реже встречаются другие виды-продуценты, например, *Bacillus circulans*, производящий *бутирозины А* и *В*, являющиеся природными производными *ксилостазина* и *рибостамицина* [112].

1.8. Заключение по обзору литературы

Распространение патогенных грибов в настоящий момент является большой проблемой для медицины, ветеринарии и растениеводства в силу способности большинства грибов к образованию спор, и общей устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды. Существующие химические средства борьбы с патогенными грибами токсичны, не всегда эффективны и вызывают появление устойчивых видов. Поэтому поиск новых более безопасных и эффективных фунгицидов и антимикотиков является актуальной задачей.

Хорошо известно, что микроорганизмы способны подавлять рост грибов, патогенных для человека, а также животных и растений. Однако их потенциал в этой области далеко не исчерпан. Особенно перспективным для поиска новых противогрибных средств является использование бактерий рода *Bacillus*, которые по продукции антимикробных веществ уступают в настоящий момент лишь актиномицетам. Антибиотические вещества, полученные из бактерий, изучены

явно недостаточно. Поэтому задачей настоящего исследования являлся поиск новых штаммов-антагонистов патогенных грибов (в том числе возбудителей кандидозов) среди бактерий и разработка антимикотических препаратов на их основе.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1. Штаммы микроорганизмов

За основу для скрининга микроорганизмов на антагонистическую активность использовали коллекцию фосфатрастворяющих микроорганизмов (ФРМ), созданную в отделе биологических технологий ГНЦ ПМБ, состоящую из более, чем 700 изолятов [18].

Для оценки супрессивной активности микроорганизмов использовали культуры актуальных возбудителей микозов человека и животных - штаммы видов *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. inconspicua*, *C. krusei* и *Trichophyton rubrum*. Штаммы *Candida albicans* АТСС-90028 (номер в Российской коллекции патогенных грибов РКПГУ 1244/CBS-8837), *Candida parapsilosis* АТСС-22019 (номер в Российской коллекции патогенных грибов - РКПГУ 1245/CBS-604), *Trichophyton rubrum* (номер в Российской коллекции патогенных грибов РКПГФ 1408) были получены из НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. Также проверяли антимикотическую активность на шести штаммах грибов рода *Fusarium*: *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. proliferatum*, *F. graminearum*, полученных из ВИЗР (С.-Петербург) и двух штаммах *Microdochium nivale*: штамм 4995, полученный из музея ГосНИИ генетики и штамм, выделенный нами ранее из поражённых патогеном озимых зерновых посевов в Рязанской области.

Супрессивную активность микроорганизмов оценивали на грамположительных и грамотрицательных штаммах бактерий видов: *Acinetobacter baumannii*, *A. lwoffii*, *Bacillus coagulans*, *B. subtilis*, *Campilobacter jejuni*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Klebsiella pneumonia*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, *S. sonnei*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, полученных из коллекции Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии «ГКПМ- Оболенск».

2.2. Питательные среды для культивирования микроорганизмов

Бактериальные культуры микроорганизмов выращивали в течение суток при 37 °С на плотных средах: Muller-Hinton (Himedia, Индия), ГРМ- агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), (г/л): кислотный гидролизат рыбной муки – 20,0; глюкоза – 10,0; агар – 15; Мясо-пептонный агар (МПА) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), г/л: пептон сухой ферментативный– 10,0; экстракт мясной – 11; NaCl – 5; агар – 15, глюкоза, – 10,0; вода дистиллированная. Грибные культуры микроорганизмов выращивали 1-2 суток при 37 °С на картофельно-глюкозном агаре (КГА) и среде Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) [20].

В составе среды для культивирования *B. mojavensis* Lhv-97 использовали дрожжевой экстракт фирмы Хеликон (Франция).

2.3. Определение биологических свойств штамма Lhv-97

Культурально-морфологические свойства штамма Lhv-97 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».

Штамм Lhv-97 идентифицировали с помощью общепринятых микробиологических методов, биохимических тестов Enterotest, Nefermtest, API 50 CH и прилагаемых к ним каталогов/программ идентификации [30], а также с помощью MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Германия) и биологического анализатора Vitek-2 (Biomireux, France) с использованием кассет Vitek2 GP и Vitek2 ANC для видоидентификации грамположительных и сложнокультивируемых микроорганизмов, соответственно. Все манипуляции проводили согласно прилагаемой производителем инструкции.

Определение чувствительности штамма *B. mojavensis* Lhv-97 к антибиотикам проводили диско-диффузионным методом с использованием коммерческих дисков (Oxoid, Хемпшир, Великобритания) согласно методическим указаниям МУК 4.2. 1890-04.

2.3.1. Определение вида штамма Lhv-97 по ДНК-последовательности участка гена 16S рРНК

В последнее время видоидентификацию микроорганизмов принято проводить с использованием генотипирования изолятов по генетической последовательности гена 16S-субъединицы рибосомальной РНК, что связано с высокой консервативностью и специфичностью данного участка у разных видов [91].

Методом ПЦР со специфичными праймерами Modern 16s For (5'-agagtttgatcctggctcag-3') и Modern 16S Rev (5'-acggctaccttgtagact-3') производили наработку участка гена 16S РНК. В качестве матрицы для проведения ПЦР использовали клеточный термолизат штамма Lhv-97. Для его приготовления бактериологическую петлю ночной культуры суспендировали в 0,1 мл лизирующего раствора (0,25 % SDS; 0,05 М NaOH) до концентрации 10^8 - 10^9 КОЕ/мл в пробирках вместимостью 1,5 мл типа Eppendorf. Затем пробы прогревали при температуре 100 °С в твердотельном термостате, в пробирку добавляли 0,9 мл деионизованной воды, пробу центрифугировали при 19000 об./мин 2 мин, при температуре 4 °С. Супернатант отбирали в стерильную микропробирку и использовали 2 мкл в качестве матрицы для проведения ПЦР. Амплификацию ДНК проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5 мкл 10X Taq-буфера с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ThermoFisher Scientific, США); 2,0 мМ MgCl_2 ; 0,2 мМ каждого дНТФ (дезоксирибонуклеотид-трифосфаты: dNTP: dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 5 μM каждого праймера, 0,8 ед. смеси Taq- и Pfu-полимеразы (20:1). Реакцию ПЦР проводили при следующих условиях: начальная денатурация при температуре 94 °С в течение 3 мин; 30 циклов, состоящих из денатурации при температуре 94 °С в течение 30 с; отжига праймеров при температуре 55 °С в течение 30 с; элонгации при температуре 72 °С в течение 40 с; завершающая элонгация при температуре 72 °С в течение 10 мин. Далее проводили детекцию продукта амплификации с помощью гель-электрофореза в 1,5 % агарозном геле в трис-боратном буфере с pH=8,0 при напряжении 80-90 В. Образцы ПЦР-продуктов вносили объемом 30 мкл с добавлением красителя 6×Orange DNA

Loading Dye (ThermoFisher Scientific, США). Гель окрашивали раствором, содержащим 0,5 мкг/мл бромистого этидия, в течение 10 мин при активном покачивании и отмывали в дистиллированной воде в течение 10 мин также при активном покачивании на шейкере.

Для секвенирования последовательности ДНК штамма Lhv-97 ПЦР-продукт вырезали из агарозного геля стерильным скальпелем и помещали в стерильную пробирку. Для очистки продуктов амплификации использовали набор DNA Extraction Kit (ThermoFisher Scientific, США), все действия проводили согласно прилагаемой инструкции. Секвенирование ПЦР-продуктов осуществляли с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 kit (ThermoFisher Scientific, США), анализировали на автоматическом ДНК-секвенаторе ABI PRISM 3100-Avant в фирме SYNTOL (Москва). Компьютерный анализ последовательности ДНК проводили с помощью программы VectorNTI9 (Invitrogen, США). Идентификация гена производилась с помощью веб-ресурса BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.3.2. Биобезопасность штамма *Bacillus mojavensis* Lhv-97

Вирулентные свойства штамма *B. mojavensis* Lhv-97 определяли на двадцати одной беспородной белой мыши (самцы/самки, 20±1 г) из питомника лабораторных животных "Столбовая" (ФГБУН НЦБМТ ФМБА). Животные прошли адаптацию в виварии ГНЦ ПМБ в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Мыши содержались в стандартных условиях в соответствии с международными нормами и требованиями с ежедневным ветеринарным наблюдением, имели свободный доступ к воде и корму.

Для проверки штамма на вирулентность животные были разделены на 7 групп по 3 мыши. Заражение проводили подкожно в область верхней трети левого бедра по 0,2 мл бактериальной взвеси с концентрацией 10 ед. по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича, что соответствует 10^{10} м.к./мл коклюшных

бактерий. В течении 14 суток с момента заражения ежедневно проводили мониторинг здоровья зараженных животных.

2.4. Определение активности штамма *B. mojavensis* Lhv-97 в отношении патогенов человека и животных

Метод диффузии в агар (метод лунок). Тестирование антагонистической активности Lhv-97 проводили в чашках Петри на агаре, оптимальном для роста соответствующего патогена – МПА, КГА, среда Сабуро. Для этого наносили на застывший агар 0,1 мл суспензии патогена и растирали шпателем до полного впитывания. Концентрация суспензии тест культур патогенов соответствовала 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 бесклеточного фильтрата культуральной жидкости (БФ КЖ) культуры Lhv-97 или 0,1 мл концентрата бесклеточного фильтрата культуральной жидкости (КБФ КЖ) Lhv-97. Чашки инкубировали при 37°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 мкм. КБФ КЖ получали концентрированием БФ КЖ в 10-12 раз на вакуум-выпарной установке Laborota 4000 (Heidolph, Германия) при температуре 45 °C и вакууме 0,1 атм.

Активность действия КБФ КЖ против 18 клинических изолятов *Candida albicans* и *C. parapsilosis*, а также штаммов *C. albicans* ATCC-90028 и *C. parapsilosis* ATCC-22019 проверяли в сравнении с активностью флюконазола (ООО «Озон», г. Жигулевск, Россия) и аминогликозидов: амикацина (ОАО «Синтез», Курган), гентамицина (KRKA, Словения), канамицина (ОАО «Биохимик, Саранск), неомицина (ООО НПП «Агрофарм», Краснодар). Сравнение проводили методом лунок на чашках Петри с плотной средой Мюллер-Хинтон (п.2.1.), предназначенной для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Метод встречных культур. Для исследования готовили суспензию предполагаемого штамма-антагониста плотностью 10^8 КОЕ/мл, смывая клетки с бактериального газона стерильным раствором 0,9 % хлористого натрия. Суспензии патогенных грибов готовили, смывая газон ночной культуры с МПА+1 % глюкозы. По диаметральной линии чашки Петри с КГА и МПА сплошной чертой засеивали суспензию штамма-антагониста и перпендикулярно к этой линии, но немного не доходя до неё, засеивали штрихом суспензии грибных тест-культур. Чашки инкубировали при 37 °С и через сутки визуально оценивали наличие зоны подавления роста патогенов. Опыты проводили в трех повторностях. При использовании другого варианта этого метода 0,1 мл суспензии патогенов равномерно распределяли шпателем по чашке Петри с КГА или МПА до полного впитывания суспензии, затем микробиологической петлёй наносили небольшое количество испытуемого изолята. После инкубации визуально оценивали наличие зоны подавления роста патогенов.

2.5. Исследование устойчивости антимикробной активности *B. mojavensis* Lhv-97 к различным факторам

2.5.1. Термоустойчивость

Для исследования на термостабильность образцы БФ КЖ объемом 5 мл в пробирках прогревали в течение 5, 15 и 30 мин в сухожаровом шкафу при 60, 80, 100 °С. Затем проверяли уровень их антимикотической активности на тест-штаммах методом лунок (раздел 2.4.).

2.5.2. Устойчивость к протеолизу

Во флакон с 0,5 мл БФ КЖ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 вносили 5 мг трипсина, протеиназы К или 25 мг препарата «Панкреатин» и выдерживали в термостате при 37 °С в течение 4 ч. Далее проверяли антимикробную активность относительно контроля (исходного БФ КЖ) методом лунок (раздел 2.4.).

2.5.3. Влияние диализного разделения на метаболическую активность

Для выявления размера молекул активных метаболитов штамма *B. mojavensis* Lhv-97 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 штамма *B. mojavensis* Lhv-97 и погружали в трис-буфер. Для данного исследования использовали диализные мешочки фирмы Sigma с диаметрами пор 1 кДа, 2,5 кДа и 12 кДа. Процесс диализа проводили при температуре 8 °С с периодической сменой растворителя в течении 24 часов. По окончании диализа отбирали содержимое мешочков и определяли его антимикробную активность относительно контроля (БФ КЖ) методом лунок (раздел 2.4.).

2.6. Выделение и определение состава действующего вещества штамма *B. mojavensis* Lhv-97

2.6.1. Экстракция БФ КЖ различными растворителями

Использовали по 50 мл БФ КЖ для каждого варианта экстракции. Экстракция проводилась в делительной воронке объемом 100 мл трехкратно каждым растворителем. Граница раздела фаз была выделена в отдельную фракцию. Выпаривание фракций проводили на роторном испарителе (Laborota 4000 Heidolph, Германия) при температуре водной бани 45 °С. Оценку активности фаз проводили методом лунок (раздел 2.4.).

2.6.2. Разделение активных метаболитов штамма *B. mojavensis* Lhv-97 методом обращенно-фазовой хроматографии низкого давления

Для разделения и выделения компонентов фильтрата КЖ использовали подходы и методы аналитической хроматографии [3,17,23,57]. Для разделения компонентов концентрата КЖ методом хроматографии низкого давления фильтрат объемом 2,5 мл наносили на колонку ХК 16\40 Pharmacia Biotech, заполненную в качестве сорбента фенилсефарозой (6 Fast Flow (high sub), GE Healthcare, Швеция) в объеме 50 мл, обладающей гидрофобными свойствами. Элюирование проводили деионизированной водой и градиентным раствором ацетонитрила при температуре 4 °С со скоростью 1 мл/мин. Разделение компонентов КЖ проводили на хроматографе Bio-Rad BioLogic LP (Bio-Rad Laboratories, США). Фракции отбирали коллектором фракций LKB Bromma 2112 Redirac (США). Активность фракций проверяли методом лунок (раздел 2.4.).

2.6.3. Разделение активных метаболитов штамма *B. mojavensis* Lhv-97 методом обращенно-фазовой хроматографии высокого давления

Для разделения компонентов концентрата КЖ методом жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ) фильтрат объемом 4 мл наносили на колонку Phenomenex Jupiter C18, в качестве насоса использовали модуль ВЭЖХ Аквилон Стайер (Аквилон, Россия), в качестве детектора использовали УФ детектор Bio-Rad BioLogic LP (Bio-Rad Laboratories, США). Детектирование проводилось при длине волны 280 нм. Элюирование проводили деионизированной водой и градиентом ацетонитрила при комнатной температуре и скорости потока 10 мл/мин.

Колонка была подвергнута модификации путем промывки 10 объемами насыщенного раствора гидрокарбоната аммония. Фракции отбирали коллектором фракций LKB Bromma 2112 Redirac. Активность фракций проверяли методом лунок (раздел 2.4.).

2.6.4. Разделение активных метаболитов *B. mojavensis* Lhv-97 методом эксклюзионной хроматографии низкого давления

Для разделения компонентов предочищенного методом ВЭЖХ КБФ КЖ фильтрат объемом 2,5 мл наносили на колонку ХК 16/40 Pharmacia Biotech, заполненную в качестве сорбента sephadex G-10 объемом 50 мл. Элюирование проводили деионизированной водой при температуре 4 °С и скорости 1 мл/мин. Разделение компонентов проводили на хроматографе Bio-Rad BioLogic LP (Bio-Rad Laboratories, США). Фракции отбирали коллектором фракций LKB Bromma 2112 Redirac (США). Активность фракций проверяли методом лунок (раздел 2.4.).

2.6.5. Определение чистоты и молекулярной массы активного компонента

Для определения чистоты и молекулярной массы антимикробного вещества (АМВ), выделенного в результате ВЭЖХ и эксклюзионной хроматографии, образец анализировали на приборе высокого разрешения OrbiTrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Germany). Анализ проводили с прямым вводом образцов, при ионизации nanoESI (нано электрораспылением). Точность измерения масс выше 5 ppm.

2.6.6. Газохроматографическое определение структуры активного компонента штамма *B. mojavensis* Lhv-97

Для изучения структуры и состава АМВ использовали подходы и методики газовой хроматографии [72]. Для определения состава АМВ, выделенного в результате ВЭЖХ и эксклюзионной хроматографии, водные растворы АМВ с концентрацией 1-2 мг/мл предварительно гидролизовали кипячением в 0,6 М HCl в течение 3-х ч и высушивали в вакууме. Полученные остатки силанизировали смесью 150 мкл сухого пиридина и 150 мкл бис(N,O-триметилсилил)трифторацетамид (БСТФА) с примесью 1 % триметилхлорсилана (ТМС) (90 °С, 30 мин).

Для определения функциональных групп пробы обрабатывали другими реактивами: для определения наличия карбонильных групп образцы сушили и обрабатывали гидрохлоридом метоксиамин $\text{CH}_3\text{ONH}_2 \cdot \text{HCl}$ в пиридине при 90 °С; для определения карбоксильных групп – обрабатывали 15 %-ным раствором трехфтористого бора в метаноле при 70 °С 40 мин, а также сухим хлористым водородом в метаноле при 75 °С 30 мин; для определения соседних гидроксильных групп - обрабатывали ангидридом фенилборной кислоты в пиридине при 110 °С 20 мин; для определения восстановительных свойств - обрабатывали боргидридом натрия в воде с 10-кратный избытком по весу при комнатной температуре 1 ч; для определения наличия азотсодержащих групп – обрабатывали смесью уксусного ангидрида и пиридина в соотношении 2:3 при 90 °С 1 ч.

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. Пробу вводили с делением потока газа-носителя. Температурная программа: от 100 °С (1 мин) до 290 °С со скоростью 10 °С/мин.

2.7. Подбор состава питательных сред и эффективных условий культивирования в колбах

Подбор состава питательных сред и условий культивирования с целью получения биомассы и активных метаболитов проводили в колбах объемом 0,75 л

с 0,1 л среды на качалке IRC-1-U (Kuhner, США) с частотой вращения 180 об./мин при температуре 37 °С в течение 48 ч. В качестве посевного материала использовали суспензию суточной культуры *B. mojavensis* Lhv-97 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.

Оценку активности получаемой КЖ проводили методом диффузии в агар (раздел 2.4.).

2.8. Периодическое культивирование *B. mojavensis* Lhv-97 в ферментере с целью получения антимикробных метаболитов

Глубинное культивирование проводили в ферментёре Sartorius Biostat B plus с рабочим объёмом 8 л с использованием подобранной минеральной среды. Посевной материал для ферментера получали во встряхиваемых колбах объемом 0,75 л с 0,1 л среды. Для засева колб использовали бактериальную суспензию из расчета 1 чашка на 6 колб. Процесс выращивания культуры в ферментере вели при соблюдении следующих условий:

- температура культивирования (37±1) °С;
- непрерывная работа мешалки при скорости вращения 200-600 об/мин в зависимости от показателя рО₂ (не ниже 10 %);
- 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 МПА и определения антимикробной активности на чашках с плотной средой КГА и Сабуро на грибных патогенах методом лунок (раздел 2.4.).

Из контрольно-измерительных приборов использовали датчики рН и рО₂, 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).

2.9. Методы получения прототипов биопрепаратов на основе штамма *B. mojavensis* Lhv-97

2.9.1. Получение сухого препарата на основе клеток штамма *B. mojavensis* Lhv-97

Первые экспериментальные образцы биопрепаратов готовили из высушенных клеток штамма *B. mojavensis* Lhv-97. Клеточную массу выделяли из КЖ на центрифуге J2-21C (Beckman Coulter Instruments, США) при 7000 об./мин в течение 20 мин. Для полного отделения клеток штамма от фугата применяли стерильные фильтрующие системы Corning объемом 1 л (США) с порами диаметром 0,22 мм. 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.

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.

2.9.2. Получение альгинатных и хитозановых гранул на основе АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 и оценка их свойств

Приготовление объектов грануляции проводили растворением исследуемого антимикотического вещества (АМВ) во взвешивающей среде в виде жидкого концентрата, либо сухого вещества. В первом случае по 5 мл раствора АМВ смешивали с 10 мл 2 % раствора альгината натрия (Acros Organic, Бельгия). Во втором случае в альгинате указанной концентрации растворяли 200 мг навески АМВ. Дополнительно для увеличения растворимости вещества в альгинат вводили 0,1 % неионогенного поверхностно-активного вещества (ПАВ) TritonX-100 (Serva, Германия). Смеси альгината с АМВ заправляли в одноразовые шприцы объемом 10 мл и капали с высоты около 15 см через иглы с диаметром

отверстия 0,8 мм в 0,55 % раствор CaCl_2 . После 30 мин полимеризации образовавшиеся шарики вынимали из раствора, промывали дистиллированной водой, сливали воду и во флаконах помещали в холодильник. Часть гранул оставляли без изменений, другую часть покрывали хитозановой мембраной.

Для получения рабочего раствора 2 г хитозана пищевого кислоторастворимого (ООО «Биопрогресс», Московская обл., п. Биокомбината) вносили в 95 мл дистиллированной воды с 1 мл ледяной уксусной кислоты (Россия), смесь инкубировали при температуре 60 °С в течение 1 ч и затем фильтровали через плотную хлопчатобумажную ткань - бязь. В полученный раствор хитозана после коррекции рН до 6,0 с помощью 1 моль/л NaOH вносили альгинатные гранулы с АМВ (1,2 г/л) при перемешивании и выдерживали в течение 30 мин. Гранулы вынимали из раствора хитозана, промывали дистиллированной водой и собирали в стеклянные флаконы для последующего высушивания и анализа.

Получение микрокапсул с хитозаном проводили методом эмульгирования водного раствора АМВ в масле с последующим разделением фаз и сбором целевой фракции [146]. Для получения водной фазы в стакан с 20 мл водного раствора хитозана вносили с перемешиванием 5 мл раствора АМВ. Для получения масляной фазы в стакан с 1 мл Triton X-100 вносили 80 мл парафинового (вазелинового) масла (Тульский фармзавод, Россия) и перемешивали на магнитной мешалке при 50 °С до растворения ПАВ. Затем туда медленно вводили водный раствор исследуемого вещества с хитозаном и затем по каплям добавляли 25 мл раствора 2 %-ной лимонной кислоты в качестве сшивающего агента. Образовавшуюся эмульсию дополнительно гомогенизировали 5 мин при 900-1000 об./мин на смесителе пропеллерного типа «MLM» (Венгрия) с последующей экспозицией при температуре 40 °С и постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 1 ч. Далее гомогенизат заливали в делительную воронку, закрепленную на штативе, и оставляли при комнатной температуре на 3 дня. После полного расслоения фаз избыток масляной фазы (внизу) сливали, а эмульсию с микрогранулами декантировали и промывали гексаном при

центрифугировании со скоростью 5000 об./мин в течение 10 мин и заливали водой для последующего исследования.

Для лиофилизации флаконы с различными вариантами приготовленных гранул замораживали при температуре (-30) °С в течение 5 ч, помещали в камеру сублимационной установки Virtis ВТ-4К (США) и сушили в течение 20 ч. Для конвективного обезвоживания альгинатные гранулы раскладывали монослоем на чистую бязь на решетке сушилки «Суховой» (Россия), выдерживали при температуре 60 °С в течение 1,5-2 ч. Хитозановые микрогранулы высушивали в тех же условиях, за исключением того, что они помещались в стеклянные чашки, которые накрывали слоем ткани во избежание их уноса в силу малого размера. Сухие гранулы собирали в стерильные флаконы, которые закрывали резиновыми пробками, фиксировали металлическими колпачками и помещали для хранения в холодильник.

Для контроля выхода веществ из гранул во флаконы с различными вариантами сухих гранул, отличающихся наличием покрывающей мембраны из хитозана и способом обезвоживания, вносили по 5 мл стерильного физраствора и оставляли для обводнения на 20 мин. Затем из каждого флакона отбирали по 3-5 гранул (опытных и контрольных) и выкладывали их на свежесеянный газон культуры тест-штамма *Candida albicans* АТСС-90028. Такую же процедуру повторяли в течение месяца с периодичностью раз в сутки или раз в двое суток. Чашки с посевами инкубировали 20 ч при температуре 36 °С и учитывали величину зоны ингибирования тест-штамма.

Для контроля целостности гранул в жидкости содержимое каждого флакона выливали в стерильные стаканы диаметром 40 мм и подсчитывали распределившиеся монослоем количество гранул с измененной формой, соотнося их с числом частиц с интактной морфологией в процентном выражении по формуле: $K = (n_i/n_0) \times 100$, где K – коэффициент изменения формы, %; n_i – количество измененных гранул; n_0 - количество исходных гранул.

По полученным результатам строили графические зависимости разрушения гранул от времени нахождения гранул в жидкости и проявления у них антимикробной активности.

Размер альгинатных гранул определяли с помощью штангенциркуля, а размер хитозановых микрогранул - в препарате «раздавленная капля» под световым микроскопом, снабженным винтовым окулярным микрометром и объект-микрометром. Все опыты проводили в трех повторностях и в расчет принимали среднее значение трех измерений.

2.9.3. Получение липосом на основе АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97

Также для получения инкапсулированного препарата на основе АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 использовали липосомальную технологию по варианту регидратации липидной пленки с последующей экструзией через поликарбонатные микрофильтры с диаметром пор 200 нм [89]. Высушивание липидов в смеси с хлороформом либо дихлорметаном проводили на вакуум-выпарной установке Laborota 4000 (Heidolph, Германия) при комнатной температуре и скорости вращения ротора 60 об./мин, получая липидную пленку. Использовали следующие липиды: фосфатидилхолин (Lipoid, Германия), холестерол (Sigma-Aldrich, США) и пальмитоил-олеоилфосфатидилэтаноламин (Avanti Polar Lipids, США). Регидратацию липидов проводили с использованием фосфатно-солевого буферного раствора с нейтральным значением pH (Sigma-Aldrich, США) в смеси с раствором АМВ на термостатируемой качалке (платформа с круговым движением) с регулируемыми оборотами C25 KC (New Brunswick Scientific, США), получая грубую липосомальную суспензию. Эту суспензию липосомальных везикул экструдировали через поликарбонатные мембранные микрофильтры с номинальным размером пор 0,2 мкм (производства фирмы Watman по заказу фирмы Avanti Polar Lipids, США) на мини-экструдере (Avanti Polar Lipids, США) с прецизионными шприцами «Hamilton» ёмкостью 1 мл. Контроль физико-химических свойств полученных препаратов осуществляли при помощи светового микроскопа («Olympus BX41», США) и атомно-силового микроскопа SmartSPM (AIST-NT, Россия) (размеры и форма липосомальных

везикул), лазерного гранулометра MicroTec Plus (Fritsch, Германия) (распределение везикул по размерам в суспензии), гель-фильтрационной колонки 10x1 см с сорбентом Sephacryl S300HR (Sigma-Aldrich) и спектрофотометра UV-1601 («Shimadzu», Япония) (концентрация антимикробной субстанции, включение субстанции в липосомы).

Оценку антагонистической активности получаемых липосом проводили в отношении культуры *C. albicans* ATCC-90028 методом лунок (раздел 2.4). Биологическую активность определяли как для препарата в целом, так и для его фракций, полученных разделением на колонке с сорбентом Сефакрил S-300HR.

Для визуализации процесса включения АМВ в липосомы в состав АМВ вводили флуоресцентную метку в соответствии с [104]. С этой целью 1 мл раствора АМВ с концентрацией 1-2 мг/мл переводили в 0,1 М фосфатный буферный раствор (рН 8-9) и добавляли 0,1 мл 1% раствора флуоресцеина изотиоцианата (ФИТЦ) в динитрофеноле, перемешивали и оставляли при + 4 °С на ночь в темноте.

2.10. Методика определения активности препарата на основе штамма *B. mojavensis* Lhv-97 *in vivo*

Изучение специфической эффективности *in vivo* препарата на основе АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 проводили на мышинной модели кандидоза полости рта у мышей. В качестве модельных животных использовали мышей линии BALB/c (самцы/самки, 22-24 г) с индуцированным иммунодефицитом. Для снижения иммунитета за 1 сутки до заражения и через 1 сутки после заражения культурой *C. albicans* мышам вводили подкожно по 0,1 мл гидрокортизона (ОАО «Гедеон-Рихтер», Венгрия) в дозе 110 мг/кг [140]. Перед заражением опытных животных обездвиживали смесью рометара с золетилом (1:5) и укладывали на спину. Культуру *C. albicans* ATCC 90028 наносили на стерильную ватную турунду палочки для ушей и помещали в полость рта спящих мышей (рис. 1) из опытной и контрольной групп на 60 мин. Каждые 15 минут в течение часа на ватку наносили по 50 мкл культуры. В результате суммарный объем суспензии

C. albicans ATCC 90028, внесённый в полость рта животных составил 300 мкл (1×10^7 КОЕ/мышь).



Рисунок 1 – Нанесение культуры *C. albicans* ATCC 90028 на слизистую полости рта спящих мышей линии BALB/c

Через сутки после заражения мышам из лечебной группы давали препарат АМВ, внесенный в поилку с водой (20 мл) в концентрации 1 мг/мл. Мыши из контрольной группы препарат не получали. Количество выпитой мышами воды в обеих группах в течение 24 часов составило приблизительно 5 мл.

Через 24 часа после начала лечения животных из опытной и контрольной групп эвтаназировали методом CO₂-ингаляции. Мягкие ткани ротовой полости с прилегающими костями вырезали, взвешивали и растирали в фарфоровых ступках с добавлением стерильного кварцевого песка и физраствора (0,9%-й водный раствор хлорида натрия). Полученные гомогенизаты титровали в физрастворе методом последовательных 10-кратных разведений. Образцы взвесей высевали на агар Сабуро и инкубировали в течение суток при температуре 37 °С.

Количество клеток *C. albicans* ATCC 90028 в исследуемых образцах определяли расчётом числа колониеобразующих единиц на 1 г (КОЕ/г).

ГЛАВА 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Поиск нового штамма-антагониста как потенциального продуцента антимикотических веществ

Скрининг наиболее перспективного штамма-антагониста проводили на основе коллекции фосфатрастворяющих микроорганизмов (ФРМ), 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.). 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. Поэтому ФРМ должны являться, по нашему мнению, потенциальным объектом для поиска новых активных штаммов-антагонистов. В настоящее время три штамма из коллекции уже запатентованы как продуценты СЗР [49-51].

3.1.1. Оценка антагонистических свойств микроорганизмов из коллекции ФРМ в отношении грибных патогенов

Штаммы из коллекции ФРМ отдела биологических технологий ГНЦ ПМБ проверяли на наличие супрессивной активности в отношении грибов, патогенных для человека, животных и растений. Выборочные данные представлены на рисунке 2 и в таблице 1.

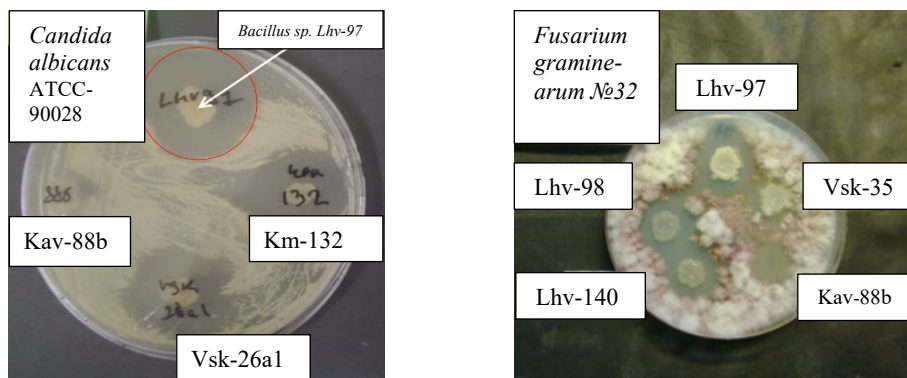


Рисунок 2 – Антагонистическая активность ФРМ в отношении *Candida albicans* ATCC-90028 и *Fusarium graminearum* 32

Таблица 1 - Антагонистическая активность ФРМ по отношению к грибным патогенам человека, животных и растений

№	Исследуемый штамм коллекции ФРМ	Антагонистическая активность по отношению к					
		<i>C. parapsilosis</i> ATCC-2019	<i>C. albicans</i> ATCC-90028	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. graminearum</i> №32	<i>F. culmorum</i> №23
1	<i>Acinetobacter sp.</i> Kav-305	0	0	+++	0	++	+++
2	<i>Bacillus sp.</i> Kav-88b	0	+	++	0	+++	++
3	<i>Pseudomonas sp.</i> Hor-7a	0	0	++	0	++	++
4	<i>Bacillus sp.</i> Km-132	++	+++	++	++++	+++	+++
5	<i>Bacillus sp.</i> Lhv-97	++++	++++	+++	++	+++	+++
6	<i>B. megaterium</i> Lhv-716	+	+	++	+	+++	+++
7	<i>B. megaterium</i> Lhv-98a	+	+	+++	++	+++	+++
8	<i>B. subtilis</i> Vsk-26a1	++	+++	+++	+	+++	+++
9	<i>Candida lambica</i> Lev-16	0	0	+	0	+	+
10	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Lhv-47b	0	0	+	0	+	+
11	<i>Bacillus cereus</i> Vsk-35	0	0	++	0	++	++
12	<i>Bacillus sp.</i> Lhv-125a	0	0	+	0	+	+
13	<i>Klebsiella sp.</i> Kav-171	0	0	+	+++	++	++
14	<i>Pantoea aglomerans</i> Kav-170	0	0	+	0	+	+
15	<i>Pseudomonas sp.</i> Krl-181a	0	0	++	+	+++	++
16	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> Vsk-26a3	+++	+++	++	+++	+++	++

На основании полученных данных в качестве перспективного продуцента был выбран изолят Lhv-97, как проявляющий самый высокий уровень

антагонизма к грибным патогенам человека и животных. На основании культурально—морфологических свойств изолят Lhv-97 был определен как *Bacillus sp.* (рисунок 3).

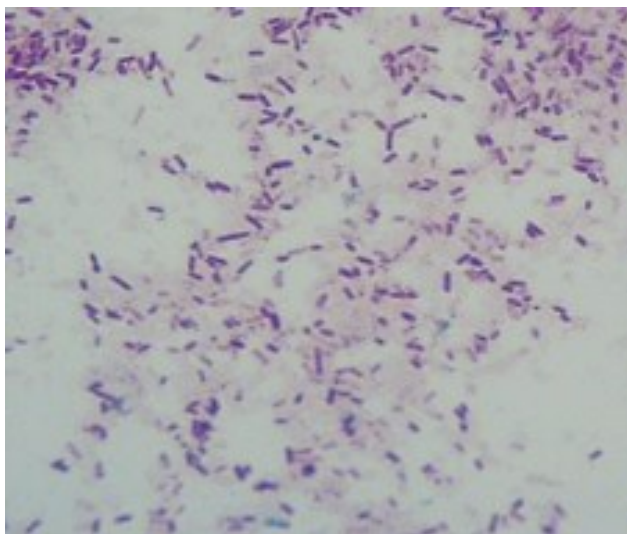


Рисунок 3 - Микроскопия: окраска по Граму клеток Lhv-97

В таблице 2 приведены данные по чувствительности штамма Lhv-97 к антибиотикам, принадлежащим к 14 различным классам.

Таблица 2 – Зоны подавления роста штамма Lhv-97 антибиотиками различных классов

№	Класс препарата	Антибиотик	Концентрация, мг/л	Зона подавления роста, мм
1	Пенициллины	Ампициллин	10	22
2	Цефалоспорины	Цефтриаксон	30	26
3	Карбапенемы	Имипенем	10	32
4	Монобактамы	Азтреонам	30	0
5	Фторхинолоны	Ципрофлоксацин	5	29
6	Гликопептиды	Ванкомицин	30	21
7	Аминогликозиды	Гентамицин	10	29
8	Аминогликозиды	Тобрамицин	10	26
9	Макролиды	Кларитромицин	15	24
10	Тетрациклины	Доксициклин	30	24
11	Оксазолидиноны	Линезолид	30	27
12	Амфениколы	Хлорамфеникол	30	20
13	Ансамицины	Рифампицин	5	19
14		Триметоприм	25	23

Как следует из данных таблицы 2, штамм Lhv-97 чувствителен ко всем исследовавшимся антибиотикам, кроме азтреонама, принадлежащего к классу монобактамов.

3.1.2. Спектр активности штамма Lhv-97 в отношении грибных и бактериальных патогенов человека, животных и растений

Штамм Lhv-97 был проверен на широком видовом спектре микроорганизмов: 27 штаммах грамположительных и грамотрицательных бактерий и 39 штаммах грибов (таблица 2). Было показано, что изучаемый штамм *Bacillus sp.* Lhv-97 проявлял значительную антимикробную активность (ширина зон задержки роста патогенов от 25 мм до 36 мм) против представителей видов *Erwinia cancerogena*, *Haemophilus influenzae*, *Micrococcus luteus*, *Morganella morganii*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimorium*, *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecalis*, но лучшие результаты были отмечены для представителей рода *Candida* – зона задержки роста патогенов составляла 25-43 мм (рисунок 4, таблица 3).

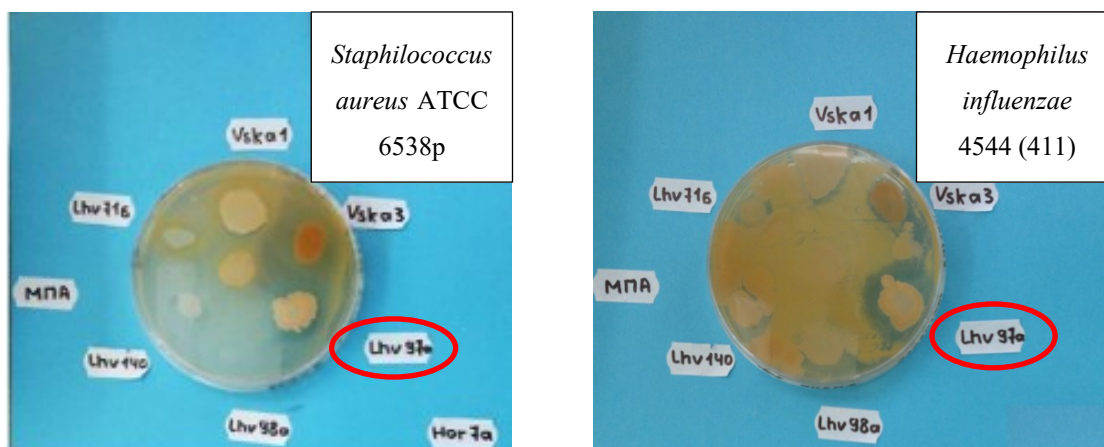


Рисунок 4 – Антагонистическая активность штамма Lhv-97 в отношении бактериальных патогенов

Таблица 3 - Активность штамма Lhv-97 в отношении бактериальных и грибных патогенов

№	Патоген	Ширина зон подавления клетками Lhv-97, мм
1	2	3
1	<i>Acinetobacter lwoffii</i> 5222	19
2	<i>Bacillus coagulans</i> E-69	21
3	<i>Bacillus subtilis</i> ИПМ-215	12*

Продолжение таблицы 3

1	2	3
4	<i>Citrobacter freundii</i> 4543	3
5	<i>Erwinia cancerogena</i> 1038	29
6	<i>Erwinia carotovora</i> 4966	20
7	<i>Erwinia herbicola</i>	11*
8	<i>Esherihia coli</i> ATCC 25922	9
9	<i>Esherihia coli</i> 2393	6
10	<i>Esherihia coli</i> 2613	9
11	<i>Haemophilus influenzae</i>	35
12	<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 25922	2*
13	<i>Micrococcus luteus</i> МГУ-4	25
14	<i>Morganella morganii</i> 6590	26
15	<i>Mycobacterium smegmatis</i> 5124	2*
16	<i>Salmonella enteritidis</i> 89	25
17	<i>Salmonella typhimurium</i> 7170	13
18	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100	25
19	<i>Serratia marcescens</i> 6498	6*
20	<i>Shigella dysenteriae</i> 4386	8*
21	<i>Shigella sonnei</i> 4385	19
22	<i>Staphilococcus aureus</i> 4508	15
23	<i>Staphilococcus aureus</i> ATCC 208P	17
24	<i>Staphilococcus aureus</i> ATCC 6538P	25
25	<i>Streptococcus faecalis</i> 149	29
26	<i>Yersinia enterocolitica</i> 39	11
27	<i>Xantomonas vasculorum</i> 958	9
28	<i>Candida. albicans</i> I	25
29	<i>Candida albicans</i> 2	32
30	<i>Candida albicans</i> 5	33
31	<i>Candida albicans</i> 9	28
32	<i>Candida albicans</i> 12	42
33	<i>Candida albicans</i> 18	37
34	<i>Candida albicans</i> 21	33
35	<i>Candida albicans</i> 23	32
36	<i>Candida albicans</i> 26	41
37	<i>Candida albicans</i> 32	39
38	<i>Candida albicans</i> 33	34
39	<i>Candida albicans</i> 37	27
40	<i>Candida albicans</i> 1721	43
41	<i>Candida albicans</i> 2945	43
42	<i>Candida albicans</i> ATCC-90028	35
43	<i>Candida albicans</i> K1	41
44	<i>Candida inconspicua</i>	29
45	<i>Candida krusei</i> Ck №1	31
46	<i>Candida krusei</i> Ck №2	0
47	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC-22019	26

Продолжение таблицы 3

1	2	3
48	<i>Trichophyton terrestre</i> AS-496	17
49	<i>Alternaria brassicicola</i> MF-P156011	3
50	<i>Alternaria solani</i> MF-P048011	6
51	<i>Alternaria tenuissima</i> MF-P127012	4
52	<i>Alternaria radicina</i> MF-P196011	5
53	<i>Botrytis cinerea</i> AS 542	10
54	<i>Botrytis cinerea</i> Б-912	8
55	<i>Fusarium culmorum</i> №23	13
56	<i>Fusarium moniliforme</i> №5	19
57	<i>Fusarium poae</i> 1	15
58	<i>Fusarium sporotrichioides</i> 1	9
59	<i>Fusarium proliferatum</i> 1	16
60	<i>Fusarium graminearum</i> 32	15
61	<i>Microdochium nivale</i> 4995	15
62	<i>Microdochium nivale</i> Ряз	13
63	<i>Penicillium commune</i>	3
64	<i>Penicillium morfensii</i> №26	3
65	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	9
66	<i>Stachibotrys sp.</i>	5*
Примечание – * – угнетение.		

Также проверяли антагонистическую активность действующего вещества, очищенного методом ВЭЖХ (см. ниже раздел 3.5.2), штамма Lhv-97 против дерматомицета *Trichophyton rubrum* РКПГФ 1408 в жидкой среде в связи с особенностью роста на твердых питательных средах данного вида гриба. Опыт показал, что при культивировании штамма *T. rubrum* РКПГФ 1408 (ферментативный пептон «НІМЕDІА») с добавлением действующего вещества штамма Lhv-97 в концентрации 10 мг/100 мл среды рост штамма *T. rubrum* РКПГФ 1408 не наблюдался.

3.1.3. Биологическая безопасность штамма Lhv-97

Методика проведения эксперимента для выяснения патогенности штамма описана в разделе 2.3.2. настоящей работы. Результаты показали, что все мыши, зараженные в дозах 1×10^{10} КОЕ, остались живы, не теряли в весе и не проявляли признаков интоксикации на протяжении всего срока наблюдения (14 суток). Поэтому был сделан вывод об авирулентности штамма Lhv-97 для теплокровных.

3.1.4. Заключение по разделу 3.1.

В результате скрининга коллекции микроорганизмов отдела биологических технологий ГНЦ ПМБ для дальнейшей работы был отобран авирулентный штамм *Bacillus* sp. Lhv-97, проявляющий антагонистическую активность против патогенных грибов рода *Candida*, *Trichophyton*, *Alternaria*, *Fusarium* и бактерий родов *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Escherichia coli*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Shigella* и др.

3.2. Видоидентификация штамма Lhv-97

Видоидентификация представителей рода *Bacillus* является сложной задачей. Определение вида штамма Lhv-97 в данном исследовании проводили, опираясь на культурально-морфологические, биохимические, биофизические и генетические методы идентификации, описанные в разделе 2.3.

3.2.1 Культурально-морфологические и биохимические свойства штамма Lhv-97

Штамм Lhv-97 представляет собой спорообразующие подвижные грамположительные палочки (рисунок 3). Споры овальные мелкие, наблюдаемые методом фазового контраста после 24-48 часов роста преимущественно на обедненных средах. Ночная культура штамма на плотной питательной среде при 37 °С растет в виде крупных круглых выпуклых слизистых колоний бежевого цвета с ровными краями. Хорошо растет на картофельно-глюкозном агаре, МПА, ГРМ-агаре, минеральных питательных средах (жидких), агаре Miller-Hinton, ферментативном пептоне, солянокислом гидролизате казеина при температурах от 20 до 57 °С. Оптимум роста для получения максимального выхода биомассы составляет 40 °С на плотных и жидких питательных средах.

Штамм утилизирует маннозу, арабинозу, рибозу, инозитол, сорбитол, целобиозу, мальтозу, трегалозу. Не утилизирует ксилозу, галактозу, сорбозу, рамнозу, дульцитол, мелибиозу, салицин. Не обладает уреазной активностью. Окситест положительный.

3.2.2. Биофизический метод видоидентификации штамма Lhv-97

Результатом масс-спектрометрического исследования с помощью MALDI-TOF Biotyper, описанного в разделе 2.3, явилась видоидентификация изученного штамма как *Bacillus mojavensis* с достоверным значением 2.13, и как *Bacillus subtilis* – 2,188, что с вероятностью 100 % позволяет определить только род.

3.2.3. Генетический анализ участка гена 16S рРНК с целью видоидентификации штамма Lhv-97

Генетический анализ проводили по методике, описанной в разделе 2.3.1. Согласно анализу базы данных GenBank с использованием инструмента BLAST – Basic Local Alignment Search Tool, полученная в результате секвенирования по Сенгеру нуклеотидная последовательность исследуемого гена штамма Lhv-97 на 100 % соответствовала нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК девятнадцати штаммов вида *Bacillus mojavensis* (номера доступа в базе данных GenBank: MF040286.1, MF040277.1, MF040275.1, MF040273.1, MF040269.1, MF040268.1, MF040262.1, MF040261.1, MF040260.1, MF040259.1, MF040258.1, MF040257.1, MF040254.1, MF040253.1, MF040252.1, KF811046.1, KF818638.1, KF054921.1, DQ993678.1).

3.2.4. Результаты видоидентификации

Таким образом, в результате комплекса из морфологических, биохимических, биофизического и генетического методов определения вида микроорганизма исследуемый штамм Lhv-97 был идентифицирован как *Bacillus mojavensis*.

3.3. Подбор сред и условий культивирования штамма *B. mojavensis* Lhv-97

Подбор сред для культивирования штамма *B. mojavensis* Lhv-97 проводили с целью увеличения выхода антимикотических метаболитов. Оценку результатов по количеству синтезируемых метаболитов, проявляющих антагонистическую активность против штамма *C. albicans* ATCC-90028, проводили методом диффузии в картофельный агар КЖ, полученной после выращивания штамма *B. mojavensis* Lhv-97 на экспериментальных жидких средах. В качестве контроля использовали КЖ штамма *B. mojavensis* Lhv-97, выращенную на картофельном

отваре. Подбор эффективного состава среды культивирования проводили в отношении источников основных макроэлементов – углерода и азота. После подбора состава питательной среды подобрали температурные условия культивирования штамма *B. mojavensis* Lhv-97.

3.3.1. Подбор источников углерода и азота

В первой серии экспериментов подбирали эффективные источники углерода при прочих одинаковых условиях. Проверили 6 источников углерода: глюкозу, глицерин, лактозу, сахарозу, мелассу и парафин в двух концентрациях (2,5 г/л и 5 г/л). В качестве источника азота и фосфора во всех случаях использовали $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ в концентрации 3 г/л. Результаты представлены в таблице 4. Лучшие показатели зон подавления роста штамма *C. albicans* ATCC- 90028 были отмечены на средах с добавлением 5 г/л глюкозы и мелассы (на одном уровне), в результате чего выбор был сделан в пользу глюкозы, как наиболее стандартизированного источника углерода.

Таблица 4 - Результаты подбора источника углерода

Состав среды	Диаметр зоны подавления роста, мм	
	<i>C. albicans</i> ATCC-90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC-22019
Контроль (картоф. отвар +5 г/л глюкозы)	25	19
глюкоза 0,25	31	27
глюкоза 0,5	19	26
сахароза 0,25	21	15
сахароза 0,5	19	15
лактоза 0,25	0	0
лактоза 0,5	0	0
меласса 0,25	15	15
меласса 0,5	33	27
глицерин 0,25	21	15
глицерин 0,5	23	15
парафин 0,25	0	0
парафин 0,5	0	0

Далее производили подбор эффективного источника азота. В качестве основных источников данного макроэлемента использовали гидролизат казеина, гидролизат рыбной муки, ферментативный пептон, хлорид аммония и

двузамещенный фосфат аммония. Культивирование проводили с учетом первой серии опытов, то есть с добавлением глюкозы в концентрации 5 г/л.

Концентрация атомарного азота в исследуемых азотсодержащих веществах соответствовала 3 г/л атомарного азота в составе фосфата аммония (таблица 5). В результате данного эксперимента лучшие результаты по величине зон подавления культуральной жидкостью были получены при выращивании штамма *B. mojavensis* Lhv-97 в присутствии двузамещенного фосфата аммония в качестве основного источника азота.

Таблица 5 - Результаты подбора источника азота

Состав среды	Диаметр зоны подавления роста, мм			
	<i>Candida albicans</i> ATCC-90028		<i>Candida parapsilosis</i> ATCC-22019	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
Ферментативный пептон, 3 г/л	23	25	23	25
ГРМ, 3,7 г/л	31	29	27	29
Казеин HiMedia, 2,3 г/л	27	25	21	21
(NH ₄) ₂ PO ₄ , 3 г/л	35	35	35	35
(NH ₄) ₂ PO ₄ , 6 г/л	0	0	0	0
Картофельный отвар	35	35	35	35

3.3.2. Подбор температуры культивирования штамма *B. mojavensis* Lhv-97

После того, как были подобраны источники макроэлементов и их концентрации, был проведен подбор температуры культивирования, позволяющей повысить выход антимикотических метаболитов. Штамм *B. mojavensis* Lhv-97 культивировали в жидкой питательной среде с добавлением глюкозы и двузамещенного фосфата аммония. Проверка температуры культивирования проходила в интервале от 15 до 60° С с интервалом в 5 °С. Данные по оптической плотности штамма *B. mojavensis* Lhv-97 представлены на рисунке 5. Пробы на анализ плотности культуры отбирали в начале культивирования, после 3, 5 и 24 ч культивирования. Наибольшая оптическая плотность отмечена в образцах, выращенных при 35° С и 40° С.

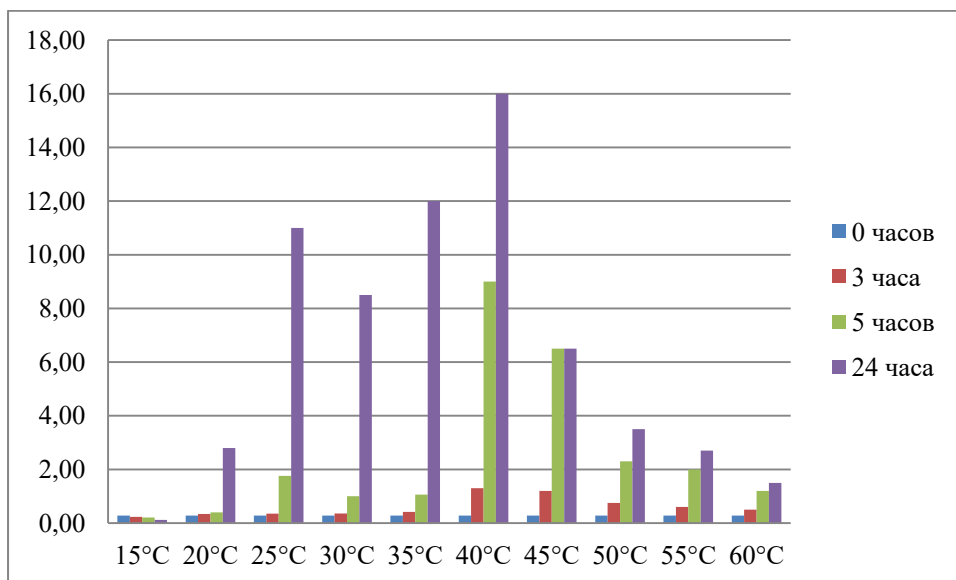


Рисунок 5 - Показатели оптической плотности КЖ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 в диапазоне температур от 15 до 60 °C при росте в течение суток

Опыт показал, что продукция антимикотических метаболитов начиналась при температуре 25° C и заканчивалась при 45° C (рисунок 6). Предпочтительным температурным интервалом для синтеза антимикотических компонентов является 35-40° C. В дальнейшем культивирование проводили при 37° C.

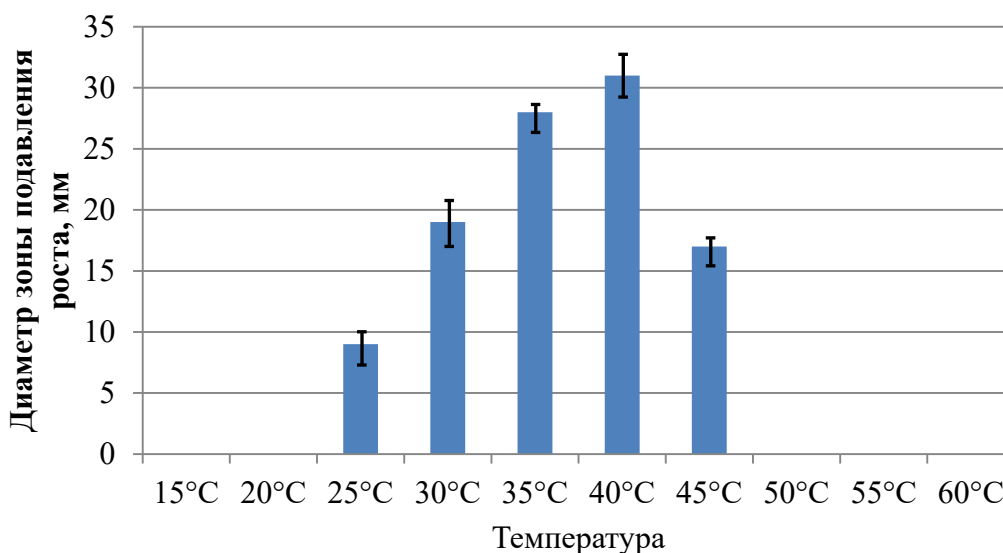


Рисунок 6 - Размеры зон подавления роста *C. albicans* ATCC-90028 КЖ, полученной культивированием штамма *B. mojavensis* Lhv-97 при разных температурах

3.3.3. Подбор концентрации дрожжевого экстракта

Дрожжевой экстракт (ДЭ) – это водорастворимая часть предварительно гидролизованных клеток *Saccharomyces cerevisiae*, богатая витаминами, аминокислотами и другими питательными веществами [52].

Подбор концентрации ДЭ проводили при 37° С на питательной среде с глюкозой, двузамещенным фосфатом аммония и тремя вариантами концентраций ДЭ: 0,5 г/л; 1 г/л; 1,5 г/л, как это представлено в таблице 6. При концентрации 1,5 г/л дрожжевого экстракта в питательной среде производство антифунгальных метаболитов штаммом *B. mojavenensis* Lhv-97 прекращалось. В качестве эффективной концентрации ДЭ в среде была выбрана концентрация 1 г/л.

Таблица 6 - Антифунгальная активность БФ КЖ *B. mojavenensis* Lhv-97 при выращивании на средах с разными концентрациями ДЭ

Концентрация дрожжевого экстракта, г/л	Зоны подавления роста <i>Candida albicans</i> ATCC-90028, мм	Зоны подавления роста <i>Candida parapsilosis</i> ATCC-22019, мм
0,5	25	21
1,0	29	27
1,5	0	0

3.3.4. Изучение динамики продукции антифунгальных метаболитов в процессе ферментации

Динамику продукции антимикотических метаболитов в процессе ферментации на среде подобранного состава при 37 °С изучали при отборе проб каждые 4 часа. Антимикотическая активность КЖ росла с первой пробы (4 часа), и наибольшее значение было отмечено через 12 ч роста, после чего активность равномерно снижалась к 24 ч роста (рисунок 7). По-видимому, синтез антифунгальных метаболитов на ранних стадиях развития культуры обусловлен необходимостью проявления антагонистических свойств в природе – в конкурентной борьбе за субстрат.

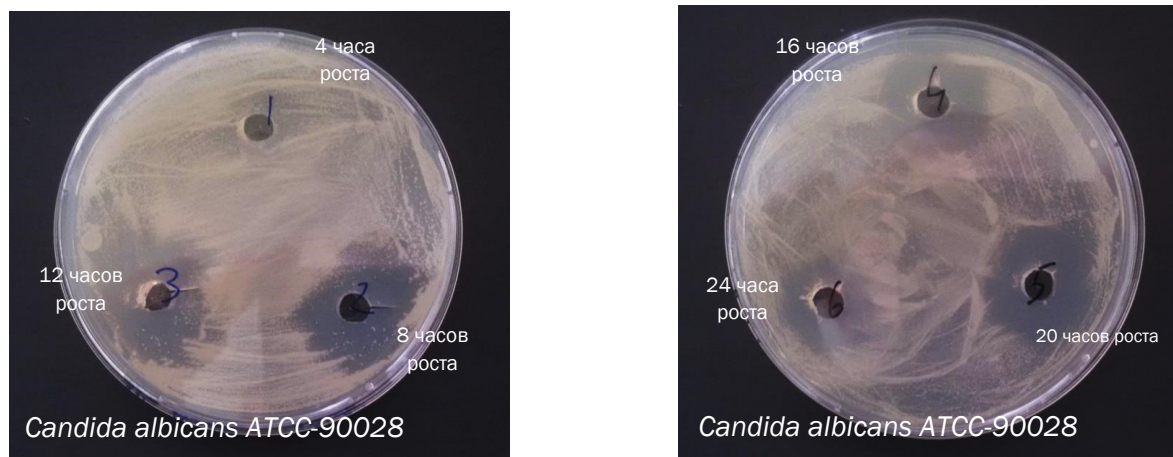


Рисунок 7 – Изменение антагонистической активности КЖ штамма *V. mojavensis* Lhv-97 в отношении *C. albicans* ATCC-90028 в процессе ферментации

3.3.5. Заключение по разделу 3.3

Проведен подбор эффективных условий культивирования штамма *V. mojavensis* Lhv-97 для максимального получения антимикотических метаболитов. Предпочтительными источниками углерода и азота, согласно экспериментальным данным, являются глюкоза и двузамещенный фосфат аммония. Был выбран температурный режим культивирования – при 37 °С и подобрана эффективная концентрация ДЭ – 1 г/л.

С соблюдением выше перечисленных условий культивирования штамма *V. mojavensis* Lhv-97 проводилась наработка КЖ в объеме 7,5 л для работ по дальнейшему изучению активности действующего вещества и его химической природы, как это описано в разделе 2.8. Разработан Лабораторный регламент ЛР 78095326-188-2017 на получение антимикотического комплекса АМВ-97 (приложение А).

3.4. Исследование стабильности антифунгальных метаболитов штамма *V. mojavensis* Lhv-97 под влиянием различных факторов

3.4.1. Термоустойчивость

Влияние устойчивости активных метаболитов к температурному фактору проверяли согласно методике, описанной в разделе 2.5.1 при температурах 60,80 и 100 °С в течение 5, 15 и 30 мин при каждой температуре. Активность метаболитов сохранялась до 100 °С включительно: диаметры зон подавления штаммов

C. albicans ATCC-90028 и *C. parapsilosis* ATCC-22019 составляли (29 ± 1) и (27 ± 1) мм, соответственно, при всех исследованных температурах.

3.4.2. Устойчивость к протеолизу

Активность антифунгальных метаболитов штамма *B. mojavensis* Lhv-97 после воздействия протеолитических ферментов, как это описано в разделе 2.5.2, сохранялась на уровне контроля, т.е. БФ КЖ, не подвергавшегося таковому воздействию (рисунок 8).

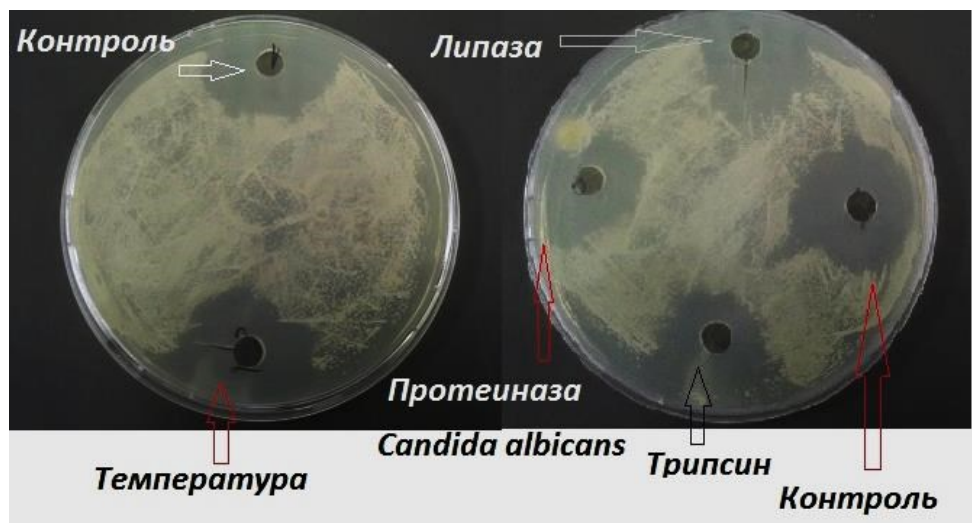


Рисунок 8 – Устойчивость антифунгальных метаболитов штамма *B. mojavensis* Lhv-97 под воздействием температуры ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 мин) и ферментов

3.4.3. Определение размеров молекул активных метаболитов штамма *B. mojavensis* Lhv-97 методом диализа

Разделение веществ БФ КЖ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 методом диализа описано в разделе 2.5.3. Содержимое диализных мешочков с диаметром пор 1, 2,5 и 12 кДа не проявляло антифунгальной активности на тест-штаммах, однако такую активность на уровне контроля показывал диализный буфер, то есть антифунгальные компоненты проходили через поры всех размеров использованных диализных мешков. В результате чего был сделан вывод о том, что размер антифунгальных метаболитов *B. mojavensis* Lhv-97 составляет менее 1 кДа.

3.4.4. Заключение по разделу 3.4

Проведено исследование устойчивости антифунгальных метаболитов к различным факторам. Показано, что вещества являются устойчивыми к воздействию температуры вплоть до 100 °С и протеолизу, полностью сохраняя активность. Определено, что размер веществ, обеспечивающих антимикотическую активность БФ КЖ штамма *B. mojavensis* Lhv-97, составляет менее 1 кДа.

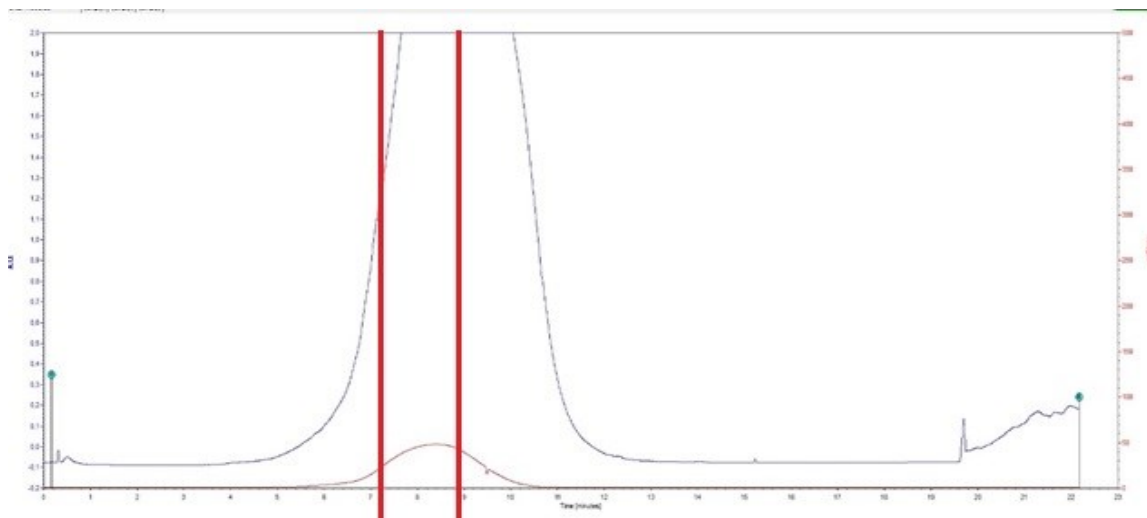
3.5. Очистка действующего вещества штамма *B. mojavensis* Lhv-97 и определение его химической структуры

Для выделения активных метаболитов с целью их дальнейшего разделения проводили их экстракцию из КЖ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 растворителями различной полярности, в том числе ацетоном, четыреххлористым углеродом, хлороформом, дихлорметаном, этилацетатом, этиловым, изобутиловым, изоамиловым и метиловым спиртами. Выделить антифунгальные метаболиты перечисленными выше растворителями не удалось, активность оставалась в водной фазе КБФ КЖ, из чего был сделан вывод о высокой гидрофильности антимикотических метаболитов.

3.5.1. Обращенно-фазовая хроматография низкого давления

Для разделения активных метаболитов КБФ КЖ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 был использован метод обращенно-фазовой хроматографии низкого давления с использованием деионизированной воды в качестве элюента, как это описано в разделе 2.6.2. Хроматограмма данного процесса отображена на рисунке 9, на котором виден пик выделения гидрофильных веществ из КБФ КЖ в период с 4 по 13 минуту процесса. Все фракции отбирались с начала процесса хроматографии до его конца коллектором фракций каждые 30 сек. В результате проверки методом лунок (раздел 2.4) антимикотическая активность была выявлена у проб, отобранных только с 7 по 9 минуту включительно. Размер зон подавления контрольных штаммов *C. albicans* ATCC-90028 и *C. parapsilosis* ATCC-22019 составлял от 21 до 29 мм. Таким образом, первые опыты с использованием деионизированной воды в качестве элюента показали недостаточную

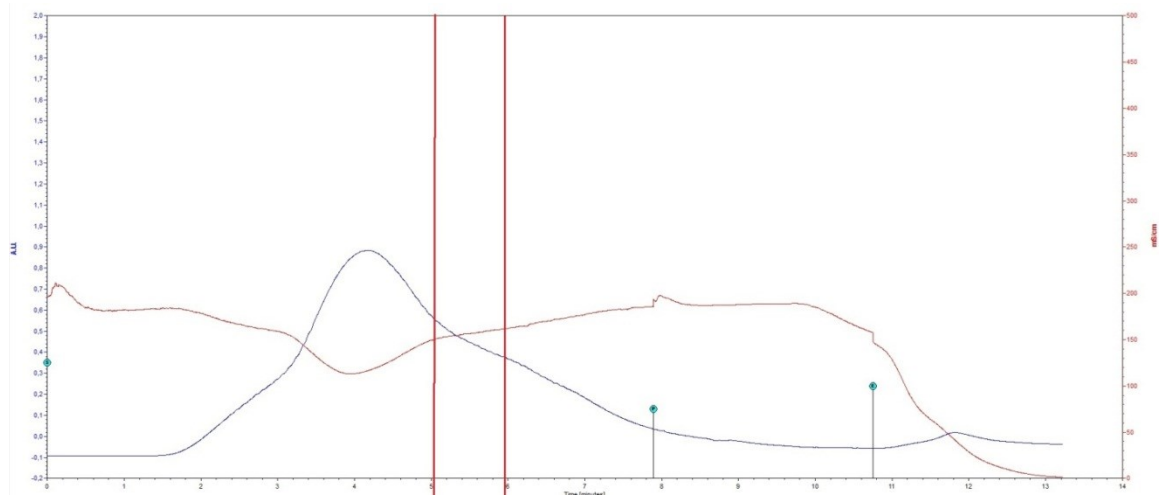
эффективность очистки и необходимость в дальнейшем усовершенствовании методики.



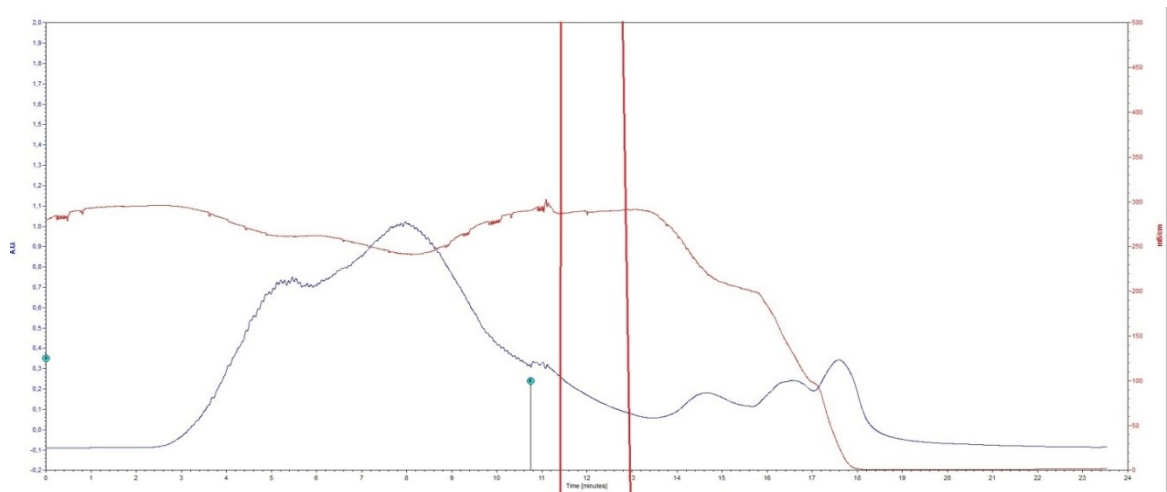
Здесь и ниже синяя линия – уровень поглощения при 280 нм, красная линия – кондуктивность, вертикальные красные линии показывают выход активной фракции

Рисунок 9 – Хроматограмма КБФ КЖ, полученная с использованием деионизованной воды в качестве элюента

Далее была проведена работа по определению оптимальной концентрации сульфата аммония в элюенте, позволяющей добиться минимального количества органических примесей в активной фракции. Концентрацию соли увеличивали с шагом 20% и контролировали влияние этого фактора на очистку. Полученные данные показали, что увеличение концентрации вплоть до 60% оказывает значительное влияние на разрешающую способность колонки, что видно по увеличению свободного объема между пиками на хроматограммах, приведенных на рисунке 10а и 10б. То есть увеличение концентрации сульфата аммония приводило к снижению количества органических примесей в активной фракции.



а



б

а) 40% сульфата аммония в элюенте; б) 60% сульфата аммония в элюенте

Рисунок 10 – Хроматограммы КБФ КЖ, показывающие влияние концентрации сульфата аммония в элюенте на содержание органических примесей в активной фракции,

После подбора концентрации сульфата аммония в элюенте провели опыты по подбору температуры процесса. Температуру понижали от 20 °С до 5 °С с интервалом в 5 °С. Влияние температуры контролировали по форме хроматограммы. Было выявлено, что снижение температуры до 5 °С оказывает положительное влияние на разрешающую способность колонки, и как следствие, на чистоту активной фракции, что видно из более острой формы хроматографических пиков на рисунке 11.

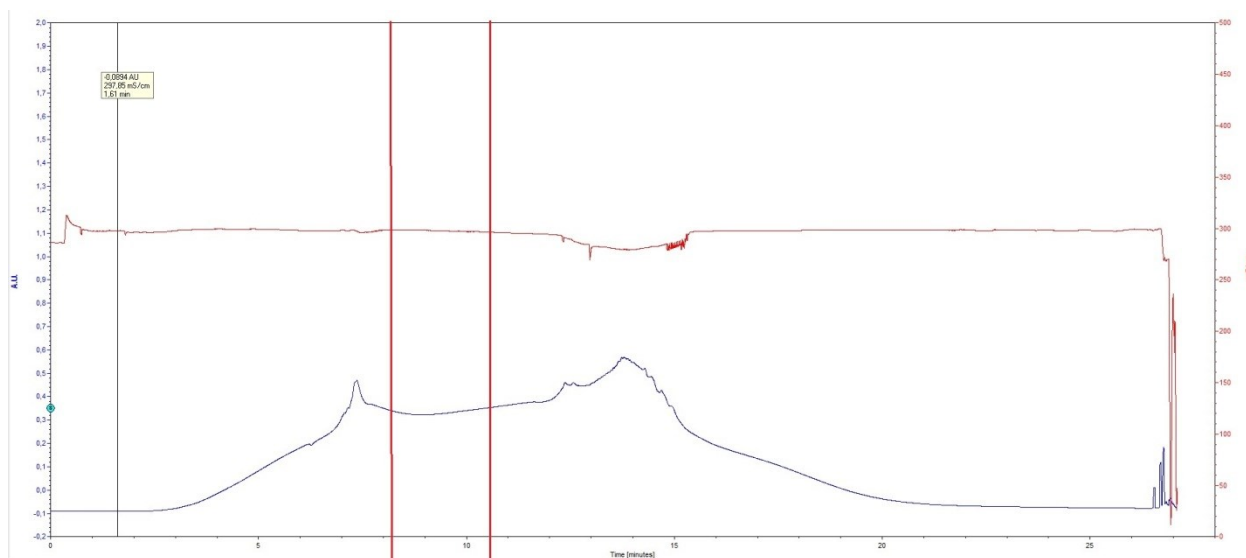


Рисунок 11 - Хроматография КБФ КЖ при температуре 5 °С

Изменение pH с 5 до 13 в рабочем диапазоне сорбента не оказало влияния на разделение компонентов КБФ КЖ штамма *B. tojavensis* Lhv-97.

В целом, очистка и разделение метаболитов методом обращенно-фазовой хроматографии низкого давления не дали удовлетворительных результатов при добавлении высокой концентрации сульфата аммония в КБФ КЖ. Поэтому была предпринята попытка использовать обращенно-фазовую ВЭЖХ и эксклюзионную хроматографию низкого давления.

3.5.2. Использование ВЭЖХ

Для разделения активных метаболитов использовали метод ВЭЖХ, как это описано в разделе 2.6.3. Для выявления антифунгальной активности фракций, разделенных с помощью ВЭЖХ, применяли метод лунок (раздел 2.4). К моменту использования ВЭЖХ была поставлена задача снизить до минимума концентрацию солей в активной фракции. В первой серии опытов в качестве элюента использовали деионизированную воду и ацетонитрил. Разделение веществ и их очистку контролировали по форме хроматограммы, представленной на рисунке 12.

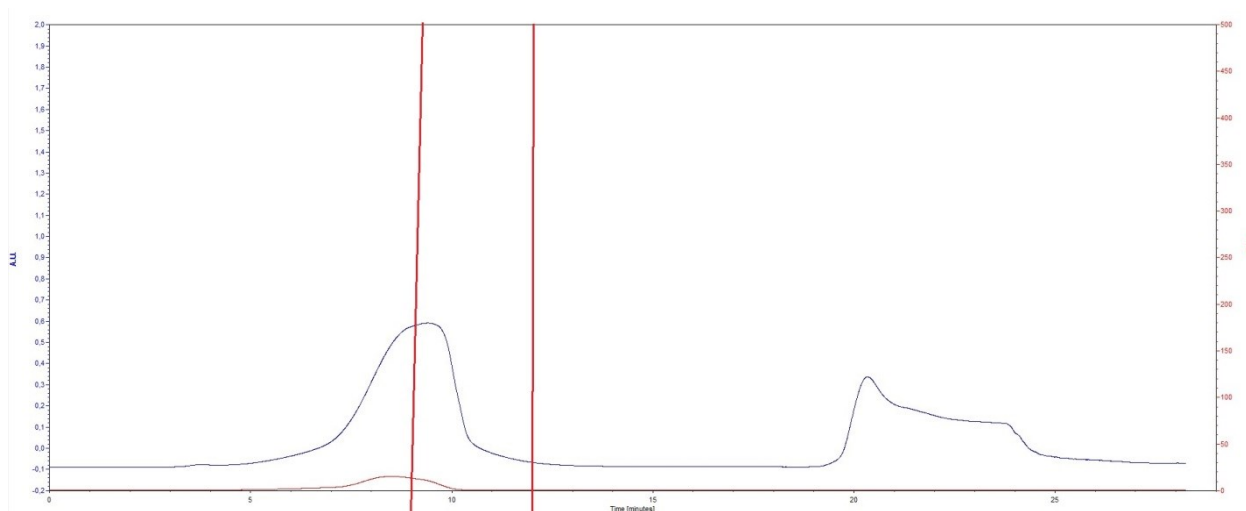


Рисунок 12 - Хроматограмма, показывающая разделение веществ КБФ КЖ методом ВЭЖХ с использованием деионизованной воды и ацетонитрила в качестве элюентов

Выход активной фракции был зафиксирован с 9 по 12 минуту. Для снижения количества органических примесей использовали метод предварительного осаждения белков этанолом, что не принесло заметного результата по снижению количества примесей в активной фракции.

Для повышения разрешающей способности колонки использовали раствор сульфата аммония в различных концентрациях (20%, 40%, 60%). Наилучший результат был зафиксирован при хроматографии с 40% сульфатом аммония, что отражено на рисунке 13. Использование соли в высоких концентрациях позволило добиться приемлемых уровней очистки активной фракции от органических примесей, однако, это не способствовало решению задачи по очистке активной фракции от солей.

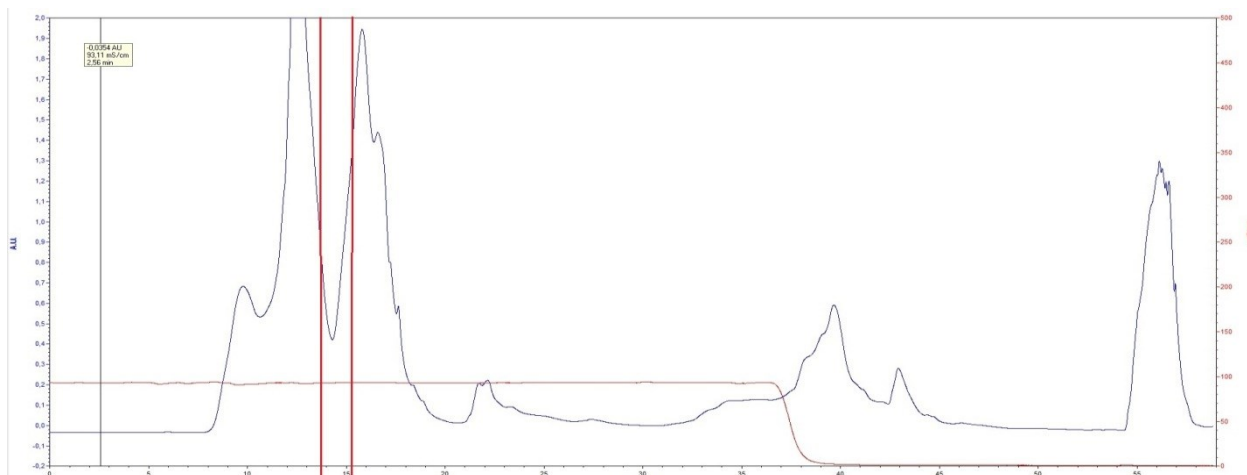


Рисунок 13 – Хроматограмма, полученная при ВЭЖХ БКФ КЖ с добавлением 40% сульфата аммония

Используя данные о термостабильности действующего вещества, было принято решение использовать в качестве элюента насыщенный раствор гидрокарбоната аммония с последующим разложением этой соли при нагревании. Это позволило добиться идентичного по качеству разделения метаболитов, по сравнению с использованием сульфата аммония, что отражено четкими пиками на хроматограмме (рисунок 14).

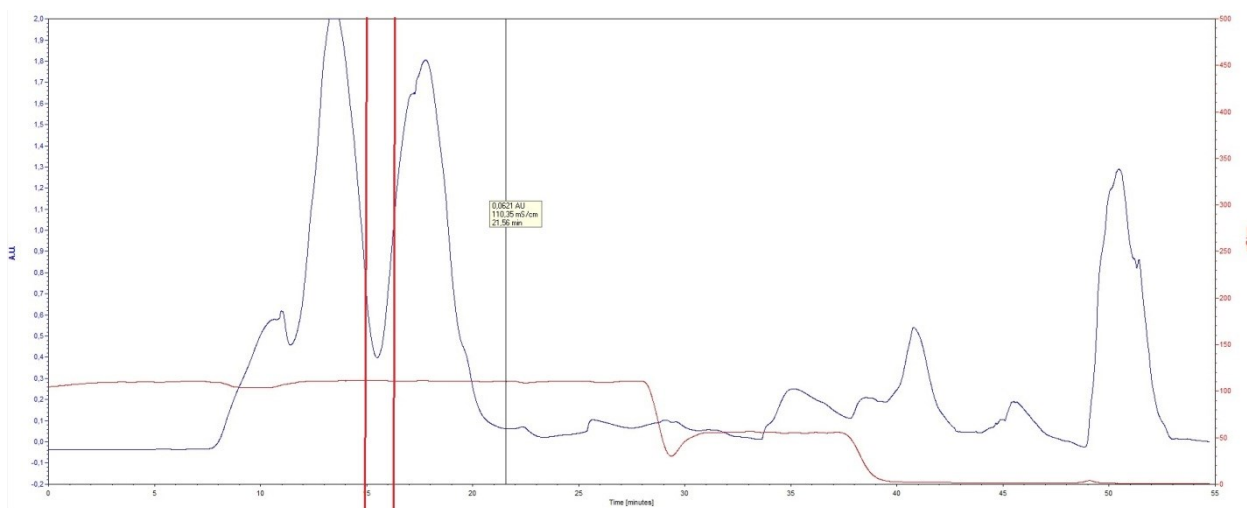


Рисунок 14 – Хроматограмма ВЭЖХ БКФ КЖ с использованием гидрокарбоната аммония

Однако, при контроле активности фракций методом лунок после термического разрушения соли угнетения роста контрольных штаммов не наблюдали, то есть действующее вещество инактивировалось. Тем не менее,

проведенные манипуляции позволили добиться модификации колонки C18, которая, в свою очередь, позволила в дальнейшем использовать в качестве элюента деионизованную воду, получая при этом высокий уровень разделения метаболитов, что отражено на рисунке 15: пики четкие, разделенные большим объемом элюента.

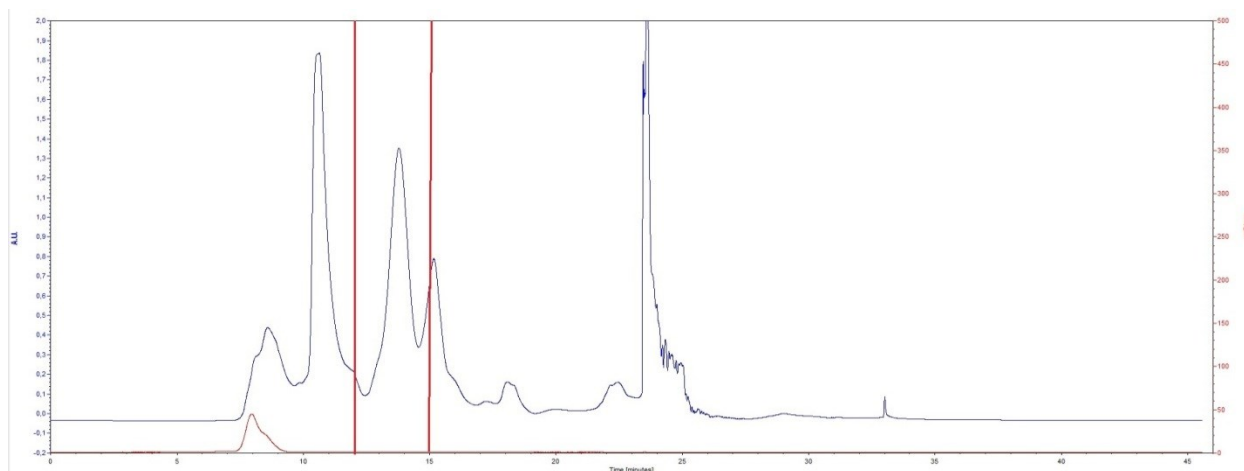


Рисунок 15 – Хроматограмма ВЭЖХ КБФ КЖ на модифицированной колонке C18 с использованием деионизованной воды в качестве элюента

Наибольшая зона подавления патогенов соответствовала времени выхода фракции с 12 по 15 минуту и составляла 29 мм (рисунок 16). При этом активная фракция не имела цвета и имела предельно низкую концентрацию солей, определяемую по кондуктивности, равной 0.59 мСм/см.

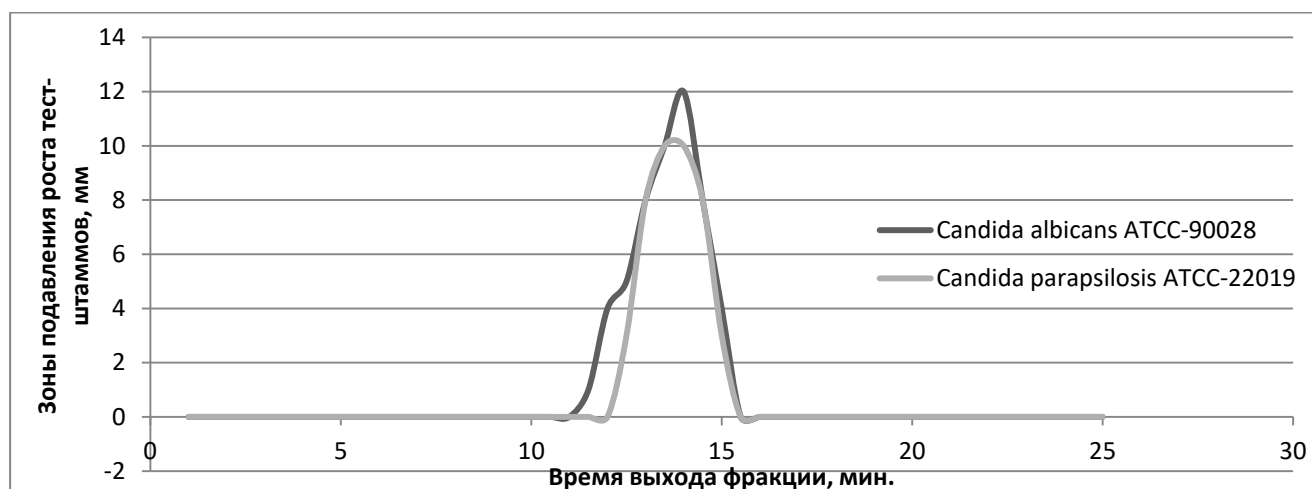
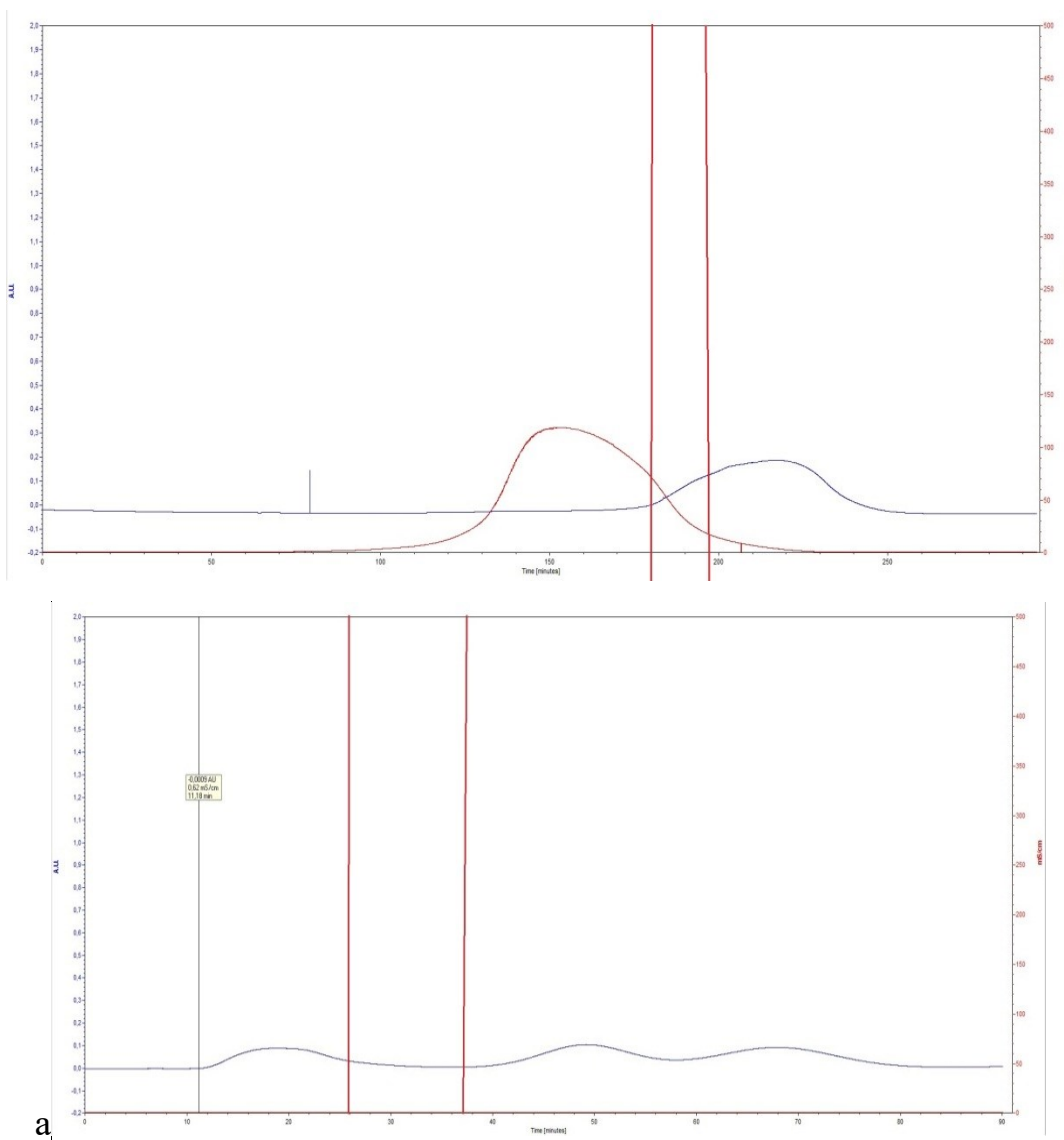


Рисунок 16 - Значение зон подавления роста тест-штаммов фракциями, полученными в разные периоды времени

3.5.3. Эксклюзионная хроматография

Несмотря на то, что активная фракция ВЭЖХ не имела цвета, в ней оставалось значительное количество примесей, которые невозможно было удалить с помощью обращенно-фазовой хроматографии высокого и низкого давления (см. рисунок 18), в связи с чем было принято решение об использовании эксклюзионной хроматографии. Поскольку с помощью проведенных ранее опытов с диализными мешками с различными размерами пор было установлено, что масса метаболитов, обеспечивающих активность, составляет менее 1 кДа, для их очистки выбрали два сорбента: Ultrogel AcA202, способный разделять вещества в диапазоне от 15 кДа до 1 кДа, и Sephadex G-10 (Sigma-Aldrich, Германия), обладающий разделительной способностью от 0.7 кДа до 1.5 кДа.

В результате проведенной работы G-10 показал себя наиболее эффективным по разделительной способности активных метаболитов. Также дополнительным положительным эффектом эксклюзионной хроматографии в обоих случаях явилась более глубокая очистка активной фракции от неорганических примесей. Фракция, проявляющая активность, отбиралась с 26 по 37 минуту на колонке с сорбентом G-10, и со 180 по 197 минуту на сорбенте AcA202, и образовывала зону подавления 29 мм в обоих случаях (рисунок 17). Также активное вещество не обнаруживало поглощения в УФ области, и ввиду отсутствия детектора, работающего в ИК диапазоне, для его выделения вынуждены были ориентироваться только на время выхода.



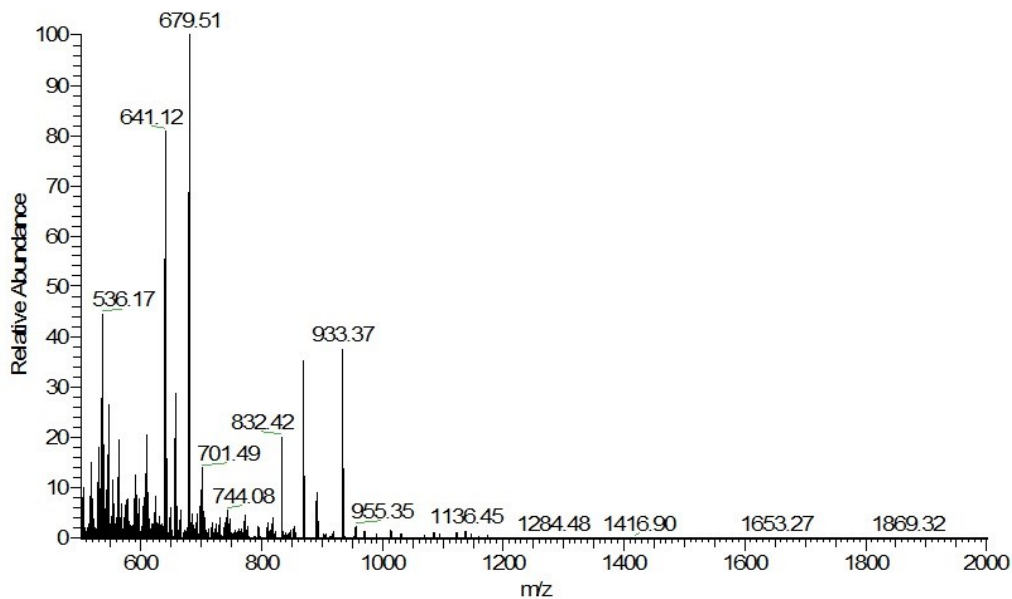
б

а) Ultrogel AcA202; б) Sephadex G-10

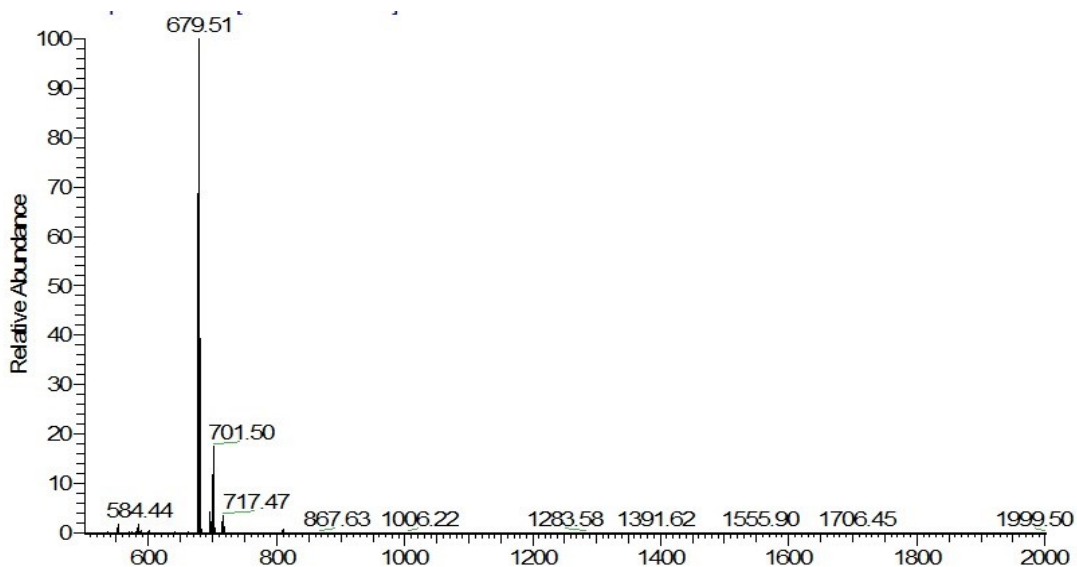
Рисунок 17 - Хроматограмма эксклюзионного процесса с использованием деионизованной воды в качестве элюента и сорбента

3.5.4. Определение чистоты и молекулярной массы выделенного антимикотического компонента штамма Lhv-97

На втором этапе исследовали состав активной фракции, используя жидкостную хромато-масс-спектрометрию (раздел 2.6.5). На рисунке 18 приведены масс-спектры пробы очищенного КБФ КЖ штамма Lhv-97 после выделения с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ и далее после эксклюзионной хроматографии.



a



б

а) после ВЭЖХ; б) после ВЭЖХ с последующей эксклюзионной хроматографией

Рисунок 18 - Масс-спектры активной фракции штамма Lhv-97

Пик с молекулярной массой 679,51 соответствует протонированной форме антимикотического вещества (АМВ) (соответственно, молекулярная масса АМВ составляет 678,51). Пик с молекулярной массой 701,50 относится к иону, содержащему кроме АМВ ион натрия, а пик с молекулярной массой 717,47 – ион

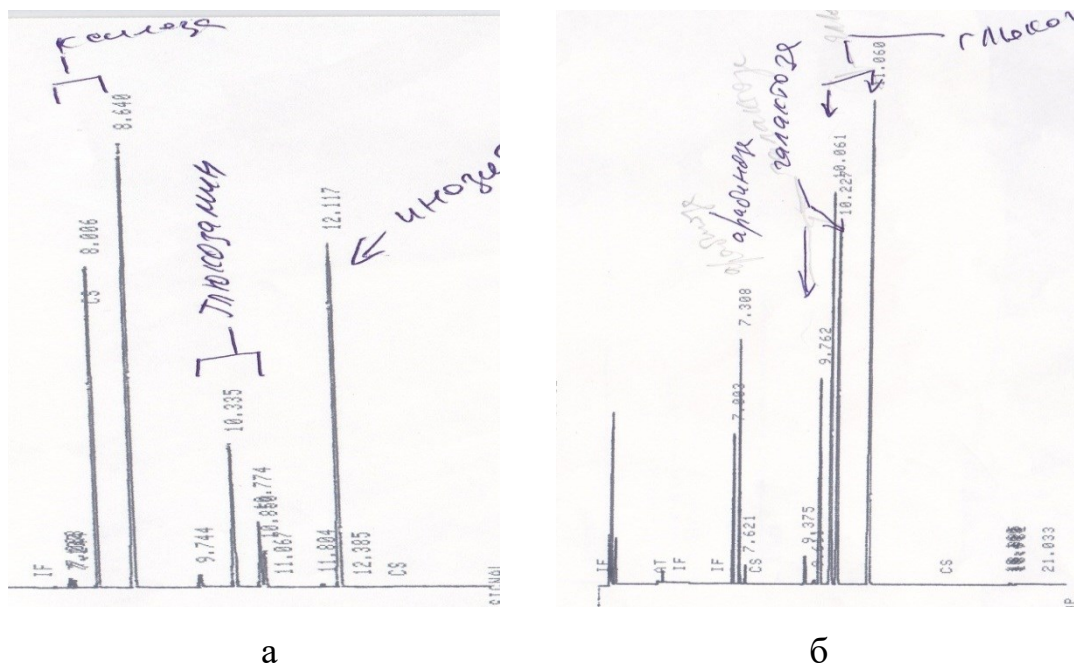
калия (наличие ионов щелочных металлов обусловлено особенностями получения электроспрея для последующего масс-спектрометрического определения). Как видно из рисунка 18а, после ВЭЖХ образец АМВ содержит значительное количество примесей, однако после дополнительной эксклюзионной хроматографии количество примесей составляет уже не более 5 %, что дает возможность использовать полученный образец АМВ для исследования его структуры.

3.5.5. Использование газовой хроматографии для определения состава антимикотического компонента штамма Lhv-97

Поскольку определенная молекулярная масса АМВ штамма Lhv-97 составляет 678,51, ГХ и газовая хромато-масс-спектрометрия не могут быть использованы для определения состава такого вещества без его фрагментации [26]. Поэтому необходимо было предложить способ фрагментации АМВ, с помощью которого можно было бы приступить к определению его структуры.

Проведенные исследования позволили установить, что АМВ очень гидрофильно (не экстрагируется из водных растворов органическими растворителями), то есть содержит большое количество полярных групп, не поглощает в УФ области, устойчиво к протеолизу и не дает характерных реакций на пептиды: биуретовую и с нингидрином в нейтральной среде. На основании полученных данных в сопоставлении с данными литературы было предположено, что АМВ является аминогликозидом. Если предположение верно, то гидролиз такого соединения при кипячении в кислой среде должен привести к обнаружению в продуктах реакции сахаров (и их аминопроизводных) и циклического аминспирта [80].

Для подтверждения этого предположения образец АМВ после очистки ВЭЖХ и эксклюзионной хроматографией подвергли кислотному гидролизу 0,6 М соляной кислотой при 100 °С в течение 40 мин, 1,5, 3 и 4,5 ч. Гидролизат АМВ сушили в вакууме и силанизировали (см. раздел 2.6.6). Полученные хроматограммы в совокупности с хроматограммами веществ, взятых в качестве свидетелей, представлены на рисунках 19 и 20.



а) ксилоза, глюкозамин, мезо-инозит; б) арабиноза, галактоза, глюкоза

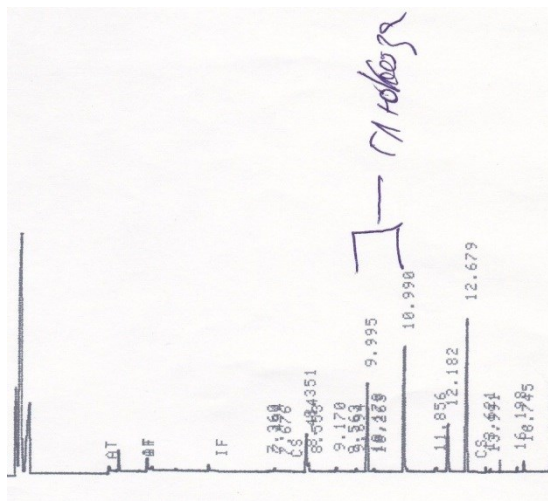
Рисунок 19 - Хроматограммы ТМС-производных веществ, взятых в качестве свидетелей

Из сравнения хроматограмм на рисунках 19 и 20 четко видно появление свободной глюкозы в гидролизате: ее содержание нарастает вплоть до 3-часового (рисунок 20в) расщепления кислотой, после чего расти перестает расти.

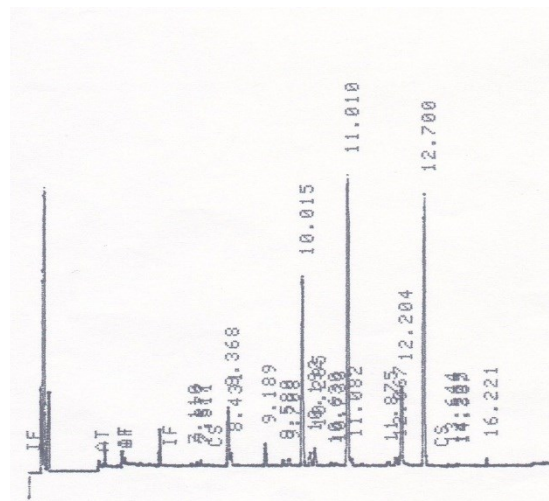
При максимальном содержании глюкозы в гидролизате АМВ ее доля в сухом веществе составляет около 13-14%. Это не значит, что в сухом препарате содержится 13-14% глюкозных остатков. Это значит, что там содержится не менее 13-14% этих остатков, поскольку моносахариды в условиях кислотного гидролиза постепенно разлагаются (например, теряют воду, превращаясь в производные фурфурола).

Кроме того, в хроматограммах гидролизатов всегда есть небольшая примесь другой альдогексозы (несколько процентов от содержания глюкозы) и два пика с более высокой молекулярной массой (времена удерживания - 12,2 и 12,7 мин). Выходят они там, где должны выходить циклиты (рисунок 19а) или

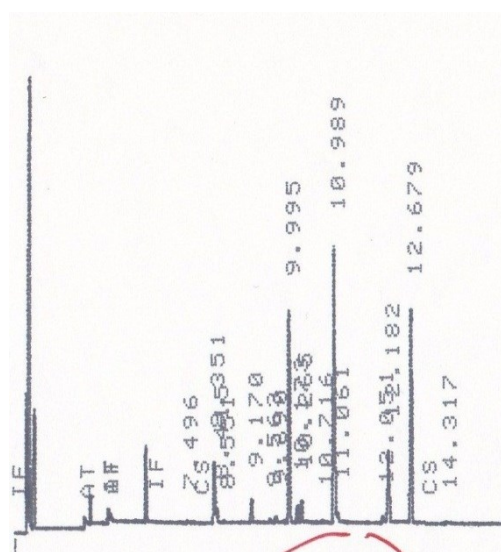
сахарокислоты – производные С₆-альдогексоз. Совершенно точно, эти вещества содержат на одну гидроксильную группу больше, чем глюкоза. Концентрации этих веществ в совокупности составляют примерно половину содержания глюкозы.



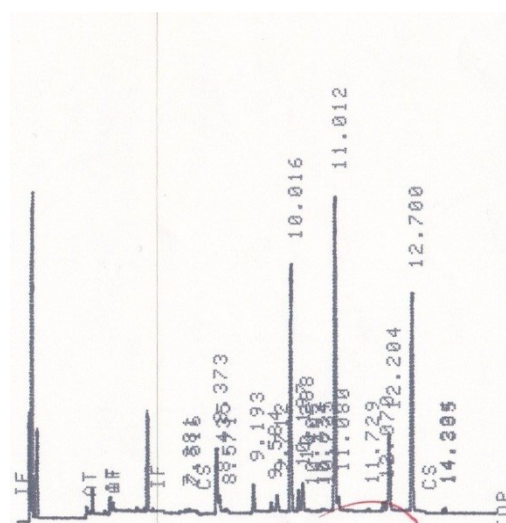
а



б



в



г

а) в течение 40 мин; б) в течение 1,5 ч; в) в течение 3 ч; г) в течение 4,5 ч.

Рисунок 20 - Хроматограммы ТМС-производных веществ, полученных в результате гидролиза очищенного АК

В продуктах гидролиза АМВ имеются также вещества более легкие (время выхода 8,3 мин и 9,2 мин), суммарное содержание которых составляет около 0,2 от содержания глюкозы (рисунок 20).

Для определения наличия карбонильных групп гидролизат АМВ и образцы стандартных сахаров обрабатывали гидрохлоридом метоксиамина (раздел 2.6.6) для перевода карбонильных группировок $>C=O$ в группировки метоксима $>C=N-OCH_3$, после чего силанизировали гидроксильные группы (рисунок 21).

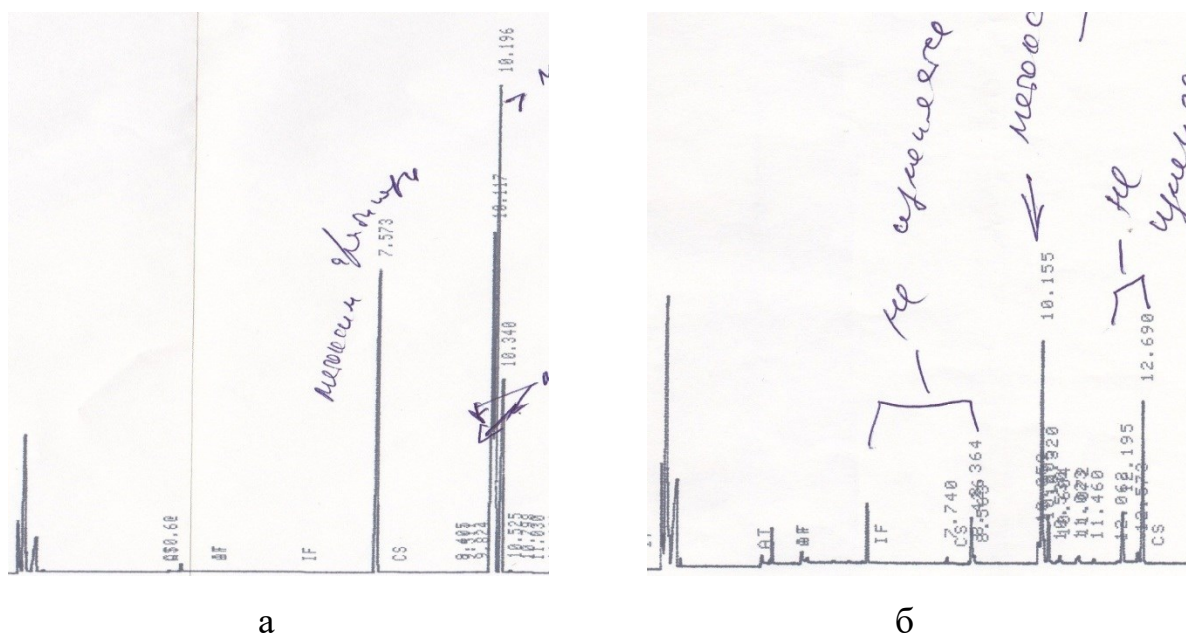


Рисунок 21 – Хроматограммы ГМС производных стандартных сахаров (а) и продуктов гидролиза АМВ (б) после обработки гидрохлоридом метоксиамина

Хорошо видно, как глюкоза гидролизата превращается в метоксим (сравните рисунки 21а и 21б), однако ни более легкие, ни более тяжелые продукты гидролиза этой реакции не дают, то есть карбонильных групп в их составе нет.

Смесь продуктов гидролиза АМВ метилировали трехфтористым бором в метаноле, разбавляли водой и экстрагировали гексаном (рисунок 22а). Если бы неизвестные продукты гидролиза (более легкие и более тяжелые, чем глюкоза) являлись гидрофобными кислотами – жирные кислоты, ароматические кислоты, оксикислоты с объемными гидрофобными группировками типа бутильной,

фенильной и др., на хроматограмме присутствовали бы пики метиловых эфиров. Однако такие пики отсутствуют.

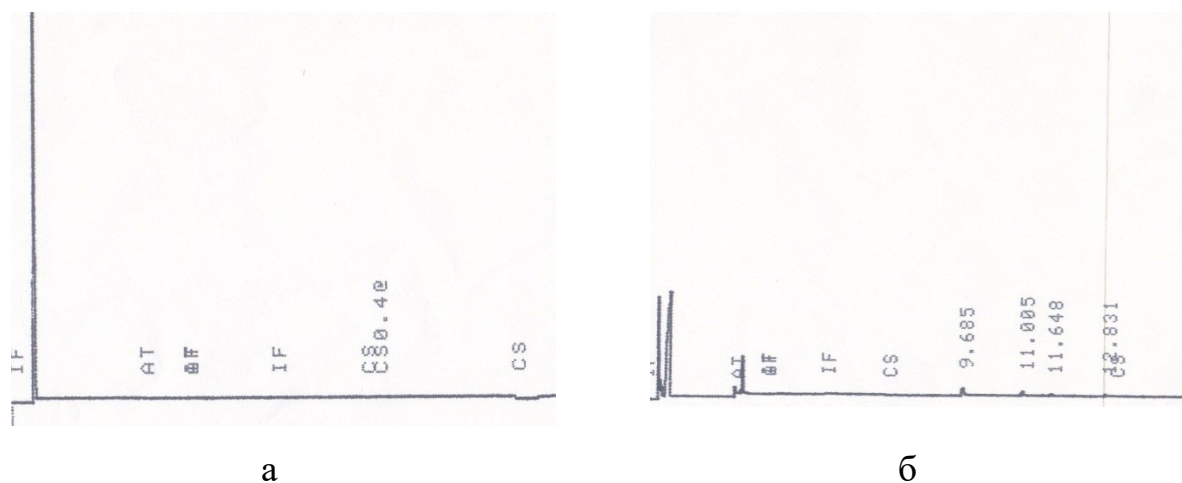


Рисунок 22 – Хроматограммы продуктов гидролиза АМВ после метилирования трехфтористым бором, экстракции гексаном (а) и силанизации (б)

Гексановый экстракт от предыдущего эксперимента по метилированию гидролизата АМВ упарили и силанизировали (рисунок 22б). Если в гексановом экстракте присутствовали гидроксильные ароматические кислоты типа лигниновых, они бы дали летучие эфиры. Однако соответствующие пики отсутствуют. Даже после метилирования карбоксилов ни один из компонентов гидролизата не становится неполярным и не растворяется в гексане.

Гидролизат АМВ метилировали сухим хлористым водородом в метаноле, сушили и силанизировали (рисунок 23). В таких условиях все метилирующиеся группировки (в том числе карбоксилы и полуацетали) должны протериватизироваться: если присутствовали, например, сахарокислоты, то получили бы уже летучие метиловые эфиры пер-ТМС-производных этих кислот. Интересно, что глюкоза в этих условиях четко дает пару аномеров метилгликозида (9,73 и 9,81), но ни один из других продуктов гидролиза этой реакции тоже не дает. То есть карбоксильных групп они не содержат.

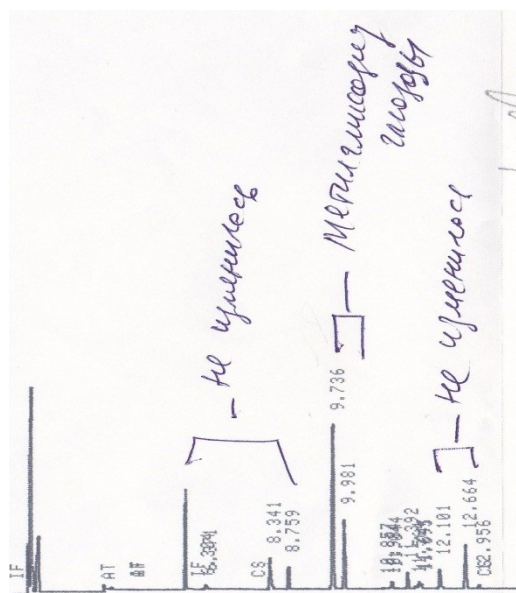


Рисунок 23 – Хроматограмма ТМС-производных продуктов гидролиза АМВ после метилирования сухим хлористым водородом в метаноле

Гидролизат АМВ был также обработан ангидридом фенолборной кислоты (раздел 2.6.6), после чего подвергнут силанизации (рисунок 24). Фенолборная кислота дает циклические эфиры с веществами, содержащими не менее двух гидроксильных групп расположенных у соседних атомов углерода, то есть эту реакцию должны давать все диолы, триолы, полиолы, независимо от наличия других функциональных групп. Все пики на хроматограмме в этом случае действительно выходят более чем за 14 минут, то есть наблюдаемые вещества действительно можно отнести к полигидроксилированным соединениям.

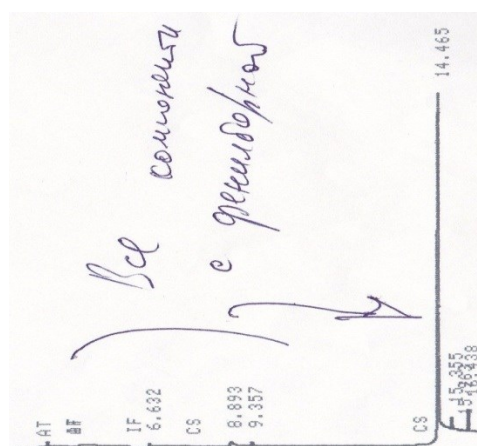


Рисунок 24 - Хроматограмма ТМС-производных продуктов гидролиза АК после обработки ангидридом фенолборной кислоты в пиридине

Также был проведен ряд экспериментов для выяснения наличия восстановительных свойств АМВ и определения азотсодержащих групп (рисунок 25-27). Для этого очищенный образец АМВ предварительно обрабатывали восстановителем, а именно боргидридом натрия в воде (раздел 2.6.6), после чего подвергали гидролизу и силанизации (рисунок 25).

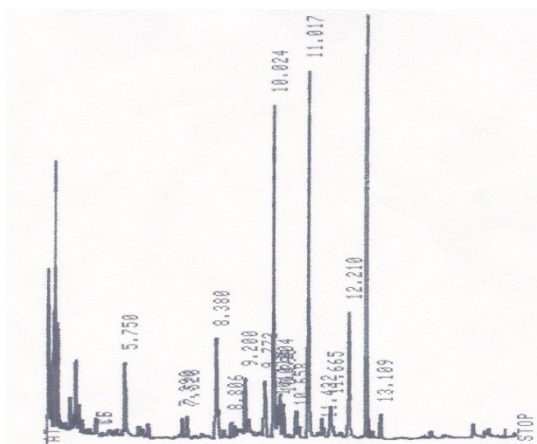


Рисунок 25 - Хроматограмма ТМС- производных АМВ, обработанного боргидридом натрия, затем подвергнутого гидролизу и последующей силанизации

Кроме того, гидролизат АМВ уже не силанизировали, а ацетилировали смесью пиридина и уксусного ангидрида (раздел 2.6.6). Так же ацетилировали и гидролизат, предварительно обработанный боргидридом (рисунок 26).

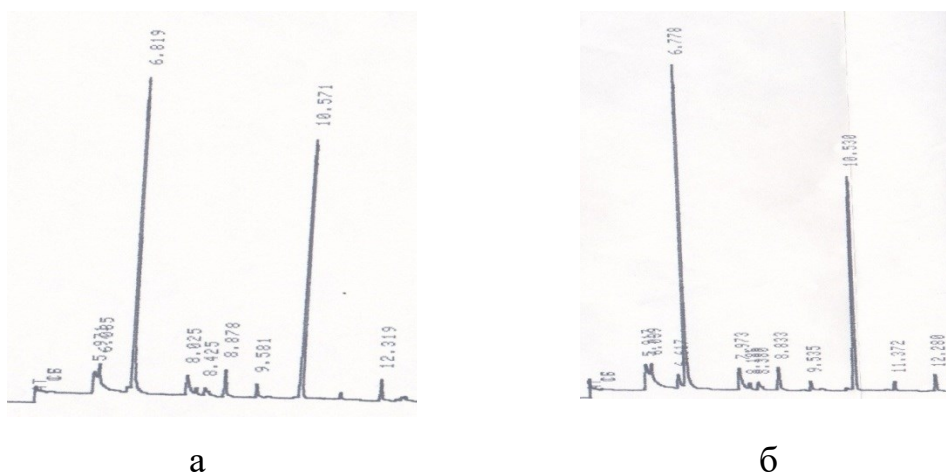


Рисунок 26 – Хроматограмма ацетилированных производных гидролизата АМВ (а) и гидролизата АМВ, предварительно восстановленного боргидридом натрия (б)

Как следует из рисунка 26, обработка исходного очищенного АМВ боргидридом и его последующий гидролиз приводят в точности к той же картине, что и гидролиз исходного образца АМВ без предварительного восстановления. То есть никаких восстанавливаемых группировок АМВ не содержит, а глюкозный остаток находится в середине молекулы – или, во всяком случае, присутствует в виде гликозида, не имея концевой альдегидной группы.

При ацетилировании глюкозный и «циклитный» фрагменты гидролизата АМВ дают уже по одному пику, а не по два (как силильные производные). При этом эффективный молекулярный вес ацетильного производного циклита получается значительно меньшим, нежели производного глюкозы или инозита (соответствует приблизительно введению 3-4 ацетильных групп в молекулу против 5 и 6 групп соответственно для глюкозы и истинного циклита (рисунок 27), тогда как для силильного производного все было наоборот (6 групп для «циклита» и только 5 для глюкозы), что очень существенно.

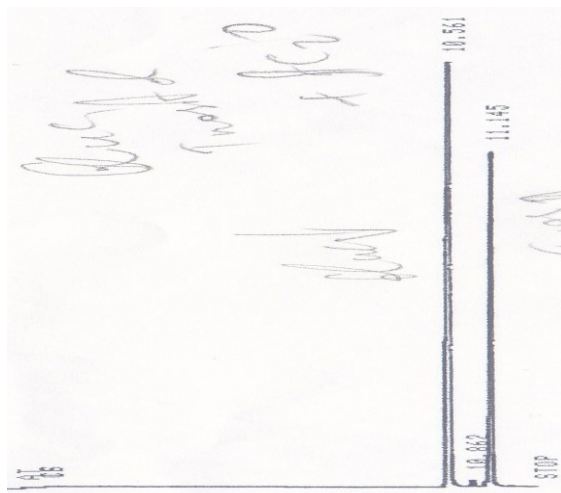


Рисунок 27 – Хроматограммы ацетилированных производных глюкозы (левый пик) и инозита (правый пик)

Глюкозный фрагмент отлично восстанавливается в полиол и дает производные - силильные и ацетильные (рисунки 25 и 26б). «Циклитный» фрагмент не восстанавливается, дает в точности те же два производных в форме силильных эфиров и одно (в форме ацетильных производных), что и без восстановления.

Вероятнее всего, «циклитный» (или, более строго, вообще «полиольный») фрагмент соединен с глюкозой посредством атома кислорода при аномерном атоме углерода глюкозы, то есть концевым является именно «полиольный» фрагмент. В негидролизованной молекуле восстанавливающихся группировок нет.

Также можно с большой вероятностью предположить, что в «полиольном» фрагменте содержится одна (или несколько) азотсодержащих группировок типа – NH_2 , $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ и т.п., поскольку иначе не удастся объяснить резкое уменьшение молекулярного веса фрагмента при переходе от силильных производных к ацетильным. Очевидно, дело в том, что в составе циклитного полиола есть группировки, которые силанизируются (молекулярный вес с каждой введенной силильной группой возрастает на 73), но не ацетируются. А это обычно азотсодержащие группировки. Так, в первичную аминогруппу может войти две силильных группы, а ацетильная – только одна. В амидную группу тоже входит 2 силильных группы, а ацильные вообще не входят. В остаток мочевины или гуанидина могут войти 3-4 силильных группы, а ацильная, скорее всего, вообще не войдет.

Наличие первичной амино- или амидной группы объясняет и то, почему силильное производное циклитного фрагмента всегда выходит двумя неравными пиками, а его же ацетильное производное – только одним: в обеих этих группировках получается смесь моно- и дисилильных производных, а при ацетилировании аминогруппа на 100% дает моноацетильное производное, амидная группа вообще ацетильного производного не дает.

Проведенные исследования позволяют заключить, что АМВ содержит весьма ощутимый фрагмент глюкозы (возможно, не один) и еще несколько полигидроксилированных фрагментов, которые, однако, не относятся к альдозам, кетозам, сахарокислотам или сахароаминам.

Более тяжелые фрагменты соответствуют изомерному аминоклику C_6 – во всяком случае, они содержат на один гидроксил больше, чем глюкоза, а кроме гидроксильных содержат еще аминогруппу или группы. Можно предположить, что

на два глюкозных остатка в молекуле приходится один остаток циклита. Это не произвольное умозаключение, поскольку калибровочные коэффициенты C₆-циклита и альдогексозы должны быть очень близки (возможно, отличаются на 15-20 %), и по соотношению площадей можно приблизительно судить о соотношении концентраций. «Циклитный» фрагмент соединен с глюкозой посредством атома кислорода при аномерном атоме углерода глюкозы, то есть концевым является именно полиольный фрагмент.

Что же касается более легких продуктов (время выхода 7-9,3 мин), то они, по всей видимости, не являются продуктами распада глюкозы или циклита в ходе нагревания с кислотой, поскольку и в наиболее жестких условиях гидролиза присутствуют практически в тех же соотношениях с глюкозой и циклитом, что и в наиболее мягких – в отличие от раннего пика при 5,5 мин, который действительно растет по мере распада препарата в кислоте. Следовательно, они изначально присутствуют в исследуемом веществе, только число гидроксильных групп у них меньше, чем у глюкозы, и вес одного моля силильного производного меньше, что мы видим по соотношению площадей (этих фрагментов по весу, судя по площади, содержится в веществе значительно меньше, чем глюкозных). К сожалению, более точно ничего сказать нельзя: какой-то короткий полиол, видимо, C₅.

Таким образом, можно предположить, что молекула АМВ включает два остатка глюкозы, один остаток тяжелого циклита, находящегося на конце молекулы, и один остаток легкого полиола. Из известных в литературе наиболее близкими по молекулярной массе к молекулярной массе АМВ являются неомицин (рисунок 28) и маннозидострептомицин (МС) (рисунок 29), антибиотик, продуцируемый *Streptomyces griseus* в качестве примеси при получении стрептомицина [21].

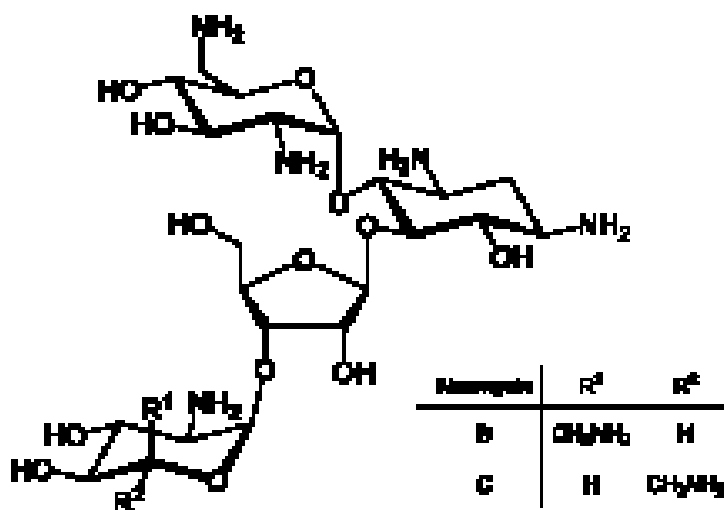


Рисунок 28 – Структура неомицина (молекулярная масса 615)

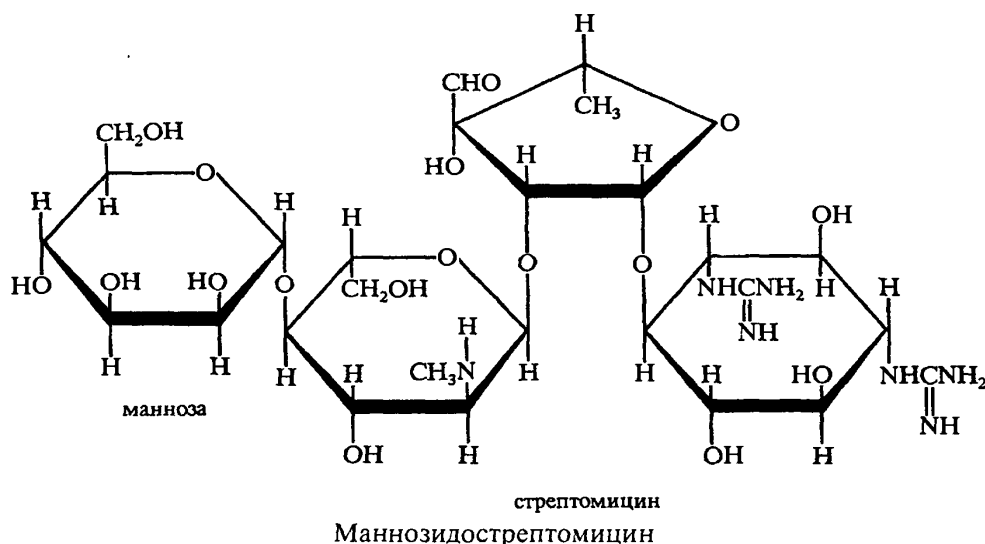


Рисунок 29 - Структура маннозидострептомицина (молекулярная масса 743)

Все остальные промышленно выпускаемые в настоящее время аминогликозиды, кроме неомицина, не содержат дополнительного аминированного остатка глюкозы (как неомицин) и их молекулярные массы составляют менее 600 Да.

Однако неомицин содержит аминированные остатки глюкозы, в отличие от АМВ, а в циклитной части молекулы неомицина отсутствует один гидроксил, и она находится в середине молекулы, а не на ее конце, как в АМВ.

В то же время предполагаемая структура АМВ штамма Lhv-97 не содержит маннозу и альдегидную группу, как молекула МС. Молекулярная масса МС составляет 743 Да. С заменой метилированной аминогруппы и карбонила на ОН-

группы, молекулярная масса составит 732, что на 53,5 Да больше, чем определенная масса АМВ. Молекулярная масса одной гуанидиновой группы составляет 53 Да, однако в молекуле АМВ она должна быть заменена на гидроксил или азотсодержащую группу.

Таким образом, проведенные к настоящему моменту исследования позволили установить, что АМВ штамма Lhv-97 является аминогликозидом, содержащим два остатка глюкозы, один остаток аминированного циклита C₆, находящегося на конце молекулы, и один остаток легкого полиола, но они не дают возможности предложить точную структуру АМВ. Для ее выяснения нужны дополнительные исследования.

3.5.6. Заключение по разделу 3.5

Проведенные исследование по экстракции активных веществ с помощью растворителей позволили установить гидрофильную природу активного вещества.

Произведен подбор условий выделения и очистки активных метаболитов с использованием ВЭЖХ и эксклюзионной хроматографии, в результате которых выделенная активная фракция обладает минимальным количеством органических примесей и кондуктивностью 0.59, что позволяет утверждать о низком содержании солей в растворе.

Также в результате исследований очищенной методами ВЭЖХ и эксклюзионной хроматографии фракции с помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии было определено, что количество примесей в исследуемом образце составляет уже не более 5 %, что дает возможность использовать полученный очищенный образец АМВ для исследования его состава. Молекулярная масса АМВ, определенная методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии, составила 678,5 Да.

Исследования с помощью ГХ позволили сделать вывод о том, что АМВ является аминогликозидом, и предположить, что его молекула содержит два остатка глюкозы, один остаток аминированного циклита C₆, находящегося на конце молекулы, и один остаток легкого полиола.

3.6. Исследование активности выделенного антимикотического вещества штамма *B. mojavensis* Lhv-97

3.6.1. Определение минимальной подавляющей концентрации АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97

Три образца активного вещества штамма *B. mojavensis* Lhv-97 в очищенном виде в концентрации 2 мг/мл, в форме КЖ и КБФ КЖ были разведены в 10, 20, 30, 40 и 50 раз. Действие полученных разведений было проверено на штаммах *C. albicans* АТСС-90028 и *C. parapsilosis* АТСС-22019 (таблица 7).

Таблица 7 - Зоны подавления роста тест-штаммов *C. albicans* АТСС-90028 и *C. parapsilosis* АТСС-22019 под действием разных концентраций КЖ, КБФ КЖ и образца очищенного АМВ

Образец	Зоны подавления роста, мм, при разведении в					
	0	10	20	30	40	50
Данные для <i>C. albicans</i> АТСС-90028						
КЖ	23	0	0	0	0	0
КБФКЖ	27	21	15	9	0	0
АМВ, 2 мг/мл	27	23	15	9	0	0
Данные для <i>C. parapsilosis</i> АТСС-22019						
КЖ	23	0	0	0	0	0
КБФКЖ	26	23	13	9	0	0
АМВ, 2 мг/мл	27	23	15	9	0	0

Согласно полученным данным, эффективность действующего вещества в форме КБФ КЖ не отличалась от очищенного вещества в концентрации 2 мг/мл, а минимальная подавляющая концентрация АМВ составила около 70 мкг/мл.

3.6.2. Сравнение активности АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 с применяемыми в медицине препаратами

С использованием клинических изолятов *C. albicans* в качестве тест-штаммов проводили сравнение очищенного АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 с флуконазолом (OZON Фармацевтика, Россия). Флуконазол – один из наиболее

часто применяемых препаратов для лечения кандидозов. Штаммы грибов рода *Candida* разделяют на чувствительные и устойчивые к флуконазолу [59].

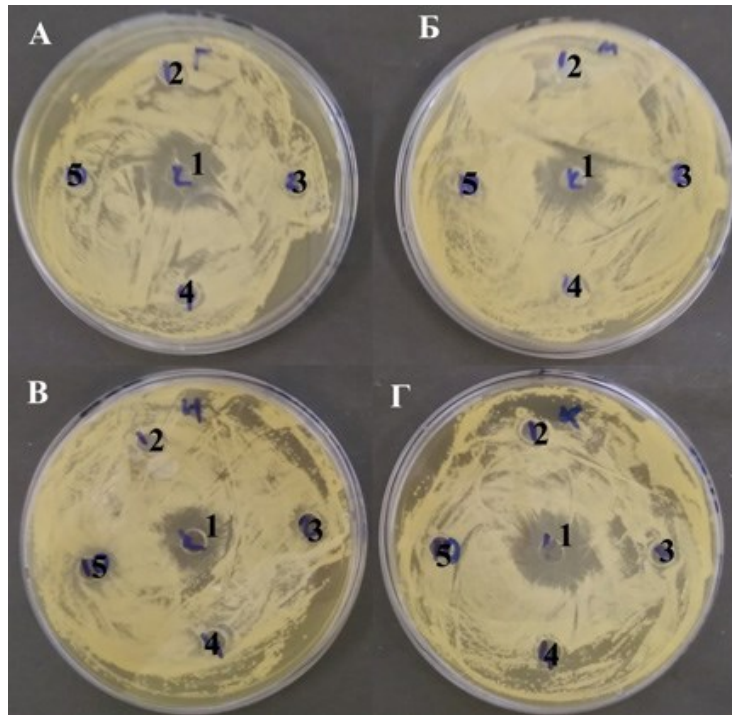
Было показано, что клинические изоляты *C. albicans* в большинстве случаев были устойчивы к флуконазолу в концентрации 10 мг/мл, однако при этом были чувствительны к активному веществу штамма *B. mojavensis* Lhv-97 в концентрации 1 мг/мл (таблица 8).

Таблица 8 – Сравнение действия флуконазола и АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 на клинические изоляты грибов рода *Candida*

№	Патоген	Размер зон подавления, мм	
		АМВ штамма Lhv-97, 1 мг/мл	Флуконазолом, 10 мг/мл
1	<i>Candida albicans</i> 2	31	0
2	<i>Candida albicans</i> 5	33	0
3	<i>Candida albicans</i> 9	28	0
4	<i>Candida albicans</i> 12	40	0
5	<i>Candida albicans</i> 18	36	7
6	<i>Candida albicans</i> 21	30	0
7	<i>Candida albicans</i> 23	32	0
8	<i>Candida albicans</i> 26	40	0
9	<i>Candida albicans</i> 32	38	0
10	<i>Candida albicans</i> 33	32	0
11	<i>Candida albicans</i> 37	27	0
12	<i>Candida albicans</i> 142	28	0
13	<i>Candida albicans</i> 1721	43	18
14	<i>Candida albicans</i> 2945	41	23
15	<i>Candida albicans</i> K1	40	0
16	<i>Candida krusei</i> Ck№1	28	0

Таким образом, даже устойчивые к флуконазолу клинические изоляты были чувствительны к изучаемому активному веществу.

Так как было установлено, что АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 относится к классу аминогликозидов, было проведено сравнение его активности с используемыми в медицине препаратами аминогликозидной природы (рисунок 30) в отношении *C. albicans* ATCC-90028.



А – гентамицин, Б – амикацин, В – неомицин, Г – канамицин, 1 (центральная лунка) – АМВ штамма Lhv-97 в концентрации 1 мг/мл; остальные лунки с исследуемыми аминогликозидами в концентрациях: 2 – 1 мг/мл; 3 – 2 мг/мл; 4 – 3 мг/мл; 5 – 5 мг/мл.

Рисунок 30 – Сравнение активности АМВ штамма Lhv-97 с аминогликозидами

Как видно из рисунка 30, использованные аминогликозидные антибиотики не проявляли активность в отношении культуры *C. albicans* ATCC-90028 в концентрациях 1-5 мг/мл, тогда как АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 в концентрации 1 мг/мл давало зону подавления шириной более 5 мм.

3.7. Создание прототипов биопрепаратов на основе штамма *B. mojavensis* Lhv-97

На основе штамма *B. mojavensis* Lhv-97, как и на основе других микроорганизмов, могут быть созданы препараты различного состава и формы. Наиболее простой формой является КЖ или ее концентрат, которые находят применение в качестве антимикотических средств в медицине [1] и сельском хозяйстве [83] для борьбы с грибными патогенами. Также широкое применение в сельском хозяйстве находят препараты на основе высушенных клеток с остатками питательной среды и различными добавками: стабилизаторами, прилипателями

[47,76]. Однако в медицине и ветеринарии обычно используют в той или иной степени очищенные активные метаболиты микроорганизмов.

Предложенная общая схема приготовления препаратов на основе штамма *B. mojavensis* Lhv-97 показана на рисунке 31.

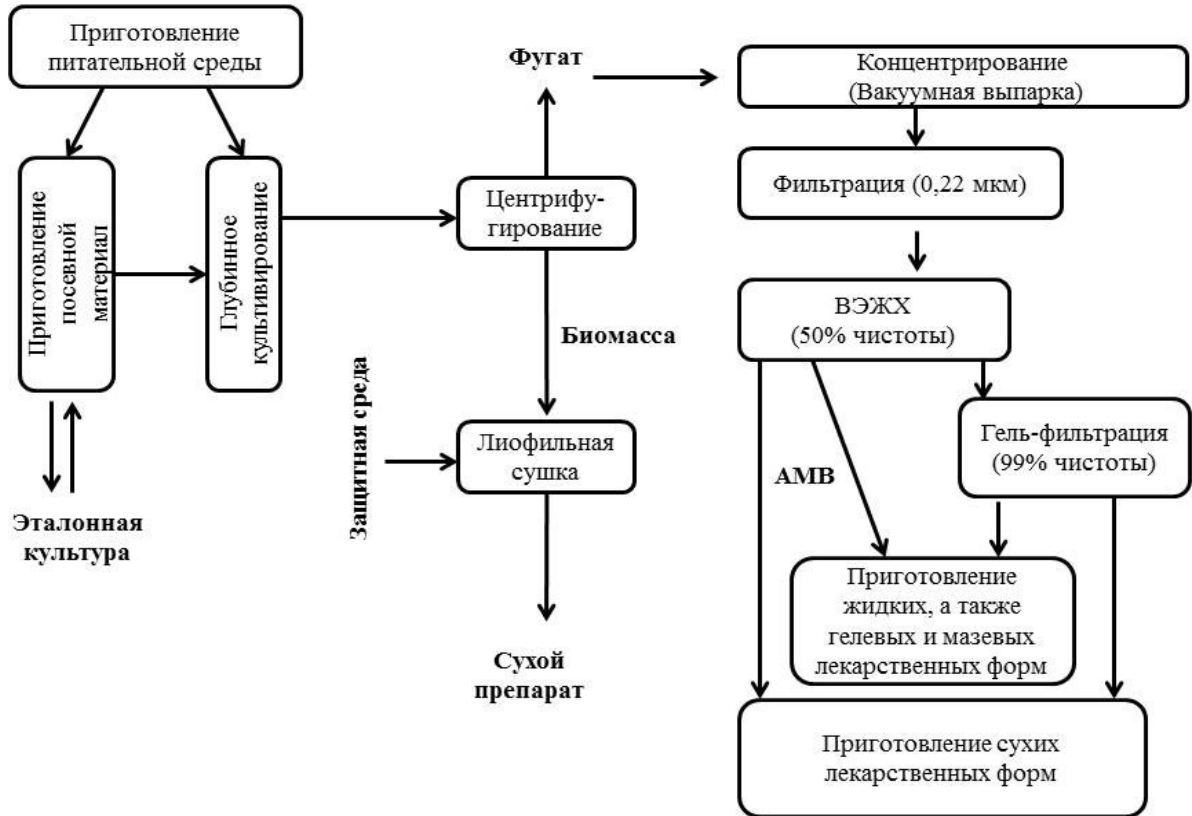


Рисунок 31 – Схема приготовления препаратов на основе штамма *B. mojavensis* Lhv-97

После стадии биосинтеза клеточную массу отделяют центрифугированием и высушивают для применения в сельском хозяйстве. Фугат концентрируют в вакуум-выпарной установке и подвергают стерилизующей фильтрации через поры диаметром 0,22 мкм перед очисткой методом ВЭЖХ. Далее грубо очищенная активная фракция может непосредственно использоваться для приготовления жидких или полужидких форм (водные растворы, спреи, гели, мази), либо быть лиофильно высушенной для приготовления сухих форм

(порошки, таблетки, капсулы, микрокапсулы) преимущественно сельскохозяйственного и ветеринарного назначения. Дополнительно очищенное методом эксклюзионной хроматографии (гель-фильтрацией) АМВ может быть использовано в приготовлении жидких и сухих форм для медицины.

3.7.1. Приготовление и испытания сухого препарата на основе клеток штамма *B. mojavensis* Lhv-97 для защиты растений

Предложенную технологию использовали для получения экспериментальных образцов препарата в виде сухого порошка с концентрацией $(4\div 6)\times 10^{10}$ КОЕ/г для испытаний на пшенице (раздел 2.91). В таблицах 9 и 10 представлены результаты деляночных полевых испытаний приготовленных экспериментальных образцов препарата на основе высушенных клеток штамма *B. mojavensis* Lhv-97 (приложения Б и В).

Таблица 9 – Урожайность яровой мягкой пшеницы, т/га ($НСР_{05} = 0,27$)

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±
	I	II	III	IV			
контроль без обработки	2,17	3,08	3,12	3,43	2,95	-	-0,62
эталон химический - Виал ТТ	2,92	3,75	3,72	3,88	3,57	+0,62	-
экспериментальный препарат на основе <i>B. mojavensis</i> Lhv-97	3,06	3,63	3,42	3,43	3,39	+0,44	-0,18

Таким образом, экспериментальные сухие образцы препарата на основе клеток штамма *B. mojavensis* Lhv-97 показали высокую эффективность: на яровой мягкой пшенице в отсутствие проявлений инфекций достоверная прибавка урожая относительно контроля при использовании препарата на основе штамма *B. mojavensis* Lhv-97 составила 14,9 % (на уровне действия химического препарата Виал ТТ) (приложение Б). На озимой мягкой пшенице при искусственном инфицировании возбудителями снежной плесени при использовании экспериментального препарата на основе штамма *B. mojavensis* Lhv-97 урожайность более чем в 2,5 раза достоверно превысила урожай в

инфицированном контроле и более чем в 1,5 раза при использовании химического протравителя Максим экстрим (приложение В).

Таблица 10 - Урожайность озимой мягкой пшеницы при искусственном инфекционном фоне (*Microdochium nivale*), т/га (НСР₀₅ = 0,40)

№ варианта	Повторности			Среднее значение	Отклонение от контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, ±	Отклонение от эталона химического, ±
	I	II	III			
Контроль без обработок	2,01	1,67	1,86	1,85	+0,41	-0,85
Контроль, зараженный возбудителями снежной плесени	1,53	1,34	1,45	1,44	-	-1,26
Эталон химический - Максим экстрим	3,06	2,86	2,19	2,70	+1,26	-
Эксп. препарат на основе <i>V. mojavensis</i> Lhv-97	4,36	3,98	3,87	4,07	+2,63	+1,37

3.7.2. Разработка инкапсулированных форм прототипа препарата на основе АМВ штамма *V. mojavensis* Lhv-97

Предложенную технологию получения прототипов препаратов на основе штамма *V. mojavensis* Lhv-97, представленную на рисунке 31, использовали также для получения экспериментальных образцов препаратов для применения в медицине и ветеринарии.

Одним из способов лечения микозов является энтеральный путь введения лекарственных средств, однако биодоступность активных молекул в этом случае часто ограничивается их низкой устойчивостью в желудочно-кишечном тракте и слабой способностью к прохождению через биологические мембраны и тканевые структуры кишечника. Защитить активные молекулы от деградации в желудочно-кишечном тракте, повысить их кишечную абсорбцию могут инкапсулированные формы антимикотических препаратов [10,71], например, приготовленные с применением неусваиваемых (некрахмальных) природных полисахаридов и липосом. Некрахмальные полисахариды представляют собой группу веществ, к которым относят альгинаты, хитозаны, пектины, каррагинаны, фукоиданы и др.

Они не гидролизуются амилазами, не абсорбируются в кровь и частично или полностью подвергаются ферментной деградации микрофлорой толстой кишки. Некрахмальные полисахариды находят применение при болезнях желудочно-кишечного тракта, вирусных и бактериальных инфекциях, они входят в состав различных фармацевтических композиций [71]. Липосомы (фосфолипидные везикулы) как лекарственная форма не только биodeградируемы, но и способны осуществить более тесное взаимодействие с клетками и тканями живых объектов и, соответственно, позволить доставить действующее вещество к местам локализации патогенов [15, 77].

3.7.2.1. Разработка альгинатных и хитозановых гранул

В качестве метода модификации с целью повышения устойчивости АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 использовали инкапсулирование с применением пленкообразователей в виде альгината натрия и хитозана, как это описано в разделе 2.9.2 данной работы. В процессе работы по инкапсулированию образцов было установлено, что размер и внешний вид гранул различались в зависимости от условий введения АМВ штамма Lhv-97 в альгинат (жидкость-жидкость (Ж:Ж), порошок-жидкость (П:Ж)) и последующего их высушивания. Так, сырые гранулы, приготовленные по варианту Ж:Ж имели размер $2,5 \pm 0,3$ мм (рис. 32а). Несколько крупнее ($2,9 \pm 0,3$ мм) получались сферы по варианту П:Ж в случае введения в альгинат сухого (порошкового - П) АМВ (рисунок 32б). Еще более крупными ($3,1 \pm 0,2$ мм) были гранулы, полученные по варианту «П:Ж с ПАВ+Х» при котором дополнительно использовали поверхностно активное вещество (ПАВ) тритон X100 в количестве 0,1% и выдерживание в растворе хитозана (рисунок 32в). Лиофилизации приводила к частичному разрушению альгинатных шариков (рисунок 33б, 33в) что практически не наблюдали после их конвективного высушивания (рисунок 33г).

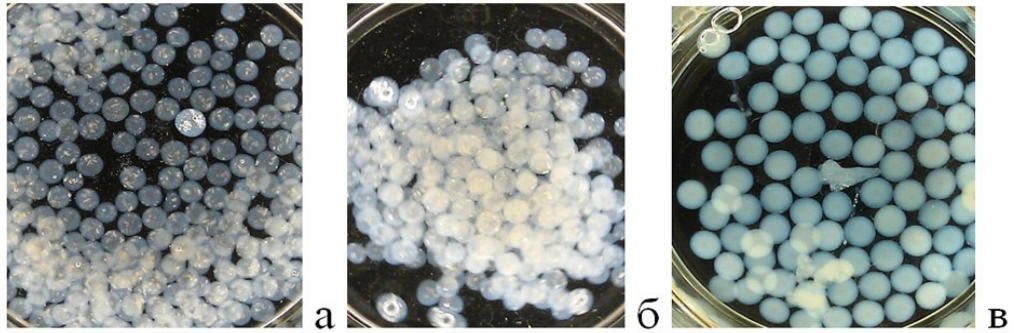


Рисунок 32 - Вид альгинатных гранул, приготовленных из жидкого (а), сухого (б, в) БСФ, а также его варианта с ПАВ с дополнительным покрытием хитозаном (в)

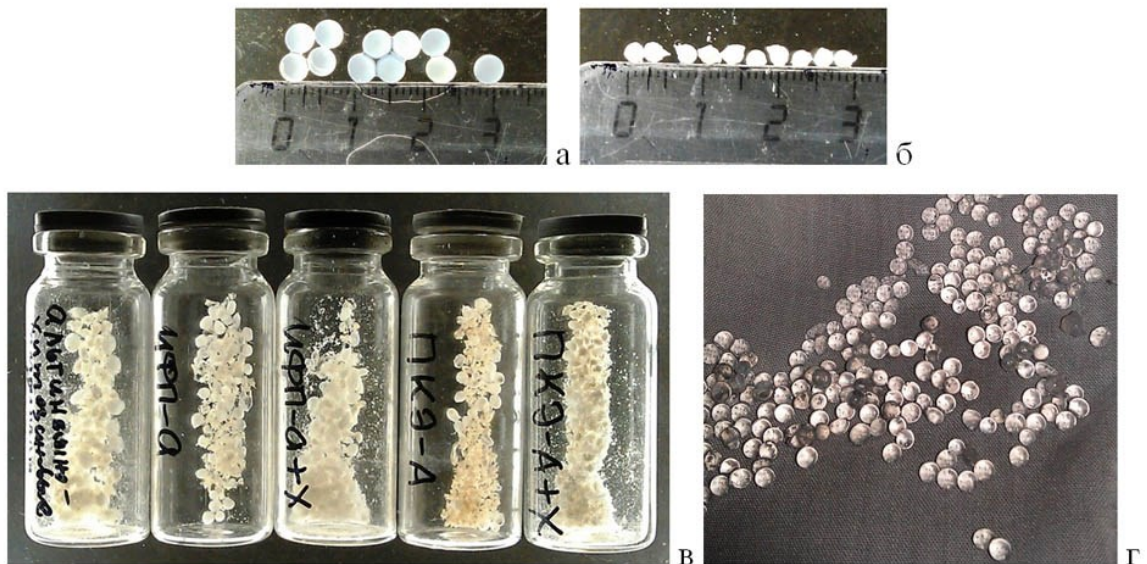
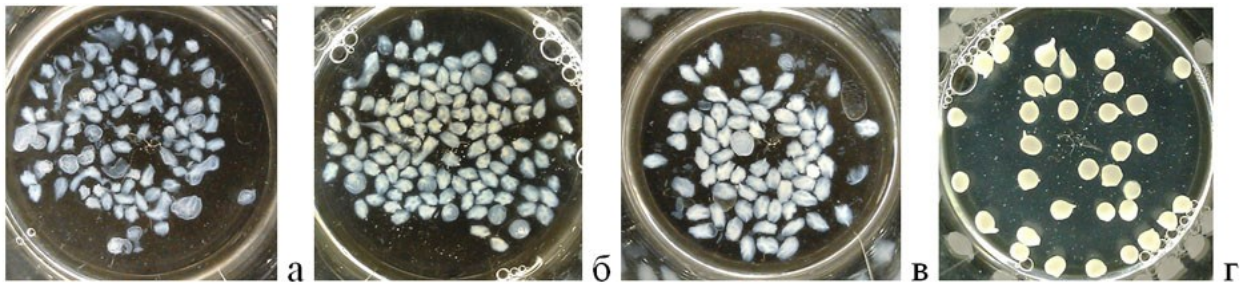


Рисунок 33 - Альгинатные гранулы с антимикотическим веществом до (а) и после высушивания методом лиофилизации (б, в) и тепловой конвекции (г)

Несмотря на то, что все варианты гранул, как показали результаты тестирования, не распались при нахождении в воде в условиях комнатной температуры в течение месяца, большинство из них видоизменялись (рисунок 34а, 34б, 34в). Морфологически наиболее стабильными были гранулы, полученные с использованием тритон X100 и хитозана (рисунок 34г, 35).

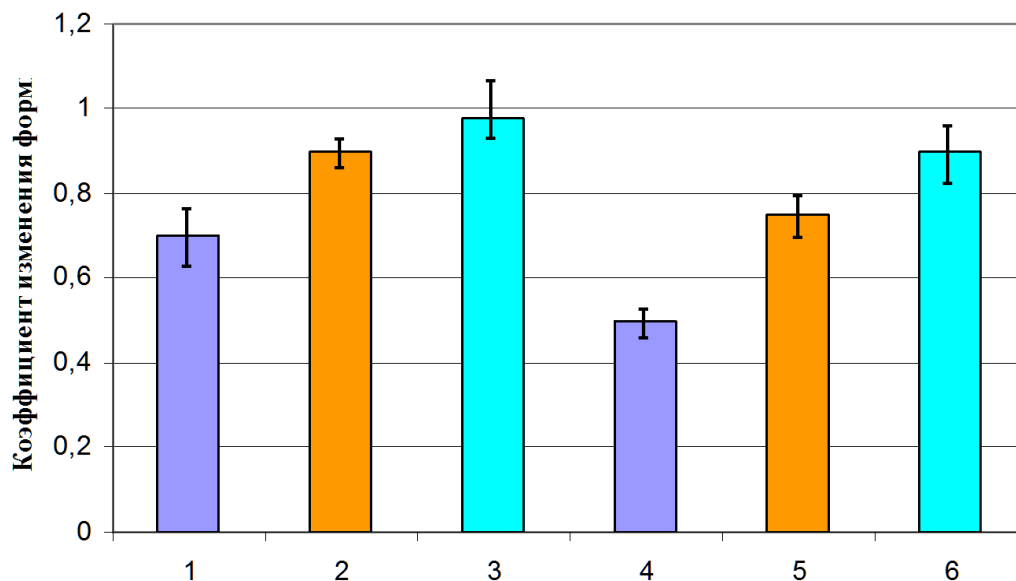
Биологическое тестирование показало, что активность сохраняется на всех стадиях приготовления образцов гранул: смешивания АМВ с раствором полимера, в процессе и после инкапсулирования, высушивания и регидратации.



а) из жидкого вещества; б) из жидкого вещества с хитозаном; в) из вещества в виде порошка; г) из вещества в виде порошка с тритон X100 и хитозаном

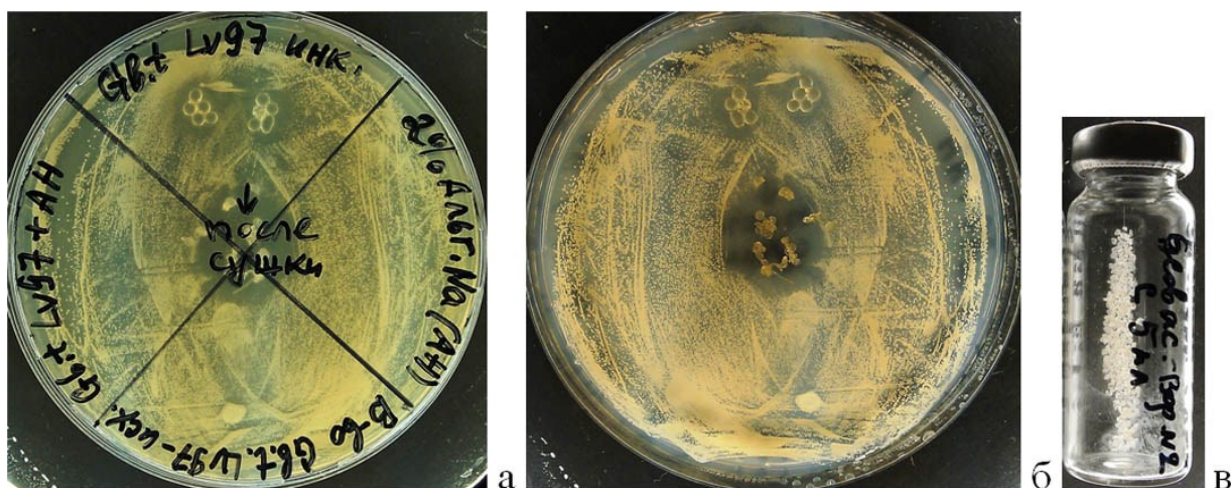
Рисунок 34 – Варианты альгинатных гранул после месяца нахождения в воде при комнатной температуре

При этом в контрольных альгинатных гранулах, не содержащих АМВ, антимикробная активность, как и следовало ожидать, не фиксировалась (рисунок 36).



Столбцы: 1, 2, 3 – параметры сырых гранул; 4, 5, 6 – после сушки; 1 и 4 – гранулы, приготовленные введением в альгинат раствора АМВ-СФ (вариант Ж:Ж), 2 и 5 – то же, порошка (вариант П:Ж); 3 и 6 – до введения порошка АМВ альгинат был предварительно модифицирован 0,1 % ПАВ, а сырые гранулы до их сушки выдержаны в растворе хитозана (вариант П:Ж с ПАВ+Х)

Рисунок 35 – Изменение формы альгинатных гранул в зависимости от способа их подготовки и введения антимикробных веществ



а) вид чашки с пробами (по часовой стрелке): альгинатные гранулы без АМВ; АМВ; смесь АМВ с альгинатом и в гранулах (сырых – сверху, высушенных – в центре) со стороны дна чашки; б) вид той же чашки со стороны крышки; гранулы, использованные в опыте (в)

Рисунок 36 – Проявление активности АМВ штамма *V. mojavensis* Lhv-97 в отношении тест-штамма *C. albicans* ATCC-90028 в процессе инкапсулирования, после высушивания и увлажнения

3.7.2.2. Разработка липосомальной формы прототипа препарата на основе штамма *V. mojavensis* Lhv-97

Липосомы АМВ штамма *V. mojavensis* Lhv-97 получали, как описано в разделе 2.9.3. Основной проблемой при получении липосом является включение действующего вещества в фосфолипидную везикулу. Включение АМВ штамма *V. mojavensis* Lhv-97 в липосомы оказалось возможным контролировать двумя методами, оптическим и биологическим. Поскольку у аминогликозидов нет характерных пиков поглощения света в видимой и УФ области, прямая количественная оценка включаемого количества АМВ с помощью спектроскопии в этих областях невозможна. Качественно оценку включения в липосомы проводили с использованием меченого ФИТЦ АМВ и люминесцентной микроскопии. Невозможность доступными препаративными методами отделить несвязанную метку (ФИТЦ) от раствора АМВ из-за его малого молекулярного веса (обычно это делается с помощью диализа [104]) не позволяет использовать

эту методику для количественной оценки доли АМВ, включенного в состав липосом. Тем не менее, при выделении фракции липосом из суспензии методом гель-фильтрации на колонке с Сефакрилом S-300HR можно наблюдать разделение окрашенных слоев (рисунок 37): верхний слой липосом, окрашенных за счет включенного меченого АМВ, и нижний слой невключенного меченого АМВ с непрореагировавшей меткой четко разделены слоем неокрашенного сорбента, что является качественным подтверждением включения меченого АМВ в липосомы.

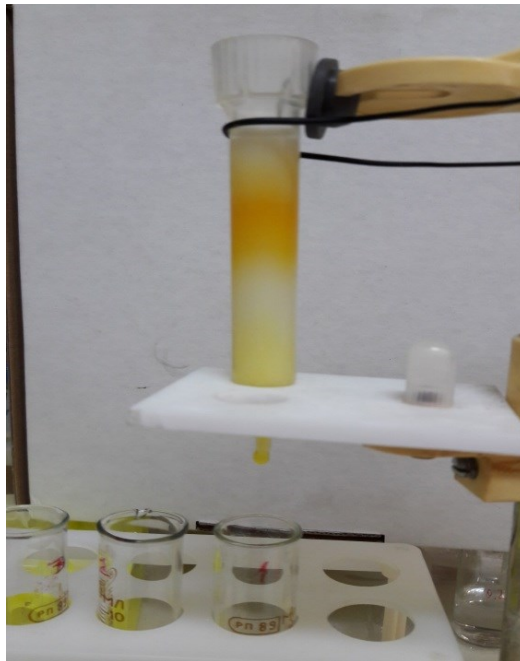


Рисунок 37 – Разделение липосом и невключенного меченого АМВ на колонке с Сефакрилом S-300HR

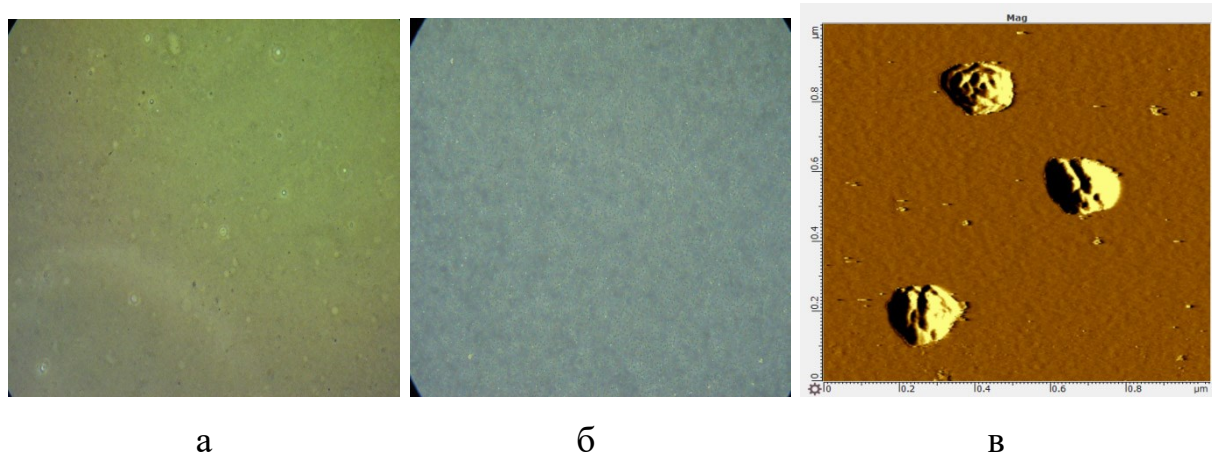
Кроме того, после отделения на колонке несвязанной метки с невключенной частью АМВ во фракции очищенных липосом можно наблюдать (слабую, нефиксируемую на фото) зеленую флуоресценцию везикул в люминесцентном микроскопе. Это является прямым свидетельством включения меченого соединения в состав липосом.

Состав и активность полученных липосом приведены в таблице 11.

Таблица 11 – Состав и активность липосом на основе АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 в отношении *C. albicans* ATCC-90028

Субстанция включения	Состав липидов*, масс %	Конц-я липидов в суспензии, мг/мл	Размер зоны подавления липосомальной фракцией, мм
АМВ	ФХ 58 + Х 25 + СПЭГ 13	24	-
АМВ	ФХ 29 + РОРЕ 29 + Х 29 + СПЭГ 13	16	2 (угнетение)
АМВ, меченое ФИТЦ	ФХ 34 + РОРЕ 25 + Х 25 + СПЭГ 16	22	2 (угнетение)
АМВ	ФХ 34 + РОРЕ 25 + Х 25 + СПЭГ 16	27	3 (угнетение)
АМВ	ФХ 44 + Х 33 + СПЭГ 23	23	2
* - ФХ – фосфатидилхолин, Х- холестерол, СПЭГ – стеароил-ПЭГ400, РОРЕ – пальмитоиллеоилфосфатидилэтаноламин, DDAВ – диметилдиооктадецил аммония бромид (катионактивный липид)			

На рисунке 38 приведены микрофотографии липосом, полученные с помощью оптического (а) и атомно-силового микроскопа (в). Для сравнения на рисунке 38б представлены частицы полистирольного латекса размером 0,8 мкм (SIGMA, США) при том же увеличении. Как следует из фотографий, липосомы в водной среде имеют сферическую форму, которая может изменяться при высыхании на подложке.



а) при увеличении в $\times 2000$; б) полистирольный латекс 0,8 мкм при увеличении в $\times 2000$; в) получено с помощью атомно-силового микроскопа

Рисунок 38 – Фото липосом на основе АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97

Результаты измерения размеров липосом, полученные на лазерном гранулометре, приведены на рисунке 39.

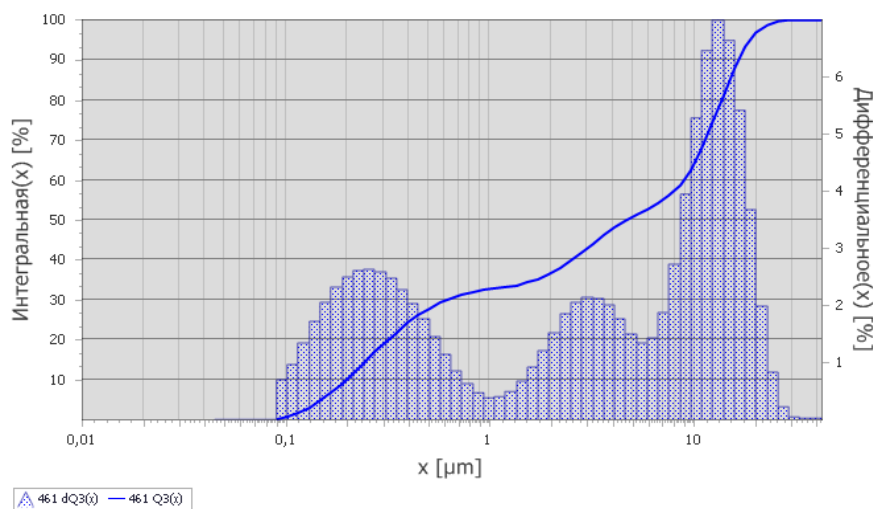
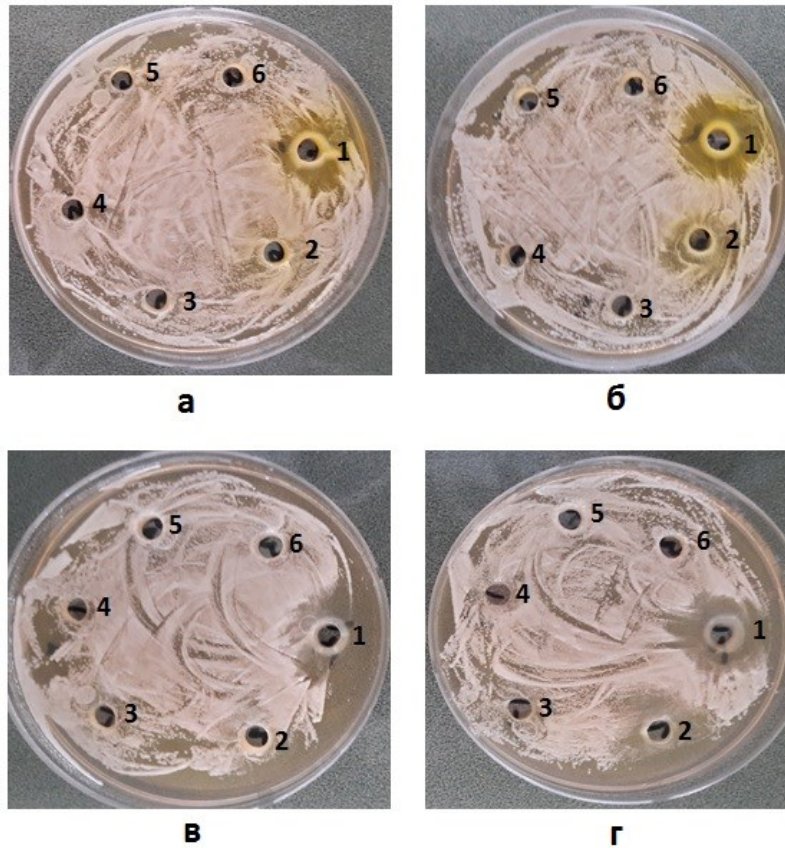


Рисунок 39 - Результаты одного из измерений гранулометрического состава липосомального препарата Lhv-97

Из гистограммы дифференциальной кривой объемного распределения частиц по размеру видно, что наибольшее количество частиц имеет размеры около 0,2 мкм (нижняя мода), 3 мкм (средняя мода) и 13 мкм (верхняя мода). Максимальный размер полученных липосом составляет 20 мкм. Такие результаты соответствуют липосомам, полученным экструзией через поликарбонатные микрофильтры с размером пор 0,2 мкм и их агрегатам. Из интегральной кривой (сплошная синяя линия) можно рассчитать медиану объемного распределения, которая соответствует 5 мкм.

На рисунке 40 приведены данные по активности липосомальных препаратов и их фракций, полученных на основе АМВ штамма Lhv-97, меченого ФИТЦ, и немеченого ФИТЦ сразу после разделения на колонке и после выдержки их в холодильнике в течение суток. Меченый и немеченый препараты были приготовлены в одних условиях. Как и следовало ожидать, наибольшую активность проявляли неразделенные препараты, содержавшие липосомы и невключённое АМВ (№1). Отделённые липосомы (№2) также проявляли активность, которая возрастала после выдержки препаратов в холодильнике в

течение суток, что демонстрировало выход АМВ из липосомальных везикул. Очевидно, что по этой же причине через сутки возрастала и активность неразделённых препаратов.



1) неразделенный липосомальный препарат после экстракции; 2) отделённые на колонке липосомы; 3) фракция мелких липосом и мицелл; 4-6) фракции, содержавшие невключённое АМВ и не связавшуюся с АМВ метку при использовании ФИТЦ

Рисунок 40 – Активность фракций липосомального препарата на основе АМВ штамма Lhv-97, меченого ФИТЦ (а,б), и немеченого ФИТЦ (в,г) в отношении *C. albicans* ATCC-90028 сразу после приготовления препаратов (а,в) и после выдержки их в холодильнике в течение суток

3.7.3. Заключение по разделу 3.7

Предложена общая схема производства препаратов на основе штамма *B. mojavensis* Lhv-97, включающая приготовление жидких и сухих форм

препаратов для защиты растений, а также для применения в медицине и ветеринарии.

Приготовлены и успешно испытаны в полевых условиях экспериментальные образцы сухого препарата на основе клеток штамма *B. mojavensis* Lhv-97.

В результате проведенных исследований были отработаны условия получения альгинатных и хитозановых гранул с АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97. Установлено, что лиофилизация альгинатных гранул вызывает частичную деструкцию матриксов, сопровождаемую снижением антимикробного потенциала дозированной формы, что не происходило после их конвективного высушивания.

Наиболее стабильные результаты по устойчивости к распаду и сохранению антимикробной активности показали варианты альгинатных гранул с хитозановым покрытием.

Получены липосомы на основе АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97, размеры которых составляют 0,2-20 мкм. Активность липосомальных препаратов возрастала после выдержки их водных суспензий в холодильнике, что демонстрировало выход АМВ из фосфолипидных везикул.

Результаты выполненных исследований позволили выбрать методические подходы к созданию эффективного способа капсулирования антимикробных веществ бациллярного происхождения как доступных моделей при создании систем контролируемой доставки перспективных лекарственных средств.

3.8. Испытания препарата на основе АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 против кандидоза ротовой полости у мышей

Эффективность действия АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 оценивали на модели ротоглоточной кандидозной инфекции белых аутбредных мышей. Две группы по пять самок мышей были иммуносупрессированы и заражены суспензией штамма *C. albicans* ATCC-9002 по методике, описанной в разделе 2.10. Через сутки после заражения мышам из лечебной группы давали препарат АМВ, внесенный в поилку с водой (20 мл) в концентрации 1 мг/мл. Мыши из

контрольной группы препарат не получали. Количество выпитой мышами воды в обеих группах в течение 24 часов составило приблизительно 5 мл.

Снижение веса животных обеих групп не происходило. Через 1 сут контрольная группа показала обсемененность ротоглотки *C. albicans* в концентрации 10^3 КОЕ/г, в то время как рост этого патогена у мышей, получавших препарат на основе АМВ штамма Lhv-97 выявлен не был, что продемонстрировало эффективность препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного скрининга коллекции микроорганизмов отдела биологических технологий ГНЦ ПМБ для дальнейшей работы был отобран авирулентный штамм *Bacillus sp.* Lhv-97, проявляющий высокую антагонистическую активность против грибов рода *Candida*, *Trichophyton*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Sclerotinia* и бактерий родов *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Escherichia* и др.

По результатам комплекса из морфологических, биохимических, биофизического и генетического методов определения вида микроорганизма активный изолят Lhv-97 был идентифицирован как *Bacillus mojavensis*.

Произведен подбор эффективных условий культивирования штамма *B. mojavensis* Lhv-97 для максимального получения антимикотических метаболитов. Эффективными источниками углерода и азота согласно экспериментальным данным являются глюкоза и двузамещенный фосфат аммония при температуре культивирования 37 °С и концентрация ДЭ 1г/л.

С соблюдением выше перечисленных условий культивирования штамма *B. mojavensis* Lhv-97 произведена наработка культуральной жидкости для изучения активности действующего вещества и его химической природы.

Исследована устойчивость антифунгальных метаболитов к различным факторам. Вещества устойчивы к нагреванию вплоть до 100 °С и к протеолизу, полностью сохраняя активность.

Подобраны условия выделения и очистки активных метаболитов с использованием ВЭЖХ и эксклюзионной хроматографии, при использовании которых получаемый водный раствор активной фракции содержит минимальное количество органических примесей и имеет кондуктивность 0.59 мСм/см, что позволяет утверждать о низком содержании солей в растворе.

С помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии показано, что очищенная методами ВЭЖХ и эксклюзионной хроматографии активная фракция

состоит из одного основного компонента с молекулярной массой 678,5 Да, а количество примесей составляет менее 5 %.

Исследования продуктов гидролиза активного компонента с помощью ГХ позволили сделать вывод о структуре антимикотического вещества и установить, что вещество, определяющее активность штамма Lhv-97, является аминогликозидом, содержащим два остатка глюкозы, один остаток аминированного циклита C₆, находящегося на конце молекулы, и один остаток легкого полиола. Таким образом, впервые обнаружена продукция бактериями вида *B. mojavensis* антибиотика класса аминогликозидов и продукция бактериями рода *Bacillus* аминогликозида с молекулярной массой свыше 600 Да.

Предложена общая схема производства препаратов с использованием продуцента *B. mojavensis* Lhv-97, включающая приготовление жидких и сухих форм препаратов для применения в медицине и ветеринарии, а также для защиты растений.

Получены альгинатные и хитозановые гранулы с активным компонентом штамма *B. mojavensis* Lhv-97. Установлено, что лиофилизация альгинатных гранул вызывает частичную деструкцию матриксов, сопровождаемую снижением антимикробного потенциала дозированной формы, что не происходило после их конвективного высушивания. Наиболее стабильные результаты по устойчивости к распаду и сохранению антимикробной активности показали варианты альгинатных гранул с хитозановым покрытием.

Получены липосомальные образцы биопрепаратов на основе активного компонента штамма *B. mojavensis* Lhv-97, размеры которых составляют 0,2-20 мкм. Активность липосомальных препаратов возрастала после выдержки их водных суспензий в холодильнике, что демонстрировало выход АМВ из фосфолипидных везикул.

Результаты выполненных исследований позволили выбрать методические подходы к созданию эффективного способа капсулирования антимикробных веществ бациллярного происхождения в качестве доступных моделей при

создании систем контролируемой доставки перспективных лекарственных средств.

Проведены деляночные полевые испытания на яровой мягкой пшенице, которые в отсутствие проявлений инфекций, показали достоверную прибавку урожая на 14,9 % относительно контроля при использовании сухого препарата на основе клеток штамма *B. mojavensis* Lhv-97 (на уровне действия химического препарата Виал ТТ). Деляночные полевые испытания на озимой мягкой пшенице при искусственном инфицировании возбудителями снежной плесени показали достоверное превышение урожайности при использовании экспериментального препарата на основе клеток штамма *B. mojavensis* Lhv-97 более чем в 2,5 раза над инфицированным контролем и более чем в 1,5 раза при использовании химического протравителя Максим экстрим.

Продемонстрирована эффективность жидкого препарата на основе активного компонента штамма *B. mojavensis* Lhv-97 против ротоглоточной кандидозной инфекции иммуносупрессированных белых аутбредных мышей.

Таким образом, по результатам проведенных исследований штамм *B. mojavensis* Lhv-97 может быть рекомендован как продуцент действующего начала биопрепаратов для лечения микозов человека и животных. Также штамм *B. mojavensis* Lhv-97 может использоваться в сельском хозяйстве для борьбы с грибными фитопатогенами.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенного скрининга отобран штамм, проявляющий высокую активность в отношении грибных патогенов человека и животных. Штамм идентифицирован как *Bacillus mojavensis*.

2. Изучены культурально-морфологические и биохимические свойства штамма *B. mojavensis* Lhv-97, показано, что штамм и его метаболиты безопасны для животных.

3. Выявлена различная степень активности штамма *B. mojavensis* Lhv-97 против 36 грибных и 27 бактериальных патогенов человека и животных.

4. Предложен состав питательных сред и условия культивирования штамма *B. mojavensis* Lhv-97 с целью синтеза антимикробных метаболитов.

5. Подобраны условия выделения и очистки антимикотического компонента *B. mojavensis* Lhv-97 с помощью жидкостной хроматографии.

6. Активность штамма *B. mojavensis* Lhv-97 обусловлена веществом из класса аминогликозидов.

7. Разработаны подходы к созданию эффективных способов инкапсулирования антимикотического соединения *B. mojavensis* Lhv-97.

8. Экспериментальный образец биопрепарата на основе клеток *B. mojavensis* Lhv-97 показал эффективность в полевых испытаниях на яровой и озимой пшенице, в том числе при искусственном инфицировании возбудителями снежной плесени.

9. Экспериментальный образец препарата на основе АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 показал эффективность его применения для лечения кандидоза ротовой полости у беспородных белых мышей.

10. На основании результатов проведенных испытаний *B. mojavensis* Lhv-97 может быть рекомендован для создания на его основе биопрепаратов для лечения микозов человека и животных. Также препарат на основе живой культуры Lhv-97 может использоваться в сельском хозяйстве для борьбы с грибными фитопатогенами.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Актуганов, Г.Э. Потенциал некоторых представителей бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus* для разработки антимикотических средств наружного применения в комплексной терапии дерматомикозов / Г.Э. Актуганов, Н.Ф. Галимзянова, А.И. Мелентьев, К.А. Лукманова // 3 съезд микологов России: тез. докл. – М., 2012. – С. 331.
2. Антимикробные и противогрибковые лекарственные средства; под ред. Ю.В. Немытина. – М.: Ремедиум, 2002. – 345 с.
3. Благодатских, И.В. Жидкостная хроматография полимеров: Метод. пособие к задаче спецпрактикума. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2000. – 156 с.
4. Бондаренко, Н.В. Биологическая защита растений. – М.: Агропромиздат, 1986. – 278 с.
5. Бородкина, Л.Е. Противогрибковые препараты: Клинико-фармацевтические аспекты применения: Метод. пособие / Л.Е. Бородкина, Е.В. Волотова, Д.В. Куркин. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2012. – 48 с.
6. Бурова, С.А. Проблемы грибковых заболеваний человека / С.А. Бурова // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 1999. – № 1. – С. 39-41.
7. Буслаева, Г.Н. Роль грибковой инфекции в структуре причин смерти плодов и детей первого года жизни / Г.Н. Буслаева, Л.Н. Каск // Современная микология в России. Первый съезд микологов России: тез. докл. – М., 2002. – С. 352.
8. Веселов, А.В. Системные антимикотики: состояние и перспективы / А.В. Веселов // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 73-80.
9. Веселов, А.В. Эмпирическая превентивная и профилактическая терапия инвазивных микозов: современное состояние / А.В. Веселов // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2009. – Т. 11, № 4. – С. 283-370.

10. Воробьев, А.А. Дисбактериозы у детей: учеб. пособие для врачей и студентов / А.А. Воробьев, С.Г. Пак, К.И. Савицкая. – М.: Медицина, 1998. – 60 с.
11. Гагкаева, Т.Ю. Фузариоз зерновых культур / Т.Ю. Гагкаева, О.П. Гаврилова, М.М. Левитин, К.В. Новожилов. – СПб.: РАСХН, 2011. – 120 с.
12. Гиззатуллина, С.В. Оценка токсико-фармакологических свойств нового противогрибкового средства, содержащего штамм *Bacillus subtilis* ИБ-54 / С.В. Гиззатуллина, К.А. Лукманова, Н.Ф. Галимзянова, А.И. Мелентьев, Г.Э. Актуганов, Г.Е. Ефимов, Н.Х. Салихова, Т.В. Кайданек // Медицинский вестник Башкортостана. – 2010. – Т. 5. - № 6. – С. 92-96.
13. 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. – № 1. – С. 34-36.
14. Грачева, И.В. Современное состояние классификации некоторых патогенных представителей родов *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia* / И.В. Грачева, Т.Б. Караваева, Т.К. Меркулова, О.П. Плотников // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – № 1 (99). – С. 42-49.
15. Грегориадис, Г. Липосомы как носители лекарств. Развитие и будущее концепции. Липосомы в биологических системах: пер. с англ.; под ред. Г. Грегориадис, А. Аллисон. – М.: Медицина. – 1983. – С.36-93.
16. Грязнева, Т.Н. Теоретические и практические основы применения пробиотиков на основе бацилл в ветеринарии. / Т.Н. Грязнева, Г.А. Ноздрин, Б.А. Иванова, А.Г. Ноздрин // Вестник Новосибирского государственного аграрного университета. – 2011. – Т. 5, № 21. – С.87-95.
17. Гуськова, В.П. Хроматографические методы разделения и анализа: учеб. пособие / В.П. Гуськова, Л.С. Сизова; Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет). – 2-е изд., испр. и доп. – Кемерово, 2015. – 158 с.
18. Дунайцев, И.А. Выделение фосфатслюбилизирующих микроорганизмов и изучение возможности их использования в промышленности

и сельском хозяйстве: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Дунайцев Игорь Анатольевич. Оболенск, 2010. – 186 с.

19. 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. – 2008. – Т. 42, вып. 3. – С. 264-269.

20. Егоров, Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 217 с.

21. Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках. – Изд. 6-е, перераб. и доп. – М.: Наука, 2004. – 229 с.

22. Ефименко, Т.А. Противогрибковая и антибактериальная активность штамма *Bacillus subtilis* 534 – основы пробиотического лекарственного препарата споробактерина / Т.А. Ефименко, В.А. Зенкова, И.А. Маланичева, И.Г. Сумарукова, О.В. Ефременкова, Н.И. Габриэлян, Е.М. Горская, Т.В. Крупенио, В.Ф. Евлашкина, Д.С. Давыдов // Успехи медицинской микологии. – 2016. – Т. 16. – С.125-128.

23. Заворотный, В.Л. Учебное пособие по курсу «Аналитическая химия» (Хроматография) / В.Л. Заворотный, Н.А. Калачева, Н.К. Зайцев. – М., 2005. – 33 с.

24. Иващенко, В.Г. Фузариоз колоса пшеницы и початков кукурузы: устойчивость как базисная стратегия защиты // Материалы II Всероссийского съезда по защите растений «Фитосанитарное оздоровление экосистем». Т. 1. – СПб., 2005. – С. 454-456.

25. Инфекционные болезни животных; под ред. А. А. Сидорчука. – М.: КолосС, 2007. – 671 с.

26. Карасек, Ф. Введение в хромато-масс-спектрометрию: пер. с англ. / Ф. Карасек, Р. Клемент. – М.: Мир, 1993. – 237 с.

27. Климко, Н.Н. Микозы: диагностика и лечение: руководство для врачей. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: Виджи Групп, 2008. – 336 с.

28. Кононенко, Г.П. Рекомендации по микотоксикологическому контролю фузариозного зерна фуражного назначения / Г.П. Кононенко, Л.С. Малиновская, Е.А. Пирязева // Ветеринарный консультант. – 2005. – № 23-24. – С. 3-10.

29. Котрехова, Л.П. Этиология, клиника, лечение дерматомикозов у больных сахарным диабетом / Л.П. Котрехова, К.И. Разнатовский // Проблемы медицинской микологии – 2005.– Т.7, № 4.– С. 13-18.

30. Криг, Н. Определитель бактерий Берджи: в 2 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.

31. Кудоярова, Г.Р. Образование фитогормонов почвенными и ризосферными бактериями как фактор стимуляции роста растений / Г.Р. Кудоярова, И.К. Курдиш, А.И. Мелентьев // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2011. – № 3-4. – С. 5-15.

32. Кузнецова, Л.С. Антимикотическая защита поверхности продуктов питания / Л.С. Кузнецова // Успехи медицинской микологии. – 2003. – Т. 1, № 1. – С. 145.

33. Левитин, М.М. Сравнительный анализ популяций *Fusarium graminearum* Schwabe, выделенных с разных органов озимой пшеницы / М.М. Левитин, Т.Ю. Гагкаева // Микология и фитопатология. – 1991. – № 1. – С. 73-79.

34. Леонов, А.Г. Содержание трихотеценов в колосьях и соломе пшеницы сорта Обрий, пораженной фузариозом, в момент уборки / А.Г. Леонов, Т.П. Кононенко, Н.А. Соболева // Микология и фитопатология. – 1989. – Т. 23, № 2. – С. 147-151.

35. 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. – 2001. – Уфа: Гилем. – 66 с.

36. Логинов, О.Н. Биосинтез низкомолекулярных метаболитов бактериями *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 / О.Н. Логинов, С.П. Четвериков // Biotechnology in Russia. – 2003. – № 5. – С. 20-24.

37. Лугаускас А. Продуцирующие токсины микромицеты на пищевых продуктах растительного происхождения / А. Лугаускас, Ю. Стакенене // Успехи медицинской микологии. – 2003. – Т. 1, № 1. – С.152-153.

38. Лукманова, К.А. Антагонистическая активность бактерий рода *Bacillus* в отношении грибов дерматофитов / К.А. Лукманова, С.В. Гиззатуллина, Р.Ш. Магазов, А.И. Мелентьев, Н.Ф. Галимзянова, Г.Э. Актуганов // ЖМЭИ. – 2008. – № 4. – С. 21-22.

39. Львова, Л.С. Особенности образования дезоксиниваленола и зеараленона в зерне пшеницы, пораженной фузариозом колоса / Л.С. Львова, О.И. Кизленко, А.П. Шульгина, О.Д. Омельченко // Микология и фитопатология. – 1997. – Т. 31, № 6. – С. 52-58.

40. Мартынова, Е.А. Биологические эффекты фумонизинов и контаминация ими зернопродуктов / Е.А. Мартынова, О.Б. Иванченко. – Казань, 2004. – 116 с.

41. Машковский, М. Д. Лекарственные средства. Т. 2. – М.: Медицина, 1988. – 688 с.

42. Митрофанов, В.С. Системные антифунгальные препараты // Проблемы медицинской микологии. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 6-14.

43. Монастырский, О.А. Виды фузариум, способные синтезировать микотоксин – фумонизин В1 // Вестник РАСХН. – 1998. – № 4. – С. 47-49.

44. Монастырский, О.А. Влияние фунгицидов на образование токсинов штаммами видов *Fusarium* при заражении зерна пшеницы // Доклады РАСХН. – 1995. – № 2. – С. 21-22.

45. Новикова, И.И. Биологическое обоснование создания и применения полифункциональных биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем: автореф. дис... д-ра биол. наук: 06. 01. 11 / Новикова Ирина Игоревна. – СПб. – 2005.– 45 с.

46. Новоселов А.В., Новоселов В.С. Новые аспекты в проблеме выбора современного антимикотика // Рус. мед. журн. – 2004. – №18. – С. 1047-1051.

47. Павлюшин, В.А. Новые комплексные биопрепараты для защиты овощных культур от грибных и бактериальных болезней / В.А. Павлюшин,

С.Л. Тютерев, Э.В. Попова, И.И. Новикова, Г.А. Быкова, Н.С. Домнина // Биотехнология. – 2010. – № 4. – С. 69-80.

48. Пат. 2270858 Российская Федерация, МПК⁷ C12N1/20, C12P21/04, C12R1/125. Штамм бактерий *B. subtilis* – продуцент сурфактина / Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю., Яковлева О.В., Курченко В.П.; заявитель и патентообладатель Институт биологии Уфимского научного центра РАН. – 2004110414/13; заявл. 03.03.2004; опубл. 27.02.2006.

49. Пат. 2451068 Российская Федерация, МПК⁷ C12N1/20, A01N63/00. Фосфатрастворяющий штамм *Acinetobacter species* 305 с фунгицидными свойствами / Дунайцев И.А., Клыкова М.В., Кондрашенко Т.Н., Жиглецова С.К., Старшов А.А., Бойко А.С., Дятлов И.А.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии». – 2010143690/10; заявл. 27.10.2010; опубл. 20.05.2012, Бюл. № 14.

50. Пат. 2451069 Российская Федерация, МПК⁷ C12N1/20, A01N63/00. Фосфатрастворяющий штамм *Pseudomonas species* 181a с фунгицидными свойствами / Дунайцев И.А., Клыкова М.В., Кондрашенко Т.Н., Сомов А.Н., Старшов А.А., Аитов Р.С., Дятлов И.А.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии». – 2010143691/10; заявл. 27.10.2010; опубл. 20.05.2012, Бюл. № 14.

51. Пат. 2603281 Российская Федерация, МПК⁷ C12N1/20, A01N63/00. Фосфатрастворяющий штамм *Pseudomonas chlororaphis ssp. chlororaphis* Vsk-26a3, обладающий фунгицидной и бактерицидной активностью / Клыкова М.В., Дунайцев И.А., Жиглецова С.К., Кондрашенко Т.Н., Лев И.О., Сосна И.М., Торголина И.В., Варламова Т.А.; заявитель и патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии». – 2015152834/10; заявл. 09.12.2015; опубл. 27.11.2016; Бюл. № 33.

52. Поляк, М.С. Питательные среды для медицинской микробиологии / М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич. – СПб.: НИЦФ, 2002. – 80 с.
53. Попова, Л.М. Химические средства защиты растений: учеб. пособие / Л.М. Попова. – СПб.: СПбГТУРП, 2009. – 96 с.
54. Похиленко, В.Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность / В.Д. Похиленко, В.В. Перелыгин // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2-3. – С. 32-33.
55. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии; под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – Смоленск: МАКМАХ, 2007. – 464 с.
56. Романенко, А.А. Новая сортовая политика и сортовая агротехника озимой пшеницы / А.А. Романенко, Л.А. Беспалова, И.Н. Кудряшов, И.Б. Аблова. – Краснодар: КНИИСХ, 2005. – 224 с.
57. Сакодынский, К.И. Аналитическая хроматография / К.И. Сакодынский, В.В. Бражников, С.А. Волков, В.Ю. Зельвенский, Э.С. Ганкина, В.Д. Шатц. – М.: Химия, 1993. – 464 с.
58. Сергеев, А.Ю. Грибковые инфекции: руководство для врачей / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев. – М.: ООО «Бином–пресс», 2003. – 440 с.
59. Сергеев, А.Ю. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев. – М.: Триада-Х, 2001. – 472 с.
60. Смирнов, В.В. Микотоксины: фундаментальные и прикладные аспекты / В.В. Смирнов, А.М. Зайченко, И.Г. Рубежняк // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. – 2006. – № 11. – С. 14-18.
61. Смирнов, В.В. Бактерии рода *Pseudomonas* / В.В. Смирнов, Е.А. Киприанова. – Киев: Наукова думка, 1990. – 264 с.
62. Соколов, М.С. Агротехногенные факторы минимизации вредоносности фузариоза колоса пшеницы / М.С. Соколов, Л.В. Коломбет // Агрехимия. – 2007. – № 12. – С. 63-80.

63. Соколов, М.С. Проблема фузариоза пшеницы / М.С. Соколов, Г.А. Жариков, В.И. Терехов // Агро XXI. – 2000. – № 1. – С. 2-4.

64. Соколова, Г.Д. Влияние степени токсиногенеза *Fusarium graminearum* на поражение озимой пшеницы фузариозом колоса / Г.Д. Соколова, В.В. Павлова, Л.Л. Дорофеева, Г.А. Девяткина, В.А. Кожуховская // Микология и фитопатология. – 1999. – Т. 23, № 2. – С. 125-129.

65. Сорокулова, И.Б. Споровые пробиотики / И.Б. Сорокулова, И.Г. Осипова, Е.А. Васильева, Н.А. Михайлова, А.А. Гайдеров // ЖМЭИ. – 2003. – N 3. – С.113-119.

66. Стейниер, Р. Мир микробов; пер. с англ. / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм – М.: Мир. – Т. 3. – 486 с.

67. Труфанов, О.В. НТ-2 токсикоз курчат // Ветеринарна медицина України. – 2008. – № 8. – С. 32-35.

68. Тутельян, В.А. Микотоксины (медицинские и биологические аспекты) / В.А. Тутельян, Л.В. Кравченко. – М.: Медицина, 1985. – 320 с.

69. Харвуд, К. Бациллы. Генетика и биотехнология / К. Харвуд. – М.: Мир, 1992. – 472 с.

70. Харкевич Д.А. Фармакология: учебник для студентов мед. вузов / Д.А. Харкевич -М.: Медицина. – 2006. – 736 с.

71. Хотимченко, Ю.С. Фармакология некрахмальных полисахаридов / Ю.С. Хотимченко, И.М. Ермак, А.Е. Бедняк // Вестник ДВО РАН. – 2005. – № 1. – С. 72-82.

72. Царев, Н.И. Практическая газовая хроматография: учеб.-метод. пособие для студентов химического факультета по спецкурсу «Газохроматографические методы анализа» / Н.И. Царев, В.И. Царев, И.Б. Катраков. – Издательство Алтайского государственного университета, Барнаул, 2000. – 156 с.

73. Чкаников, Д.И. Влияние некоторых фунгицидов на содержание 13 микотоксинов в зерне озимой пшеницы / Д.И. Чкаников, Г.Д. Соколова, Г.А. Девяткина, В.В. Павлова, В.А. Кожуховская // Агрехимия. – 1997. – № 4. – С.49-50.

74. Шаповалова, Е.Н. Хроматографические методы анализа: Метод. пособие для специального курса / Е.Н. Шаповалова, А.В. Пирогов. – М.: МГУ. – 2010. – 211 с.
75. Шлегель, Г. Общая микробиология: пер. с нем. – М.: Мир, 1987 – 566 с.
76. Штерншис, М.В. Тенденции развития биотехнологии микробных средств защиты растений в России // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2012. – № 2 (18). – С. 92-100.
77. Ямсков, И.А. Новые липосомальные формы противогрибковых антибиотиков, модифицированные амфифильными полимерами / И.А. Ямсков, А.Н. Кусков, К.К. Бабиевский // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44, № 6. – С. 688-693.
78. Abu-Elteen, K.H. Changing Epidemiology of Classical and Emerging Human Fungal Infections: A Review / K.H. Abu-Elteen, M.A. Hamad // Jordan Journal of Biological Sciences. – 2012. – Vol.5, N 4. – P. 215-230.
79. Aktuganov, G. Isolation and identification of cyclic lipopeptides from *Paenibacillus ehimensis* strain ib-x-b / G. Aktuganov, A. Melentjev, N. Galimzianova, L. Kuzmina, J. Jokela, H. Kivelä, E. Khalikova, T. Korpela P., Kouvonen, J.-P. Himanen, P. Susi // J. Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. – 2014. – Vol. 973. – P. 9-16.
80. Aminoglycoside antibiotics; ed. by H. Umesawa, I.R. Hooper. – Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1982. – 369 p.
81. Aoyama, M. Sequence of the gene encoding an alkaline serine proteinase of *Bacillus pumilus* TYO-67 / M. Aoyama, C. Toma, M. Yasud, M. Iwanaga // Microbiol Immunol. – 2000. – Vol. 44, N 5. – P. 389-393.
82. Bai, G. Scab of wheat: prospects for control / G. Bai, G. Shaner // Plant Disease. – 1994. – Vol. 78. – P. 760-766.
83. Bashan, Y. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013) / Y. Bashan, L.E. de-Bashan, S.R. Prabhu, J.P. Hernandez // Plant Soil. – 2014. – Vol. 278. – P. 1-33.

84. Berdy, J. Bioactive microbial metabolites – A personal view // *J. Antibiot.* – 2005. – Vol. 58. – P. 1-26.
85. Blakeman, J.P. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. *Biological control on the phylloplane*; ed. by C.E. Windels, S.E. Lindow. – Minnesota (USA): APS Press, 1985. – P. 7-30.
86. Borman, A.M. Comparative pathogenicity of United Kingdom isolates of the emerging pathogen *Candida auris* and other key pathogenic *Candida* species / A.M. Borman, A. Szekely, E.M. Johnson // *mSphere.* – 2016. – Vol. 1, N 4. – P. e 00189-16.
87. Boyd, M.A. Comparison of API 50 CH Strips to Whole-Chromosomal DNA Probes for Identification of *Lactobacillus* Species / M.A. Boyd, M.A.D. Antonio, S.L. Hillier // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. – P. 5309-5311.
88. Calvo, B. First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia / B. Calvo, A.S. Melo, A. Perozomena // *J. Infect.* – 2016. – Vol. 73. – P. 369-74.
89. Cern, A. Quantitative structure – property relationship modeling of remote liposome loading of drugs / A. Cern, A. Golbraikh, A. Sedykh, A. Tropsha, Y. Barenholz, A. Goldblum // *J. Controlled Release.* – 2012. – Vol. 160. – P. 147-157.
90. Chowdhary, A. New clonal strain of *Candida auris* / A. Chowdhary, C. Sharma, S. Duggal // *Emerg Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 19. – P. 1670-1673.
91. Chun, J. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences / J. Chun, J.H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B.K. Kim, Y.W. Lim // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 57. – P. 2259-2261.
92. De Boer, W. Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria / W. De Boer, P.J.A. Klein Gunnewiek, P. Lafeber, J.D. Janse, B.E. Spit, J.W. Woldendorp // *Soil Biol. and Biochem.* – 1998. – Vol. 30. – P. 193-203.
93. Dixon, P.N. Role of *Candida albicans* Infection in Napkin Rashes / P.N. Dixon, R.P. Warin, M.P. English // *British Medical Journal.* – 1969. – Vol. 2. – P. 23-27.

94. D'Mello, J.P.F. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity / J.P.F. D'Mello, C.M. Placinta, A.M.C. Macdonald // *Animal Feed Science and Technology*. – 1999. – Vol. 80. – P. 183-205.
95. Forsyth, O.M. Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine / O.M. Forsyth, T. Yoshizawa, N. Morooka, J. Tuite // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1977. – Vol. 34. – P. 547-552.
96. Friend, D.W. Effect of adding potencial vomitoxin (deoxinivalenol) detoxicant or *Fusarium graminearum* inoculated corn supplement wheat diets fed to pigs / D.W. Friend, H.L. Trenholm, J.C. Young // *Canadian J. Animal Sc.* – 1984. – Vol. 64, N 3. – P. 733-741.
97. Gareis, M. Influence of the fungicide Matador (tebuconazole /triadimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmorum* / M. Gareis, J. Ceynowa // *Lebensmittel-Untersuchung-Forsch.* – 1994. – Vol. 198. – P. 244-248.
98. Gilchrist, L. Fusarium head blight / L. Gilchrist, H.J. Dubin. // *Bred wheat improvement and production*. – Rome, 2002. – P. 279-283.
99. Gill, D. A review of the epidemiology of tinea unguinum in the community / D. Gill, R. Marks // *Austral. J. Dermatol.* – 1999. – Vol. 40, N 1. – P. 6-13.
100. Gupta, R. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications / R. Gupta, Q.K. Beg, P. Lorenz // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2002. – Vol. 59, N 1. – P.15-32.
101. Hagler, W.M. Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen? / W.M. Hagler, N.R. Towers, C.J. Mirocha, R.M. Eppley, W.L. Bryde // *Fusarium* Paul E. Nelson Memorial Symposium; ed. by B.A. Summerel [et al.]. – St. Paul, Minnesota: APS Press, 2003. – P. 321-331.
102. Harman, G.E. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review* / G.E. Harman, C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, M. Lorito // *Microbiology*. – 2004. – Vol. 2. – P. 43-55.

103. Henderson J. R. Fluconazol – a significant advance in the management of human fungal disease // *Discovery, Development and Evaluation of Antifungal Agents*; ed. by A. Framtung. – 1987. – P. 77-79.
104. Hermanson G. *Bioconjugate Techniques*. – 2nd ed. – San Diego, USA: Academic Press, 1996. – 785 p.
105. Homdork, S. Effects of field application of tebuconazole on yield, yield components and the mycotoxin content of *Fusarium*-infected wheat grain / S. Homdork, H. Fehrmann, R. Beck // *J. Phytopathol.* – 2000. – Vol. 148. – P. 1-6.
106. Husain, S. Changes in the spectrum and risk factors for invasive candidiasis in liver transplant recipients: prospective, multicenter, case-controlled study / S. Husain, J. Tollemar, E.A. Dominguez // *Transplantation*. – 2003. – Vol. 75. – P. 2023-2029.
107. Jochum, C.C. *Fusarium* head blight biological control with *Lysobacter enzymogenes* strain C3 / C.C. Jochum, L.E. Osborne, G.Y. Yuen // *Biological Control*. – 2006. – Vol. 39. – P. 336-344.
108. Kawasaki, Y. Aminoglycosides and syringomycin E as fungicides against *Fusarium graminearum* in head blight disease // *All Graduate Theses and Dissertations*. – 2008. – 67 p.
109. Le Marrec, C. Biochemical and genetic characterization of coagulins, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I4 / C. Le Marrec, B. Hyronimus, P. Bressollier, B. Verneuil, M.C. Urdaci // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – P. 5213-5120.
110. Lee, H. B. Activity of some aminoglycoside antibiotics against true fungi, *Phytophthora* and *Pythium* species / H.B. Lee, Y. Kim, J.C. Kim, G.J. Choi, S.H. Park, C.J. Kim, H.S. Jung // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – Vol. 99. – P. 836-843.
111. Levitin, M. Toxigenic fungi and mycotoxins in cereals grain and food in Russia // *An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe*; ed. by A. Logrieco, A. Visconti. – Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publ., 2004. – P. 195-199.

112. Llewellyn, N.M. Biosynthesis of butirosin: transfer and deprotection of the unique amino acid side chain / N.M. Llewellyn, Y. Li, J.B. Spencer // *Chem Biol.* – 2007. – Vol. 14, N 4. – P. 379-386.
113. Luo, Y. Biological control of *Fusarium* head blight (FHB) of wheat by *Bacillus* strains / Y. Luo, B. Bleakley // *Proceedings of the 1999 National Fusarium Head Blight Forum.* – USA, 1999. – P. 60.
114. Magan, N. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment / N. Magan, R. Hope, A. Colleate, E.S. Baxter // *Eur. J. Plant Path.* – 2002. – Vol. 108. – P. 685-690.
115. Magobo, R.E. *Candida auris*-associated candidemia, South Africa / R.E. Magobo, C. Corcoran, S. Seetharam, N.P. Govender // *Emerg Infect.* – 2014. – Vol. 20. – P. 1250-1251.
116. Malcolm, T.R. Chin-Hong Endemic Mycoses in Immunocompromised Hosts / T.R. Malcolm, V. Peter // *Curr Infect Dis Rep.* – 2013. – Vol. 15, N 6. – P. 536-543.
117. Maragos, C.M. Quantitation and stability of fumonisins B1 and B2 in milk / C.M. Maragos, J.L. Richard // *J. Assoc. Offic. Analyt. Chem.* – 1994. – Vol. 77, N 5. – P. 1162-1167.
118. Marasas, W.F.O. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective // *Environ. Health Perspect.* – 2001. – Vol. 109. – P. 239-243.
119. Miller, J.D. Deoxynivalenol: A 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance / J.D. Miller, J.W. Apsimon, B.A. Blackwell, R. Greenhalgh, A. Taylor // *Fusarium Paul E. Nelson Memorial Symposium*; ed. by B.A. Summerel. – St. Paul, Minnesota: APS Press, 2003. – P. 310-320.
120. Nakamura, L. K. *Bacillus amylolyticus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus lautus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus pabuli* sp. nov., nom. rev. and *Bacillus validus* sp. nov., nom. rev. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1984. – Vol. 34. – P. 224-226.
121. Oldenburg, E. Effects of strobilurin containing fungicides on the deoxynivalenol content in winter wheat / E. Oldenburg, J. Weinert, G.A. Wolf // *Mycotoxin Res.* – 2001. – Vol. 17, N 1. – P. 10-14.

122. Pan, J. Gene Cloning and Expression of an Alkaline Serine Protease with Dehairing Function from *Bacillus pumilus* / J. Pan, Q. Huang, Y. Zhang // Current Microbiology. – 2004. – Vol. 49, N 3. – P. 165-169.

123. Patent USA N 3541078, issued Nov. 15, 1970, Amine compounds and methods for their production. P.W.K. Woo, G.L. Coffey, H.W. Dion.

124. Pinchuk, I.V. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics / I.V. Pinchuk, P. Bressollier, B. Verneuil, B. Fenet, I.B. Sorokulova, F. Megraud, M.C. Urdaci // Antimicrob. Agents and Chemother. – 2001. – Vol. 45. – P. 3156-3161.

125. Priest, F.G. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. / F.G. Priest, M. Goodfellow, L.A. Shute, R.C.W. Berkeley // Int J Syst Bacteriol. – 1987. – Vol. 37, N 1. – P. 69-71.

126. Raaijmakers, J.M. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents / J.M. Raaijmakers, M. Vlami, J.T. De Souza // Anton. van Leeuw. – 2002. – Vol. 81. – P. 537-547.

127. Rao, M.B. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases / M.B. Rao. A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, V.V. Deshpande // Microbiol Mol Biol Rev. – 1998. – Vol. 62, N 3. – P. 597-635.

128. Roberts, W.K. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity / W.K. Roberts, C.P. Selitrennikoff // J. Gen.Microbiol. – 1988. – Vol. 134. – P. 169-176.

129. Samanta, P. Complications of invasive mycoses in organ transplant recipients / P. Samanta, N. Singh // Expert Rev. Anti Infect. Ther. – 2016. – Vol. 14, N 12. - P. 1195-1202.

130. Sardi, J.C.O. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options / J.C.O. Sardi, L. Scorzoni, T. Bernardi, A.M. Fusco-Almeida, M.J.S. Mendes Giannini // Journal of Medical Microbiology. – 2013. – Vol. 62. – P. 10-24.

131. Sardi, J.C.O. A Mini Review of *Candida* Species in Hospital Infection: Epidemiology, Virulence Factor and Drugs Resistance and Prophylaxis / J.C.O. Sardi,

N.S. Pitangui, F.P. Gullo, A. M. Fusco-Almeida, M.J.S. Mendes Giannini // *Tropical Medicine & Surgery*. – 2013. – Vol. 1, N 5. – P. 1-7.

132. Satoh, K. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital / K. Satoh, K. Makimura, Y. Hasumi, Y. Nishiyama, K. Uchida, H. Yamaguchi // *Microbiol. Immunol.* – 2009. – Vol. 53. – P. 41-44.

133. Sharp, R.J. Phenotypic and genotypic characterization of some thermophilic species, of *Bacillus* / R.J. Sharp, K.J. Brown, A. Atkinson // *J Gen Microbiol.* – 1980. – Vol. 117. – P. 201-210.

134. Shrestha, S. Membrane lipid-modulated mechanism of action and non-cytotoxicity of novel fungicide aminoglycoside FG08 / S. Shrestha, M. Grilley, M.Y. Fosso, C.W. Chang, J.Y. Takemoto // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 10, N 8 (9). – e73843.

135. Shrestha, S.K. Antifungal amphiphilic aminoglycoside K20: bioactivities and mechanism of action / S.K. Shrestha, C.W. Chang, N. Meissner, J. Oblad, J.P. Shrestha, K.N. Sorensen, M.M. Grilley, J.Y. Takemoto // *Front Microbiol.* – 2014. – Vol. 5, N 5. – P. 671-673.

136. Silveira E.P. Cryptococcosis in liver and kidney transplant recipients receiving anti-thymocyte globulin or alemtuzumab. / E.P. Silveira, S. Husain, E.J. Kwak // *Transplant Infect Dis.* – 2007. – Vol. 9. – P. 22-27.

137. Šíp, V. The impact of cultivar resistance and fungicide treatment on mycotoxin content in grain and yield losses caused by *Fusarium* head blight in wheat / V. Šíp, J. Chrpová, O. Veškrna, L. Bobková // *Czech J. of Genetics and Plant Breeding*. – 2010. – Vol. 46. – P. 21-26.

138. Smith, J.S. Occurrence and fate of fumonisins in beef / J.S. Smith, R.A. Thakur // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1996. – Vol. 392. – P. 39-55.

139. Vallabhaneni, S. Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus – United States, May 2013-August 2016 / S. Vallabhaneni, A. Kallen, S. Tsay, N. Chow, R.

Welsh, J. Kerins // Morbidity and Mortality Weekly Report. – 2016. – Vol. 65. – P. 1234-1237.

140. Solis, N.V. Mouse model of oropharyngeal candidiasis / N.V. Solis, S.G. Filler // Nature Protocols. – 2012. – Vol. 7. – P. 637-642.

141. Sorokulova, I. Modern Status and Perspectives of Bacillus Bacteria as Probiotics // J Prob Health. – 2013. – Vol. 1. – P.106.

142. Stein, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions // Mol Microbiol. – 2005. – Vol. 56. – P. 845-857.

143. Stockwell, C.A. Identification of bioprotectants for control of *Gibberella zeae* / C.A. Stockwell, G.C. Bergstrom, W.C. da Luz // Proceedings of the National Fusarium Head Blight Forum. – USA, 2000. – P. 114-117.

144. Ueno, Y. Developments in Food Science. IV Trichothecenes: chemical, biological and toxicological aspects // General toxicity. – Tokyo: Kodansha, Amsterdam: Elsevier, 1983. – P. 135-146.

145. Van Hal, S.J. Candidemia following solid organ transplantation in the era of antifungal prophylaxis: the Australian experience / S.J. van Hal, D.J. Marriott, S.C. Chen // Transpl Infect Dis. – 2009. – Vol. 11, N 2. – P.122-127.

146. Varshosaz, J. Effect of citric acid as cross-linking agent on insulin loaded chitosan microspheres / J. Varshosaz, R. Alinagari // Iranian Polymer Journal. – 2005. – Vol. 14, N 7. – P. 647-656

147. Weller, D.M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years // Phytopathology. – 2007. – Vol. 97, N 2. – P. 250-256.

148. Wells, J.A. Cloning, sequencing and secretion of Bacillus amyloliquefaciens subtilisin in Bacillus subtilis / J.A.Wells, E. Ferrari, D.J. Henner, D.A. Estell, E.Y. Chen // Nucleic Acids Research. – 1983. – Vol.11. – P. 7911- 7925.

149. Wolf, J. Taxonomic and related aspects of thermophiles within the genus Bacillus, in: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria: Classification and Identification / J. Wolf, R.J. Sharp; ed. by R.C.W. Berkeley, M. Goodfellow // Academic Press. – London, 1981. – P. 251-296.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

а) статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Похиленко, В.Д. Имобилизация антимикробных веществ бактериального происхождения в полимерные матриксы и оценка их свойств / В.Д. Похиленко, И.А. Дунайцев, В.В. Перелыгин, **И.О. Лев**, Т.А. Калмантаев // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – 10 с. DOI 10.17513/spno.25472.

2. Дунайцев, И.А. Эффективность использования штамма *Bacillus thuringiensis* для повышения урожайности пшеницы / И.А. Дунайцев, **И.О. Лев**, М.В. Клыкова, С.К. Жиглецова, О.А. Антошина, Л.В. Коломбет // Агрехимия. – 2017. – № 4. – С. 76-82.

б) патенты:

3. Пат. 2603281 Российская Федерация, МПК⁷ C12N1/20, A01N63/00. Фосфатрастворяющий штамм *Pseudomonas chlororaphis ssp. chlororaphis* Vsk-26a3, обладающий фунгицидной и бактерицидной активностью / Клыкова М.В., Дунайцев И.А., Жиглецова С.К., Кондрашенко Т.Н., Лев И.О., Сосна И.М., Торголина И.В., Варламова Т.А.; заявитель и патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии». – 2015152834/10; заявл. 09.12.2015; опубл. 27.11.2016; Бюл. № 33.

4. Заявка на патент РФ № 2017128916. Штамм бактерий *Bacillus thuringiensis* Lhv-97, обладающий фунгицидной и бактерицидной активностью / И.А. Дунайцев, **И.О. Лев**, М.В. Клыкова, С.К. Жиглецова, И.М. Сосна, И.В. Торголина, Т.А. Варламова.

в) статьи в других рецензируемых изданиях

5. 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.

6. **Лев, И.О.** Возможности использования низкомолекулярных пептидов, биосурфактантов, и бактериальных метаболитов в качестве природных антимикробных средств / **И.О. Лев**, И.А. Дунайцев, В.Д. Похиленко // Наука и хозяйство. – 2015. – № 10. – С. 20-24.

7. Похиленко, В.Д. Найти свой путь в биотехнологии / В.Д. Похиленко, М.Н. Мартовецкий, **И.О. Лев** // Научград. Наука, производство, общество. – 2016. – № 3. – С. 15-21.

8. **Лев, И.О.** Антимикробные свойства низкомолекулярных пептидов, биосурфактантов и метаболитов из некоторых видов энтерококков и бацилл / **И.О. Лев**, И.А. Дунайцев, В.Д. Похиленко // В сб.: Актуальные вопросы развития современного общества, сборник научных статей по материалам I Международной научно-практической конференции 15 мая 2016 г., г. Пермь. – С. 57-62.

г) тезисы докладов на научных конференциях:

9. **Лев, И.О.** Поиск бацилл, активных в отношении грибных патогенов. / **И.О. Лев**, И.А. Дунайцев, М.В. Клыкова, Н.С. Ларина, С.К. Жиглецова // Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т.15, № 2. – С.97.

10. 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.

11. **Лев, И.О.** Оптимизация синтеза антифунгальных метаболитов *Geobacillus thermoglucosidasius* / **И.О. Лев**, И.А. Дунайцев, М.В. Клыкова, С.К. Жиглецова, Т.Н. Кондрашенко // Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины». – Ставрополь. – 2014. – С. 128-129.

12. **Лев, И.О.** Получение, очистка и первичная характеристика антифунгального вещества, продуцируемого штаммом *Bacillus mojavensis* Lhv-97 / **И.О. Лев**, И.А. Дунайцев, В.Д. Похиленко // Материалы IX международного

конгресса: Биотехнология: состояние и перспективы развития 20-22 февраля 2017. – Москва, Гостинный Двор. – 2017. – Т. 1. – С. 186-187.

13. **Лев, И.О.** Подбор условий выделения и очистки нового антимикотического метаболита штамма *Bacillus mojavenensis* и определение его структуры /

И.О. Лев, С.К. Жиглецова, А.В. Ариповский, И.А. Дунайцев, А.К. Сурин, М.В. Клыкова // Современная микология в России (тезисы докладов 4 съезда микологов России). – 2017. – Т.7. – С. 240-242.

14. Дунайцев, И.А. Разработка инкапсулированных форм на основе антигрибных веществ бактериального происхождения / И.А. Дунайцев, **И.О. Лев, А.Н. Сомов, М.В. Клыкова, В.Д. Похиленко, В.В. Перелыгин, Е.М. Хаков** // Современная микология в России (тезисы докладов 4 съезда микологов России). – 2017. – Т. 7. – С. 223-225.

Приложение А

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

академик РАН, д-р мед. наук, проф.

И.А. Дятлов

2017 г.



ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на получение антимикробного комплекса АМВ-97 с использованием

продуцента *Bacillus mojavensis* Lhv-97

ЛР 78095326-188-2017

Приложение Б

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



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.

Тест- культура: яровая мягкая пшеница сорт Агата.

Испытываемые экспериментальные образцы биопрепаратов:

Экспериментальные образцы – в виде сухих порошков, приготовлены на основе штаммов Vsk 26a3 и Lhv 97, выделенных из природных источников.

Способ внесения: Обработка семян перед посевом. За 2 часа до посева увлажненные семена опудривались сухими порошками экспериментальных препаратов.

Vsk 26a3 (1,0 кг/т) норма обработки – 0,024 г/ на 1 г зерна

Vsk 26a3 (0,5 кг/т) норма обработки – 0,012 г/ на 1 г зерна

Lhv 97(0,5 кг/т) норма обработки – 0,012 г/ на 1 г зерна

Lhv 97 (0,25 кг/т) норма обработки – 0,06 г/ на 1 г зерна

Таблица 1- Схема полевого опыта № 1

№ варианта	Обработка перед посевом
1 (Контроль)	нет
2 (Эталон хим)	Виал ТТ 0,4 л/т
3 (Эталон био)	Фитоспорин 0,5 кг/т
4	Vsk 26a3 1,0 кг/т
5	Vsk 26a3 0,5 кг/т
6	Lhv 97 0,5 кг/т
7	Lhv 97 0,25 кг/т

Обозначения:

Эталон химический Виал ТТ – высокоэффективный системный двух-компонентный 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. Норма обработки 0,4 л/т.

Эталон биологический Фитоспорин (0,5 кг/т) – за 2 часа до посева опудривались увлажненные семена. Норма обработки – 0,012 г/ на 1 г зерна.

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

При проведении испытаний использовали основные методики и схемы, общепринятые в селекционных, научно-исследовательских учреждениях и Государственном сортоиспытании.

Биологическую эффективность экспериментальных образцов бактериальных микроорганизмов оценивали по следующим показателям:

-урожайность (т/га);

-содержание белка в зерне (%);

- содержание сырой клейковины (%);
- качество клейковины по ее способности сопротивляться.

Фенологические наблюдения и учеты проводили по методике ГСИ зерновых культур (1989 г.).

Определяли число всходов на 1 м² в фазу полных всходов. На двух смежных повторениях с закладкой 3 –х пробных площадок по диагонали для определения густоты стояния растений.

Поражение мучнистой росой отмечали в фазу кущения (начало) и колошения, когда оно бывает в максимуме; бурой ржавчины - в фазу налива зерна.

Методика оценки на устойчивость к мучнистой росе:

- 0% - абсолютно устойчивые, на листьях нет подушечек мучнистой росы;
- 10% - устойчивые: несколько изолированных подушечек мучнистой росы на нижних листьях;
- 30% - слабое поражение: заселение поверхности листа на 10-15%, поражено три нижних листа;
- 50% - среднее поражение: на нижних листьях площадь, занятая возбудителем составляет 25-50%, средний ярус слабо поражен;
- 70% - сильное поражение: площадь листьев нижнего и среднего ярусов, занятая возбудителем составляет 50-70%;
- 100% - очень сильное поражение: сильно поражены листья во всех трех ярусах, процент занятой грибами поверхности составляет 80-100%.

Методика оценки на устойчивость к бурой листовой ржавчине (на естественном фоне). Учет вели по двум верхним листьям.

- 0-5% - очень слабое поражение;
- 10-15% - слабое;
- 25-30% - среднее;
- 50-70% - сильное;
- 70-100% - очень сильное.

Устойчивость к неблагоприятным факторам среды и полеганию определяли визуально по пятибалльной шкале:

- 1 - очень сильное полегание, машинная уборка невозможна;
- 2 - сильное полегание, затрудняющее уборку;
- 3 - среднее - стебли наклонены приблизительно на 45°;
- 4 - слабое - стебли слегка наклонены;
- 5 - полегания нет, стебли стоят вертикально.

Структуру урожая анализировали согласно Методике ГСИ зерновых культур (Москва, 1989). 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, масса зерна с колоса.

Статистическую обработку данных наблюдений выполняли по Б.А. Доспехову (1979).

3. Агротехника и метеоусловия

Осенью 2012 г. проводили вспашку, весной 2013 года – боронование. Перед посевом проводили культивацию с последующим выравниванием поверхности поля.

Посев опытных участков яровой мягкой пшеницы в 2013 г. проводили по черному пару 12 мая.

Температурный режим в период посев – всходы был благоприятным для прорастания семян и появления всходов. Полные всходы отмечены 17 мая. Визуально посевы в этот период оценивались на 5 баллов.

Метеоусловия за период проведения исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Метеорологические условия 2013 гг. в Рязанском НИИСХ

Месяц	Температура, °С			Осадки, мм		
	Среднемесячная	Средне-много-летняя	Отклонение от средне-много-летней	Средне-месячные	Средне-много-летние	Отклонение от средне-много-летних
2013 год						
Май	+20,7	+13,5	+7,2	34,4	41	-6,6
Июнь	+22,4	+17,1	+5,3	25,3	58	-32,7
Июль	+21,4	+18,4	+3,0	76,8	79	-2,2
Август	+21,1	+17,1	+4,0	55,1	55,0	+0,1

Вегетационный период 2013 г., в целом, характеризовался неблагоприятными погодными условиями для развития яровой мягкой пшеницы. За вегетацию осадков выпало 191,6 мм или 82 % от среднемноголетних значений. Осадки выпадали неравномерно, основная их часть приходилась на июль-август. Температурный режим в период посев – всходы был благоприятным для прорастания семян и появления всходов.

Среднемесячная температура воздуха в мае составила 20,7 °С, что на 7,2 °С выше средних многолетних значений. Осадков выпало 34,4 мм или 83,9 % от среднемноголетних значений. Засушливые условия в мае отразились на росте и развитии растений яровой пшеницы.

Июнь отличался жаркой погодой, с критическим дефицитом влаги. Среднемесячная температура июня составила 22,4 °С, что на 5,3 °С выше среднемноголетних значений. Осадков выпало 25,3 мм или 43,6 % от нормы.

В июле среднемесячная температура составила 21,4 °С, что на 3,0 °С

выше среднемноголетних значений. Осадков выпало 76,8 мм, что практически соответствовало норме. Однако осадки выпадали неравномерно, в основном в последнюю декаду июля и продолжились в августе.

В августе в связи с обильными дождями уборку опытных делянок проводили 15 августа. Влажность зерна с делянок составила в среднем 16,0 %.

4. Биохимические методы

Определение подвижных форм фосфора проводили по методу Кирсанова в модификации ЦИНАО (ГОСТ 26207-91 «Почвы. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Кирсанова в модификации ЦИНАО»).

Содержание белка в зерне определяли по количеству белкового азота. Содержание белкового азота, в процентах, умножали на коэффициент 5.7 при анализе зерна (В.Т. Минеев и др., 2001).

Массовую долю клейковины и качество клейковины определяли по ГОСТ 13586.1-68 «Зерно. Методы определения количества и качества клейковины в пшенице», массу 1000 зерен – по ГОСТ 10842-89 «Зерно зерновых и бобовых культур и семена масличных культур. Метод определения массы 1000 зерен или 1000 семян», влажность зерна – по ГОСТ 13586-5-93 «Зерно. Метод определения влажности».

Количество и качество клейковины определяли в агрохимической лаборатории ГНУ Рязанский НИИСХ.

5. Результаты исследований

Полные всходы отмечены 17 мая. Показатели полевой всхожести представлены в таблице 3.

Таблица 3- Полевая всхожесть яровой пшеницы (число растений на 1 м²)

Вариант	Повторности		Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	III				
1	421	433	427,0	-	-72,0	-66,0
2	497	501	499,0	+72,0	-	+6,0
3	500	486	493,0	+66,0	-6,0	-
4	479	492	485,5	+58,5	-13,5	-7,5
5	534	502	518,0	+91,0	+19,0	+25,0
6	456	476	466,0	+39,0	-33,0	-27,0
7	435	462	448,5	+21,5	-50,5	-44,5

Н.С.Р. 05= 35,7

Погодные условия в период всходов благоприятно отразились на полевой всхожести яровой пшеницы. Достоверное превышение полевой всхожести относительно контроля установлено по вариантам 5, 2, 3, 4, 6. В варианте 7 отмечено несущественное превышение над контролем по полевой всхожести.

Достоверного превышения значений полевой всхожести по вариантам опыта над химическим и биологическим эталонами установлено не было. Существенно меньше показатель полевой всхожести относительно эталонов был в вариантах 1 и 7.

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.

При обработке снопового материала определяли высоту растений и элементы продуктивности.

Таблица 4- Высота растений, см

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III	IV				
1	95	95	90	90	92,5	-	+1,2	+1,2
2	95	95	90	85	91,3	-1,2	-	0,0
3	95	90	90	90	91,3	-1,2	0,0	-
4	95	90	85	85	88,8	-3,7	-3,5	-3,5
5	95	95	85	90	91,3	-1,2	0,0	0,0
6	90	85	90	90	88,8	-3,7	-3,5	-3,5
7	95	90	90	85	90,0	-2,5	-1,3	-1,3

Н.С.Р.05= 4,1

В целом условия вегетации отразились на высоте растений. Она составляла 88,8- 92,5 см (по среднегодовым данным высота в годы с достаточным увлажнением у сорта Агата составляет 108 см). В контроле в условиях 2013 года она составила в среднем 92,5 см. В вариантах с применением препаратов отмечалось снижение высоты растений от 1,2 до 3,7 см. Наименьшая средняя высота растений (88,8 см) отмечена в вариантах 4 и 6. Наименьшее снижение высоты растений относительно контроля было в вариантах 2, 3, 5. Достоверного превышения значений высоты растений по вариантам опыта над химическим и биологическим эталонами установлено не было.

Таблица 5- Длина верхнего междоузлия, см

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III	IV				
1	35	39	32	37	35,8	-	+5,3	+2,5
2	35	36	24	27	30,5	-5,3	-	-2,8
3	33	34	34	32	33,3	-2,5	+2,8	-
4	36	31	33	37	34,3	-1,5	+3,8	-1,0
5	32	34	28	33	31,8	-4	+1,3	-1,5
6	33	31	33	36	33,3	-2,5	+2,8	0,0
7	40	34	40	37	37,8	+2	+7,3	+4,5

Н.С.Р. 05= 4,74

Уменьшение высоты растений в опыте происходило за счет уменьшения длины верхнего междоузлия. Наибольшая длина верхнего междоузлия отмечена у растений в первом варианте (контроль). Существенное уменьшение длины верхнего междоузлия отмечено в варианте 2. Достоверное увеличение длины верхнего междоузлия относительно химического эталона установлено в вариантах 1 и 7. Достоверного увеличения длины верхнего междоузлия относительно биологического эталона по вариантам опыта установлено не было.

Таблица 6- Длина нижнего междоузлия, см

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III	IV				
1	6	7	2	7	5,50	-	0,00	+0,25
2	4	9	6	3	5,50	0,00	-	+0,25
3	6	6	4	5	5,25	-0,25	-0,25	-
4	2	4	7	6	4,75	-0,75	-0,75	-0,50
5	3	4	2	5	3,50	-2,00	-2,00	-1,75
6	4	3	6	1	3,50	-2,00	-2,00	-1,75
7	7	6	5	6	6,00	+0,50	+0,50	+0,75

Н.С.Р.05=2,94

Длина нижнего междоузлия определяет устойчивость сорта к полеганию. Незначительно по сравнению с контролем уменьшилась длина нижнего

междоузлия в вариантах 3, 4, 5, 6. В варианте 7 отмечено незначительное увеличение длины нижнего междоузлия на 0,5 см. Достоверного увеличения или уменьшения длины нижнего междоузлия по вариантам опыта над химическим и биологическим эталонами установлено не было.

Таблица 7 - Длина колоса, см

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III	IV				
1	8,35	8,40	8,45	8,25	8,4	-	+0,1	+0,1
2	8,35	8,30	8,15	8,25	8,3	-0,1	-	0,0
3	8,70	8,30	8,10	8,10	8,3	-0,1	0,0	-
4	8,60	8,25	8,25	8,05	8,3	-0,1	0,0	0,0
5	8,45	8,40	8,20	8,20	8,3	-0,1	0,0	0,0
6	8,35	8,55	8,30	8,45	8,4	0,0	+0,1	+0,1
7	8,25	8,65	9,25	8,50	8,7	+0,3	+0,4	+0,4

Н.С.Р. 05=0,33

При изучении структуры урожая установили, что в вариантах 2, 3, 4, 5 отмечается незначительное уменьшение длины колоса. У растений в варианте 6 длина колоса была на уровне контроля, а в варианте 7 отмечено её незначительное увеличение. Достоверное увеличение длины колоса относительно химического и биологического эталонов установлено в варианте 7.

Таблица 8 - Число колосков в колосе, шт.

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III	IV				
1	18,1	18,0	17,4	16,4	17,5	-	+0,2	+0,5
2	18,0	17,6	16,5	17,0	17,3	-0,2	-	+0,3
3	18,0	17,0	16,4	16,7	17,0	-0,5	-0,3	-
4	17,9	16,7	18,5	16,0	17,3	-0,2	0,0	+0,3
5	17,4	17,2	16,5	17,7	17,2	-0,3	-0,1	+0,2
6	17,8	17,4	16,7	17,3	17,3	-0,2	0,0	+0,3
7	17,5	18,5	19,0	17,1	18,0	+0,5	+0,7	+0,1

Н.С.Р.05=1,05

Уменьшение длины колоса в вариантах сопровождалось уменьшением числа колосков в колосе относительно контроля. Несущественное увеличение числа колосков в колосе было установлено в варианте 7.

Достоверного увеличения или уменьшения числа колосков в колосе по вариантам опыта над химическим и биологическим эталонами установлено не было.

Таблица 9 - Число зерен с колоса, шт.

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III	IV				
1	33,1	34,6	35,3	35,5	34,6	-	-0,1	0,0
2	35,2	35,0	33,5	35,1	34,7	+0,1	-	+0,1
3	35,5	36,6	34,2	32,1	34,6	0,0	-0,1	-
4	36,0	35,3	30,8	32,4	33,6	-1,0	-1,1	-1,0
5	34,6	37,1	34,5	32,7	34,7	+0,1	0,0	+0,1
6	32,8	36,0	32,7	33,2	33,7	-0,9	-1,0	-0,9
7	33,1	37,6	35,6	33,0	34,8	+0,2	+0,1	+0,2

Н.С.Р.05 = 2,38

Незначительное увеличение числа зерен с колоса установлено в вариантах 2, 5 и 7. Наибольшее увеличение по сравнению с контролем было в 7 варианте. Незначительное уменьшение числа зерен отмечено в вариантах 4 и 6. Достоверного увеличения или уменьшения числа зерен с колоса по вариантам опыта над химическим и биологическим эталонами установлено не было.

Таблица 10 - Масса зерна с колоса, г

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III	IV				
1	1,34	1,29	1,48	1,37	1,37	-	0,00	0,00
2	1,37	1,41	1,35	1,36	1,37	0,00	-	0,00
3	1,41	1,44	1,37	1,24	1,37	0,00	0,00	-
4	1,32	1,39	1,19	1,28	1,30	-0,07	-0,07	-0,07
5	1,32	1,47	1,70	1,30	1,45	+0,08	+0,08	+0,08
6	1,28	1,37	1,28	1,27	1,30	-0,07	-0,07	-0,07
7	1,25	1,47	1,39	1,30	1,35	-0,02	-0,02	-0,02

Н.С.Р.05 = 0,14

Масса зерна с колоса по 5 варианту опыта была незначительно выше контроля. В вариантах 2 и 3 масса зерна с колоса была на уровне контроля, а в вариантах 4, 6, и 7 незначительно уступала ему. Достоверного увеличения или уменьшения массы зерна с колоса по вариантам опыта над химическим и биологическим эталонами установлено не было.

Таблица 11 - Масса 1000 зерен, г

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III	IV				
1	40,5	37,3	39,7	38,6	39,0	-	-0,6	-0,4
2	38,9	40,3	40,3	38,7	39,6	+0,6	-	+0,2
3	39,7	39,3	40,1	38,6	39,4	+0,4	-0,2	-
4	36,7	39,4	38,6	39,5	38,6	-0,4	-1,0	-0,8
5	38,2	39,6	49,3	39,8	41,7	+2,7	+2,1	+2,3
6	39,0	38,1	39,1	38,3	38,6	-0,4	-1,0	-0,8
7	37,8	39,1	39,0	39,4	38,8	-0,2	-0,8	-0,6

Н.С.Р.05 = 3,0

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 в варианте 5 (41,7 г.) Меньшая масса 1000 зерен в вариантах 4 и 6 связана с формированием более щуплого зерна, чем в других вариантах. Масса 1000 зерен меньше, чем в контроле отмечена в вариантах 4,6 и 7. Достоверного увеличения или уменьшения массы 1000 зерен по вариантам опыта над химическим и биологическим эталонами установлено не было.

Таблица 12 - Коэффициент общего кущения

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III	IV				
1	1,81	1,88	1,77	1,91	1,84	-	-0,06	-0,20
2	1,76	1,42	1,91	2,51	1,90	+0,06	-	-0,14
3	1,94	2,24	2,10	1,88	2,04	+0,20	+0,14	-
4	1,69	2,02	2,18	1,76	1,91	+0,07	+0,01	-0,13
5	1,77	2,64	1,77	1,83	2,00	+0,16	+0,10	-0,04
6	1,65	2,48	3,18	1,74	2,26	+0,42	+0,36	+0,22
7	1,67	1,97	2,21	1,70	1,89	+0,05	-0,01	-0,15

Н.С.Р.05=0,55

Таблица 13 - Коэффициент продуктивного кущения

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III	IV				
1	1,64	1,58	1,57	1,65	1,61	-	-0,10	-0,23
2	1,66	1,24	1,91	2,02	1,71	+0,10	-	-0,07
3	1,74	2,04	1,79	1,78	1,84	+0,23	+0,13	-
4	1,46	1,77	1,97	1,46	1,67	+0,06	-0,04	-0,17
5	1,68	2,33	1,55	1,66	1,81	+0,20	+0,10	-0,03
6	1,57	2,06	2,95	1,62	2,05	+0,44	+0,24	+0,21
7	1,61	1,83	2,00	1,62	1,77	+0,16	+0,06	-0,07

H.C.P.05= 0,47

Достоверных различий по общему и продуктивному кущению в вариантах опыта установлено не было. Незначительное увеличение коэффициента кущения отмечено во всех вариантах опыта. Наибольшим оно было в вариантах 6 и 3. Достоверного увеличения или уменьшения по общему и продуктивному кущению в вариантах опыта над химическим и биологическим эталонами установлено не было.

Таблица 14 - Урожайность, т/га

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III	IV				
1	2,17	3,08	3,12	3,43	2,95	-	-0,62	-0,55
2	2,92	3,75	3,72	3,88	3,57	+0,62	-	+0,07
3	3,38	3,48	3,51	3,62	3,50	+0,55	-0,07	-
4	3,08	3,56	3,63	3,52	3,45	+0,50	-0,12	-0,05
5	3,00	3,88	3,83	3,83	3,64	+0,69	+0,07	+0,14
6	3,06	3,63	3,42	3,43	3,39	+0,44	-0,18	-0,11
7	2,64	3,03	3,03	3,47	3,04	+0,09	-0,53	-0,46

H.C.P.05= 0,27

В целом, урожайность в вариантах опыта была выше, чем в контроле. Достоверная прибавка отмечена по 2, 3, 4, 5 и 6 вариантам. Наибольшая урожайность отмечена в варианте 5. Она сформировалась за счет увеличения полевой всхожести семян и формирования более крупного зерна. Достоверное

снижение урожайности относительно химического и биологического эталонов установлено в вариантах 1 и 7.

Таблица 15 - Корреляционные связи урожайности с элементами структуры

Название элемента	Коэффициент корреляции
Число растений на 1 м ²	0,97
Высота растений	-0,16
Длина верхнего междоузлия	-0,88
Длина нижнего междоузлия	-0,55
Длина колоса	-0,72
Число колосков в колосе	-0,75
Число зерен с колоса	-0,16
Масса зерна с колоса	0,25
Масса 1000 зерен	0,55
Коэффициент общего кущения	0,38
Коэффициент продуктивного кущения	0,32

В 2013 году установлены сильные прямые связи урожайности с числом растений на 1 м² и массой 1000 зерен ($r > 0,5$).

Таблица 16- Содержание белка в зерне, %

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III	IV				
1	13,3	13,3	12,2	13,1	13,0	-	+0,1	-0,3
2	13,7	13,6	11,2	13,3	12,9	-0,1	-	-0,4
3	13,1	14,3	12,4	13,3	13,3	+0,3	+0,4	-
4	13,2	13,8	12,4	12,9	13,1	+0,1	+0,2	-0,2
5	12,3	12,5	12,0	12,4	12,3	-0,7	-0,6	-1,0
6	12,3	13,4	11,6	11,5	12,2	-0,8	-0,7	-1,1
7	13,5	13,3	12,0	13,6	13,1	+0,1	+0,2	-0,2

Н.С.Р.05= 0,67

Помимо показателей урожайности определяющее значение имеют показатели качества зерна. Достоверно высокого содержания белка по вариантам опыта установлено не было. Достоверно меньшее содержание белка в зерне, было в вариантах 5 и 6 относительно контроля, химического и биологического эталонов.

Таблица 17- Содержание сырой клейковины, %

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III	IV				
1	30,3	29,8	30,6	30,1	30,2	-	-0,2	-0,6
2	31,0	30,5	28,0	30,5	30,0	-0,2	-	-0,8
3	29,7	32,0	31,0	30,5	30,8	+0,6	+0,8	-
4	30,0	30,9	31,0	29,7	30,4	+0,2	+0,4	-0,4
5	27,9	28,0	30,0	28,5	28,6	-1,6	-1,4	-2,2
6	28,0	30,0	29,1	26,5	28,4	-1,8	-1,6	-2,4
7	30,6	29,7	30,1	31,2	30,4	+0,2	+0,4	-0,4

H.C.P.05= 2,31

Содержание сырой клейковины в зерне имело прямую положительную связь с содержанием белка ($r= 0,99$). Достоверное превышение по содержанию клейковины по вариантам опыта не установлено. Меньшее количество клейковины в зерне было в вариантах 5 и 6. Достоверное уменьшение содержания сырой клейковины в зерне относительно биологического эталон установлено в вариантах 5 и 6.

Содержание сырой клейковины в зерне имело отрицательную связь с урожайностью ($r = - 0,33$).

Таблица 18- Качество сырой клейковины на приборе ИДК-1, ед.

Вариант	Повторности				Среднее значение	Отклонение от контроля, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III	IV				
1	85	90	84	81	85,0	-	+3,0	-5,3
2	80	83	85	80	82,0	-3,0	-	-8,3
3	90	91	90	90	90,3	+5,3	+8,3	-
4	90	93	89	87	89,8	+4,8	+7,8	-0,5
5	82	81	81	84	82,0	-3,0	0,0	-8,3
6	70	74	80	76	75,0	-10,0	-7,0	-15,3
7	96	100	93	91	95,0	+10,0	+13,0	+4,7

H.C.P.05 = 4,12

Показатель ИДК свидетельствует о том, что группа качества клейковины в вариантах опыта варьировала от I до II.

Хорошая клейковина I группы качества отмечена в варианте 6.
В остальных вариантах клейковина соответствовала II группе качества (удовлетворительная слабая).

Таким образом, лучшим по итогам испытания является вариант 5, где применялся Vsk 26a3 (0,5 кг/т), что позволило получить достоверную прибавку урожая яровой мягкой пшеницы за счет увеличения полевой всхожести семян и формирования более крупного зерна. При этом использование Lhv 97 (0,5 кг/т) в варианте 6 позволило сформировать прибавку за счет увеличения полевой всхожести семян, коэффициентов общего и продуктивного кущения.

Ст. научный сотруд. отдела селекции
и семеноводства, к.с.-х.н.

 О.А. Антошина

Ст. научный сотруд. отдела селекции
и семеноводства

 Т.А. Барковская

Приложение В

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.

Посев делянок проводили вручную. Учетная площадь делянки 5 м², повторность трехкратная. Размещение вариантов систематическое. Норма высева 5 млн. всхожих зерен на гектар.

Тест- культура: озимая мягкая пшеница сорт Виола.

Испытываемые экспериментальные образцы биопрепаратов:

Экспериментальные образцы – в виде сухих порошков, приготовлены на основе штаммов Vsk 26a3 и Lhv 97, выделенных из природных источников.

Обработка семян:

Фитоспорин (0,5 кг/т) норма обработки – 0,0005 г/ на 1 г зерна

Vsk 26a3 (0,5 кг/т) норма обработки – 0,0005 г/ на 1 г зерна

Vsk 26a3 (0,25 кг/т) норма обработки – 0,00025 г/ на 1 г зерна

Lhv 97(0,5 кг/т) норма обработки – 0,0005 г/ на 1 г зерна

Lhv 97 (0,25 кг/т) норма обработки – 0,00025 г/ на 1 г зерна

Обработка растений в фазу кущения:

Фитоспорин (3 кг/га) норма обработки – 1,5 г/ на 100 мл воды на 1 м²

Vsk 26a3 (3 кг/га) норма обработки – 1,5 г/ на 100 мл воды на 1 м²

Vsk 26a3 (1,5 кг/га) норма обработки – 0,75 г/ на 100 мл воды на 1 м²

Lhv 97(3 кг/га) норма обработки –1,5 г/ на 100 мл воды на 1 м²

Lhv 97 (1,5 кг/га) норма обработки – 0,75 г/ на 100 мл воды на 1 м²

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

Эталон биологический – Фитоспорин (0,5 кг/т) норма обработки – 0,0005 г/ на 1 г зерна; обработка растений в фазу кущения – (3 кг/га) норма обработки – 1,5 г/ на 100 мл воды на 1 м²

Способ внесения: Обработка семян перед посевом и обработка растений в фазу кущения.

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

Подготовка инокулюма для 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, их инфицирование проводили по отдельности двумя штаммами *Microdochium nivale*, один из которых выделен с листьев пораженных растений озимой пшеницы в Рязанской области, а другой получен из РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Таблица 1- Схема полевого опыта № 1

№ варианта	Заражение делянки возбудителями снежной плесени	Обработка перед посевом	Обработка в фазе кущения
------------	---	-------------------------	--------------------------

1. Контроль без обработок	нет	нет	нет
2. Контроль, зараженный возбудителями снежной плесени	да	нет	нет
3. (Эталон химический)	да	Максим экстрим 2 л/т	нет
4. (Эталон биологический)	да	Фитоспорин 0,5 кг/т	3 кг/га, 200-300 л/га
5.	да	Vsk 26a3 0,5 кг/т	3 кг/га, 200-300 л/га
6.	да	Vsk 26a3 0,25 кг/т	1,5 кг/га, 200 л/га
7.	да	Lhv 97 0,5 кг/т	3 кг/га, 200-300 л/га
8.	да	Lhv 97 0,25 кг/т	1,5 кг/га, 200 л/га

Фенологические наблюдения и учеты в осенний период проводились по методике ГСИ зерновых культур (Москва, 1989 г.). Согласно методике наблюдения и учеты проводились систематически.

В опыте определяли число всходов на 1 м² в фазу полных всходов. На двух несмежных повторениях с закладкой 3 –х пробных площадок по диагонали определяли густоту стояния растений.

Поражение мучнистой росой отмечали в фазу кущения (начало) и колошения, когда оно бывает в максимуме; бурой ржавчины - в фазу налива зерна.

Методика оценки на устойчивость к бурой листовой ржавчине (на естественном фоне). Учет ведется по двум верхним листьям.

0-5% - очень слабое поражение;

10-15% слабое;

25-30% - среднее;

50-70% - сильное;

70-100% - очень сильное.

Методика оценки на устойчивость к мучнистой росе:

0% - абсолютно устойчивые, на листьях нет подушечек мучнистой росы;

10% - устойчивые: несколько изолированных подушечек мучнистой росы на нижних листьях;

30% - слабое поражение: заселение поверхности листа на 10-15%, поражено три нижних листа;

50% - среднее поражение: на нижних листьях площадь, занятая возбудителем составляет 25-50%, средний ярус слабо поражен;

70% - сильное поражение: площадь листьев нижнего и среднего ярусов, занятая возбудителем составляет 50-70%;

100% - очень сильное поражение: сильно поражены листья во всех трех ярусах, процент занятой грибами поверхности составляет 80-100%.

Структуру урожая анализировали согласно Методике ВИР (1977). Для определения структуры урожая использовали модельные снопы, с учетных площадок, которые отбирались перед уборкой. При этом учитывали число растений, длину стебля, верхнего и нижнего междоузлия, длину колоса, число колосков и зерен в колосе, массу зерна с колоса, массу 1000 зерен.

Обмолот опытных делянок проводили комбайном «Террион SR-2010» 1 августа 2015 года. Урожайные данные пересчитывали с учетом 14% влажности зерна.

Статистическая обработка данных выполнялась по Б.А. Доспехову (1979).

Агротехника и метеоусловия

Осенью 2013 г. была проведена вспашка на глубину 22-24 см, весной 2014 года – боронование и последующие культивации, которые осуществлялись по мере отрастания сорняков (4-5 раз за лето). Перед посевом проведена культивация.

Посев опытных делянок озимой мягкой пшеницы в 2014 г. проведен по черному пару 27 сентября.

Таблица 2 - Метеорологические условия 2014 -2015 гг (Агротехнологическая станция РГАТУ)

Месяц	Температура, °С			Осадки, мм		
	Средне-месячная	Средне-много-летняя	Отклонение от средне-много-летней	Средне-месячные	Средне-много-летние	Отклонение от средне-много-летних
2014 год						
Сентябрь	+12,3	+11,3	+1,0	9,0	47,0	-38,0
Октябрь	+ 3,6	+4,3	- 0,7	47,0	48,0	-1,0
Ноябрь	-2,3	-1,8	-0,5	0,4	46,0	-45,6
Декабрь	-4,7	-6,9	+2,2	46,0	48,0	-2,0
2015 год						
Январь	-5,6	-10,7	+5,1	29,0	38,0	-9,0
Февраль	-3,4	-9,9	+6,5	32,3	31,0	+1,3
Март	+1,0	-3,4	+4,4	7,6	25,0	-17,4
Апрель	+5,8	+5,9	-0,1	57,9	34,0	+23,9
Май	+15,2	+13,5	+1,7	68,5	41,0	+27,5
Июнь	+17,9	+17,1	+0,8	136,9	58,0	+78,9
Июль	+18,4	+18,4	0	99,9	79,0	+20,9

Предпосевной период характеризовался длительной засухой, что сказалось на времени появления всходов и их состоянии.

Полные всходы отмечены 12 октября. Визуально посевы в этот период оценивались на 3 балла.

Среднемесячная температура воздуха в сентябре составила $12,3^{\circ}\text{C}$, что на $1,0^{\circ}\text{C}$ выше средних многолетних значений. Осадков выпало 9 мм, что составило 19,1% от среднемноголетних значений.

Октябрь и ноябрь были холоднее обычного. В октябре среднемесячная температура составила $3,6^{\circ}\text{C}$, что на $0,7^{\circ}\text{C}$ ниже среднемноголетних значений. Особо холодной выдалась третья декада октября (средняя температура составила $-0,8^{\circ}\text{C}$). Осадков выпало 47 мм, что составило примерно 97,9 % от нормы. Однако осадки выпадали неравномерно, в основном во второй декаде октября.

Среднемесячная температура ноября составила $-2,3^{\circ}\text{C}$, что ниже среднемноголетних значений. В ноябре осадков выпало 0,8 % от нормы. Снежный покров сформировался 30 ноября высотой 2 см. Глубина промерзания почвы на эту дату составила 36 см, что на 14 см глубже среднемноголетних значений.

В декабре среднемесячная температура составила $-4,7^{\circ}\text{C}$, что на $2,2^{\circ}\text{C}$ выше среднемноголетних значений. В декабре осадков выпало 95,8 % от нормы. Высота снежного покрова на 30 декабря составила 14 см, а максимальная глубина промерзания почвы 46 см была установлена 10 декабря, что на 2 см глубже среднемноголетних значений.

В целом, погодные условия за период сентябрь-декабрь 2014 года не являются благоприятными для растений озимой пшеницы.

Среднемесячная температура января была выше среднемноголетних значений на $5,1^{\circ}\text{C}$. Осадков в этом месяце выпало на 23,7% меньше нормы.

Теплее обычного были февраль и март 2015 года – на $6,5$ и $4,4^{\circ}\text{C}$ соответственно. Количество выпавших в феврале осадков было в пределах среднемноголетних значений, а в марте выпало только 30% от нормы.

Апрель был холоднее обычного на $0,1^{\circ}\text{C}$. Осадков выпало на 70,3% больше нормы. Самая низкая температура воздуха ($-3,8^{\circ}\text{C}$) была 20 апреля. Самая высокая температура воздуха ($24,7^{\circ}\text{C}$) была отмечена 29 апреля.

В мае температура воздуха была выше нормы на $1,7^{\circ}\text{C}$, а осадков выпало на 67% больше нормы. Температура воздуха в июне и июле была близка к средним многолетним значениям. В июне выпало осадков в 2,4 раза больше нормы, в июле – в 1,3 раза больше нормы.

Дождливая погода в конце вегетации озимой мягкой пшеницы сместила сроки уборки.

В целом, погодные условия за период январь-июль 2015 года являлись благоприятными для растений озимой пшеницы.

Биохимические методы

Определение подвижных форм фосфора проводили по методу Кирсанова в модификации ЦИНАО (ГОСТ 26207-91).

Содержание белка в зерне определяли по количеству белкового азота. Содержание белкового азота, в процентах, умножали на коэффициент 5,7 при анализе зерна (В.Т. Минеев и др., 2001).

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 ГАТУ.

Результаты исследований

Полные всходы отмечены 12 октября. Показатели полевой всхожести представлены в таблице 3.

Таблица 3- Полевая всхожесть озимой мягкой пшеницы сорт Виола (число растений на 1 м²)

Вариант	Повторности		Среднее значение	Отклонение от контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	III				
1	369	387	378,0	-5,00	-38,5	-26,5
2	375	391	383,0	-	-33,5	-21,5
3	431	402	416,5	+33,50	-	+12,0
4	399	410	404,5	+21,50	-12,0	-
5	404	387	395,5	+12,50	-21,0	-9,0
6	385	398	391,5	+8,50	-25,0	-13,0
7	412	401	406,5	+23,50	-10,0	+2,0
8	378	367	372,5	-10,50	-44,0	-32,0

Н.С.Р. 05= 29,91

В целом по вариантам опыта отмечена низкая полевая всхожесть, что связано с засушливыми условиями во время посева и появления всходов.

Отмечалось существенное повышение полевой всхожести относительно контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, в варианте 3. Несущественное превышение полевой всхожести относительно контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, установлено по вариантам 4, 5, 6 и 7. В

варианте 8 отмечено несущественное снижение полевой всхожести относительно контроля, зараженного возбудителями снежной плесени.

Достоверного превышения значений полевой всхожести по вариантам опыта над химическим эталоном установлено не было. Существенно меньше показатель полевой всхожести относительно химического эталона был в вариантах 1, 2 и 8.

Достоверного превышения значений полевой всхожести по вариантам опыта над биологическим эталоном не установлено. В вариантах 3 и 7 отмечено несущественное превышение полевой всхожести над биологическим эталоном. Существенно меньше показатель полевой всхожести относительно биологического эталона был в варианте 8.

Таблица 4 - Перезимовка растений озимой мягкой пшеницы сорт Виола, %

Вариант	Повторности		Среднее значение	Отклонение от контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II				
1	89,6	90,7	90,2	+3,80	-2,9	-2,6
2	85,4	87,3	86,4	-	-6,7	-6,4
3	94,3	91,9	93,1	+6,70	-	+0,3
4	95,2	90,3	92,8	+6,40	-0,3	-
5	94,7	97,5	96,1	+9,70	+3,0	+3,3
6	92,5	89,1	90,8	+4,40	-2,3	-2,0
7	87,6	97,8	92,7	+6,30	-0,4	-0,1
8	95,9	91,3	93,6	+7,20	+0,5	+0,8

Н.С.Р. 05=8,48

Погодные условия в зимний период позволили благополучно перезимовать всем вариантам опыта. Процент перезимовки варьировал от 85,4 % до 97,8 %. По всем вариантам отмечено превышение процента перезимовки относительно контроля, зараженного возбудителями снежной плесени. Достоверное превышение установлено в варианте 5.

Достоверного превышения (снижения) процента перезимовки по вариантам опыта над химическим и биологическим эталонами установлено не было.

Состояние посевов после возобновления вегетации оценивалось в 4 балла. Поражения снежной плесенью визуально не отмечалось.

Погодные условия в период вегетации способствовали поражению растений озимой пшеницы мучнистой росой, однако признаки болезни по вариантам опыта не проявились. Устойчивость к поражению бурой ржавчиной и мучнистой росой также является особенностью сорта озимой мягкой пшеницы Виола.

При обработке снопового материала определяли высоту растений и элементы продуктивности.

Значительное количество осадков в весенне-летний период вегетации способствовало увеличению высоты растений. Она составила 60-74 см.

Таблица 5- Высота растений озимой мягкой пшеницы сорт Виола, см

Вариант	Повторности			Среднее значение	Отклонение от контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III				
1	64	67	63	64,7	+0,40	-1,6	-7,3
2	65	64	64	64,3	-	-2,0	-7,7
3	66	67	66	66,3	+2,00	-	-5,7
4	74	72	70	72,0	+7,70	+5,7	-
5	60	65	67	64,0	-0,30	-2,3	-8,0
6	68	71	72	70,3	+6,00	+4,0	-1,7
7	66	69	70	68,3	+4,00	+2,0	-3,7
8	60	61	62	61,0	-3,30	-5,3	-11,0

$H.C.P.05=3,35$

В контроле, зараженном возбудителями снежной плесени, высота растений составила в среднем 64,3 см. В вариантах с применением препаратов отмечалось увеличение высоты растений от 4 до 6 см. Наименьшая средняя высота растений (61 см) отмечена в варианте 8. Наибольшая средняя высота растений была в варианте с использованием биологического эталона.

Достоверное превышение высоты растений над контролем установлено в вариантах 4,6, и 7. Достоверно ниже контроля, химического и биологического эталонов была высота растений в варианте 8 (61 см).

Таблица 6 - Длина верхнего междоузлия растений озимой мягкой пшеницы сорт Виола, см

Вариант	Повторности			Среднее значение	Отклонение от контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III				
1	22	25	24	23,7	+1,00	+3,7	+1,4
2	24	21	23	22,7	-	+2,7	+0,4
3	21	18	21	20,0	-2,70	-	-2,3
4	23	24	20	22,3	-0,40	+2,3	-
5	26	23	27	25,3	+2,60	+5,3	+3,0
6	22	27	26	25,0	+2,30	+5,0	+2,7
7	22	23	25	23,3	+0,60	+3,3	+1,0
8	23	26	25	24,7	+2,00	+4,7	+2,4

H.C.P. 05=3,38

Наибольшая длина верхнего междоузлия отмечена у растений в вариантах 5 и 6. Наименьшая длина верхнего междоузлия отмечена в варианте 3 (20 см.) Увеличение длины верхнего междоузлия существенно не повлияло на высоту растений.

Достоверного удлинение верхнего междоузлия относительно растений контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, по вариантам отмечено не было. Уменьшение длины верхнего междоузлия относительно контроля отмечено в варианте 3 и 4.

По длине верхнего междоузлия отмечено достоверное превышение по вариантам 5, 6 и 8 над показателями по варианту с использованием химического эталона.

Достоверного удлинения или уменьшения длины верхнего междоузлия по вариантам опыта относительно биологического эталона не установлено.

Таблица 7- Длина нижнего междоузлия растений озимой мягкой пшеницы сорт Виола, см

Вариант	Повторности			Среднее значение	Отклонение от контроля, зараженного	Отклонение от эталона химического	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III				

					возбу- дителя- ми снежной плесени, ±	го, ±	
1	3,0	1,0	2,5	2,2	0,0	-3,0	-2,1
2	2,0	2,5	2,0	2,2	-	-3,0	-2,1
3	4,0	5,5	6,0	5,2	+3,0	-	+0,9
4	4,5	3,5	5,0	4,3	+2,1	-0,9	-
5	3,5	3,0	3,0	3,2	+1,0	-2,0	-1,1
6	2,0	3,0	3,5	2,8	+0,6	-2,4	-1,5
7	1,5	3,0	2,0	2,2	+0,0	-3,0	-2,1
8	4,0	2,5	3,0	3,2	+1,0	-2,0	-1,1

$H.C.P.05=1,38$

В среднем длина нижнего междоузлия у растений по вариантам опыта варьировала от 2,2 до 5,2 см. Существенное удлинение нижнего междоузлия по сравнению с контролем, зараженным возбудителями снежной плесени, отмечали в вариантах 3 и 4. Достоверное уменьшение длины нижнего междоузлия по вариантам опыта над химическим эталоном установлено во всех вариантах, кроме 4. Над биологическим эталоном – в вариантах 1,2, 6 и 7.

Не смотря на значительное количество осадков в летние месяцы вегетации, полегания по вариантам опыта отмечено не было. Это связано с сортовыми особенностями озимой мягкой пшеницы Виола.

Таблица 8 - Длина колоса озимой мягкой пшеницы сорт Виола, см

Вариант	Повторности			Среднее значение	Отклонение от контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III				
1	8,0	8,5	9,2	8,6	+0,60	+0,10	-1,80

2	7,5	8,0	8,5	8,0	-	-0,50	-2,40
3	8,0	8,5	9,0	8,5	+0,50	-	-1,90
4	11,2	9,5	10,5	10,4	+2,40	+1,90	-
5	8,0	9,5	10,0	9,2	+1,20	+0,70	-1,20
6	9,5	8,5	9,0	9,0	+1,00	+0,50	-1,40
7	9,5	9,5	8,5	9,2	+1,20	+0,70	-1,20
8	9,5	8,5	9,0	9,0	+1,00	+0,50	-1,40

Н.С.Р. 05=1,18

Наибольшая длина колоса отмечена в варианте с использованием биологического эталона (10,4 см). Наименьшая длина колоса была в вариант 2.

При изучении длины колоса установили, что в вариантах 4, 5 и 7 отмечается достоверное увеличение длины колоса относительно контроля, зараженного возбудителями снежной плесени.

Достоверное уменьшение длины колоса отмечено по всем вариантам относительно биологического эталона.

Таблица 9 - Число колосков в колосе озимой мягкой пшеницы сорт Виола, шт.

Вариант	Повторности			Среднее значение	Отклонение от контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III				
1	16,6	15,0	17,3	16,3	+0,50	0,00	-1,10
2	15,4	15,7	16,2	15,8	-	-0,50	-1,60
3	16,1	16,7	16,2	16,3	+0,50	-	-1,10
4	18,1	17,0	17,2	17,4	+1,60	+1,10	-
5	15,3	17,5	17,3	16,7	+0,90	+0,40	-0,70
6	16,9	15,2	16,4	16,2	+0,40	-0,10	-1,20
7	17,8	17,1	16,3	17,1	+1,30	+0,80	-0,30
8	16,9	15,1	16,0	16,0	+0,20	-0,30	-1,40

Н.С.Р.05=1,56

Увеличение длины колоса в вариантах опыта сопровождалось незначительным увеличением числа колосков в колосе относительно контроля, зараженного возбудителями снежной плесени. Наибольшее число колосков в колосе было отмечено в вариантах 4 и 7, а наименьшее – в варианте 2. Суще-

ственное увеличение числа колосков в колосе относительно контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, было установлено в варианте 4. По остальным вариантам отмечалось незначительное увеличение числа колосков.

Достоверное уменьшение числа колосков в колосе относительно биологического эталона отмечено в варианте 2.

Таблица 10 - Число зерен с колоса озимой мягкой пшеницы сорт Виола, шт.

Вариант	Повторности			Среднее значение	Отклонение от контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III				
1	26,7	25,2	28,5	26,8	+4,80	-1,60	-3,80
2	22,7	20,5	22,9	22,0	-	-6,40	-8,60
3	27,9	28,3	29,1	28,4	+6,40	-	-2,20
4	29,9	32,4	29,5	30,6	+8,60	+2,20	-
5	22,8	23,9	25,1	23,9	+1,90	-4,50	-6,70
6	30,3	27,3	28,6	28,7	+6,70	+0,30	-1,90
7	30,9	28,0	26,8	28,6	+6,60	+0,20	-2,00
8	27,5	26,8	27,4	27,2	+5,20	-1,20	-3,40

H.C.P.05 = 2,41

Достоверное увеличение числа зерен с колоса относительно контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, отмечалось во всех вариантах опыта, кроме варианта 5.

Существенно меньше зерна формировалось по вариантам 2 и 5 относительно химического эталона.

Отмечено существенное снижение числа зерен с колоса по вариантам 1, 2, 5 и 8 относительно биологического эталона.

Таблица 11 - Масса зерна с колоса озимой мягкой пшеницы сорт Виола, г

Вариант	Повторности	Среднее значение	Отклонение от контроля,	Отклонение от эталона	Отклонение от эталона биологического
---------	-------------	------------------	-------------------------	-----------------------	--------------------------------------

	I	II	III		зара- женного возбу- дителя- ми снежной плесени, ±	хими- ческо- го, ±	ческого, ±
1	1,28	1,11	1,37	1,25	+0,09	-0,29	-0,42
2	1,32	1,03	1,14	1,16	-	-0,38	-0,51
3	1,32	1,53	1,78	1,54	+0,38	-	-0,13
4	1,80	1,54	1,67	1,67	+0,51	+0,13	-
5	1,45	1,09	1,27	1,27	+0,11	-0,27	-0,40
6	1,54	1,35	1,38	1,42	+0,26	-0,12	-0,25
7	1,53	1,49	1,28	1,43	+0,27	-0,11	-0,24
8	1,62	1,18	1,26	1,35	+0,19	-0,19	-0,32

H.C.P.05 =0,29

Масса зерна с колоса в вариантах 3 и 4 была достоверно выше, чем в контроле, зараженном возбудителями снежной плесени. В вариантах 5, 6, 7 и 8 масса зерна с колоса незначительно превышала контроль.

Достоверного увеличения массы зерна с колоса по вариантам опыта над химическим и биологическим эталонами установлено не было. В вариантах 1 и 2 масса зерна с колоса была существенно меньше относительно химического эталона.

В вариантах 1, 2, 5 и 8 масса зерна с колоса была существенно меньше относительно биологического эталона.

Таблица 12 - Масса 1000 зерен озимой мягкой пшеницы сорт Виола, г

Вариант	Повторности			Среднее значение	Откло- нение от кон- троля, зара- женного возбу- дителя- ми снежной плесени, ±	Откло- нение от эта- лона хими- ческо- го, ±	Отклоне- ние от эталона биологи- ческого, ±
	I	II	III				
1	52,6	48,9	49,2	50,2	+1,90	+0,80	-0,30
2	47,0	48,3	49,5	48,3	-	-1,10	-2,20
3	48,3	50,2	49,8	49,4	+1,10	-	-1,10

4	50,1	49,9	51,6	50,5	+2,20	+1,10	-
5	54,3	52,1	50,7	52,4	+4,10	+3,00	+1,90
6	47,8	48,5	47,3	47,9	-0,40	-1,50	-2,60
7	48,2	49,3	50,2	49,2	+0,90	-0,20	-1,30
8	49,5	50,3	51,2	50,3	+2,00	+0,90	-0,20

Н.С.Р.05 = 2,38

В условиях достаточного увлажнения в период вегетации растения в вариантах опыта сформировали крупное зерно с массой 1000 семян в среднем от 47,9 до 52,4 г. Наибольшим этот показатель был в варианте 5.

Масса 1000 зерен больше, чем в контроле, зараженном возбудителями снежной плесени, отмечалась во всех вариантах опыта, кроме варианта 6. Достоверное превышение массы 1000 семян над контролем, зараженным возбудителями снежной плесени, установлено в варианте 5.

Достоверное увеличение массы 1000 зерен относительно химического эталона установлено в варианте 5.

Таблица 13 - Коэффициент общего кущения озимой мягкой пшеницы сорт Виола

Вариант	Повторности			Среднее значение	Отклонение от контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III				
1	1,53	1,71	1,67	1,64	+0,15	-0,08	+0,23
2	1,47	1,67	1,34	1,49	-	-0,23	+0,08
3	1,79	1,68	1,69	1,72	+0,23	-	+0,31
4	1,27	1,64	1,33	1,41	-0,08	-0,31	-
5	1,11	1,54	1,29	1,31	-0,18	-0,41	-0,10
6	1,73	1,45	1,68	1,62	+0,13	-0,10	+0,21

7	1,45	1,35	1,47	1,42	-0,07	-0,30	+0,01
8	1,51	1,72	1,69	1,64	+0,15	-0,08	+0,23

Н.С.Р.05=0,25

В связи с засушливыми условиями в осенний период отсутствовало осеннее кущение. Достоверных различий по общему кущению в вариантах опыта относительно контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, установлено не было.

Достоверное уменьшение коэффициента общего кущения отмечено в вариантах опыта 4, 5 и 7 относительно химического эталона. Достоверное увеличение коэффициента общего кущения над биологическим эталоном отмечено в варианте 3.

Таблица 14 - Коэффициент продуктивного кущения озимой мягкой пшеницы сорт Виола

Вариант	Повторности			Среднее значение	Отклонение от контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III				
1	1,06	1,23	1,01	1,10	-0,28	-0,12	-0,20
2	1,54	1,32	1,28	1,38	-	+0,16	+0,08
3	1,31	1,23	1,11	1,22	-0,16	-	-0,08
4	1,20	1,38	1,33	1,30	-0,08	+0,08	-
5	1,08	1,12	1,24	1,15	-0,23	-0,07	-0,15
6	1,54	1,38	1,52	1,48	+0,10	+0,26	+0,18
7	1,24	1,18	1,30	1,24	-0,14	+0,02	-0,06
8	1,29	1,38	1,45	1,37	-0,01	+0,15	+0,07

Н.С.Р.05= 0,18

Достоверное уменьшение коэффициента продуктивного кущения относительно контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, установлено в вариантах опыта 1 и 5.

Достоверное увеличение продуктивного кущения отмечено в варианте 6 относительно химического и биологического эталонов.

Таблица 15 - Урожайность озимой мягкой пшеницы сорт Виола, т/га

Вариант	Повторности			Среднее значение	Отклонение от контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III				
1	2,01	1,67	1,86	1,85	+0,41	-0,85	-2,60
2	1,53	1,34	1,45	1,44	-	-1,26	-3,01
3	3,06	2,86	2,19	2,70	+1,26	-	-1,75
4	4,63	3,97	4,74	4,45	+3,01	+1,75	-
5	2,97	2,35	2,63	2,65	+1,21	-0,05	-1,80
6	3,47	3,07	2,99	3,18	+1,74	+0,48	-1,27
7	3,16	2,65	2,49	2,77	+1,33	+0,07	-1,68
8	4,36	3,98	3,87	4,07	+2,63	+1,37	-0,38

H.C.P.05=0,40

В целом в вариантах опыта отмечается увеличение урожайности в сравнении с контролем, зараженным возбудителями снежной плесени. Наибольшая урожайность отмечена в варианте 4 (4,45 т/га). Достоверные прибавки урожая относительно контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, были в вариантах 1, 3, 4, 5, 6, 7 и 8.

В варианте 4 урожайность сформировалась за счет увеличения коэффициента продуктивного кущения, числа зерен и массы зерна с колоса.

Достоверное увеличение урожайности отмечено по вариантам опыта 4, 8 и 6 над химическим эталоном.

В целом, урожайность по вариантам опыта, кроме варианта 8, была существенно ниже относительно биологического эталона.

Таблица 16 - Корреляционные связи урожайности с элементами структуры

Название элемента	Коэффициент корреляции
1	2
Число растений на 1 м ²	0,16
Перезимовка растений	0,56
Высота растений	0,34
Длина верхнего междоузлия	0,10
Длина нижнего междоузлия	0,49
Длина колоса	0,82
Число колосков в колосе	0,48

Число зерен с колоса	0,71
Масса зерна с колоса	0,74
Масса 1000 зерен	0,24
Коэффициент общего кущения	-0,06
Коэффициент продуктивного кущения	0,32

В 2015 году установлены сильные прямые связи урожайности с перезимовкой растений, длиной колоса, числом зерен с колоса и массой зерна с колоса, коэффициентом продуктивного кущения ($r > 0,5$).

Таблица 17- Содержание белка в зерне озимой мягкой пшеницы сорт Виола, %

Вариант	Повторности			Среднее значение	Отклонение от контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, ±	Отклонение от эталона химического, ±	Отклонение от эталона биологического, ±
	I	II	III				
1	12,10	11,80	11,20	11,70	+0,43	-0,37	+0,83
2	11,70	11,00	11,10	11,27	-	-0,80	+0,40
3	11,90	11,70	12,60	12,07	+0,80	-	+1,20
4	10,90	10,60	11,10	10,87	-0,40	-1,20	-
5	10,70	11,40	11,90	11,33	+0,06	-0,74	+0,46
6	11,20	12,30	12,90	12,13	+0,86	+0,06	+1,26
7	10,30	12,80	11,80	11,63	+0,36	-0,44	+0,76
8	10,00	11,50	10,80	10,77	-0,50	-1,30	-0,10

Н.С.Р.05= 1,16

Достоверно высокого содержания белка в зерне относительно контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, установлено не было. Достоверно меньше химического эталона содержалось белка в зерне в варианте 4 и 8. Достоверное превышение по содержанию белка в зерне относительно биологического эталона отмечено в вариантах 3 и 6.

Таблица 18 - Содержание сырой клейковины в зерне озимой мягкой пшеницы сорт Виола, %

Вариант	Повторности			Среднее значение	Отклонение от кон-	Отклонение от эталона	Отклонение от эталона био-
	I	II	III				

				чение	троля, заражен- ного воз- будите- лями снежной плесени, ±	химиче- ского, ±	логическо- го, ±
1	27,30	27,00	26,90	27,07	+0,94	-0,13	+1,27
2	26,50	26,00	25,90	26,13	-	-1,07	+0,33
3	27,10	26,60	27,90	27,20	+1,07	-	+1,40
4	26,30	25,90	25,20	25,80	-0,33	-1,40	-
5	25,80	26,10	26,90	26,27	+0,14	-0,93	+0,47
6	25,10	26,30	27,10	26,17	+0,04	-1,03	+0,37
7	25,60	27,10	26,80	26,50	+0,37	-0,70	+0,70
8	25,40	26,20	26,00	25,87	-0,26	-1,33	+0,07

Н.С.Р.05= 1,07

Содержание сырой клейковины в зерне имело прямую положительную связь с содержанием белка ($r=0,71$). Достоверное превышение по содержанию клейковины относительно контроля, зараженного возбудителями снежной плесени, установлено в варианте 3. Меньшее количество клейковины в зерне было в варианте 4 и 8.

В целом низкое содержание белка и клейковины в зерне объясняется дождливыми погодными условиями в период созревания.

Таблица 19 - Качество сырой клейковины озимой мягкой пшеницы сорт Виола на приборе ИДК-1, ед.

Вариант	Повторности			Сред- нее зна- чение	Откло- нение от кон- троля, зара- женно- го воз- буди- телями снеж- ной плесе- ни, ±	Отклоне- ние от эталона химиче- ского, ±	Отклоне- ние от эта- лона био- логическо- го, ±
	I	II	III				
1	90,00	82,00	80,00	84,00	-18,67	-2,67	0,00
2	110,00	98,00	100,00	102,67	-	+16,00	+18,67

3	85,00	91,00	84,00	86,67	-16,00	-	+2,67
4	87,00	80,00	85,00	84,00	-18,67	-2,67	-
5	80,00	89,00	90,00	86,33	-16,34	-0,34	+2,33
6	84,00	86,00	95,00	88,33	-14,34	+1,66	+4,33
7	93,00	90,00	95,00	92,67	-10,00	+6,00	+8,67
8	89,00	87,00	90,00	88,67	-14,00	+2,00	+4,67

Н.С.Р.05 = 8,39

Показатель ИДК свидетельствует о том, что группа качества клейковины в вариантах опыта варьировала в пределах II (удовлетворительная слабая).

Лучшим по показателям ИДК было качество сырой клейковины в вариантах 1 и 4.

Таким образом, лучшим по итогам испытания является вариант 8 (Lhv 97 0,25 кг/т), урожайность которого сформировалась за счет увеличения числа зерен с колоса и массы 1000 зерен.

Препараты на основе штаммов *Pseudomonas chlororaphis* Vsk 26a3 и *Geobacillus thermoglucosidasius* Lhv 97 в низкой дозировке показали достоверную прибавку урожая выше химического контроля.

Доцент кафедры лесного дела,
агрохимии и экологии, к.с.-х.н.

 О.А. Антошина