

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
/ Московский политех /
Факультет химической технологии и биотехнологии
Кафедра «ХимБиоТех»

**ВЫПУСКНАЯ
КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

«Изучение влияния бактерий *Methylobacterium extorquens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* и их метаболитов на патогены сельскохозяйственных растений»

Направление подготовки 19.03.01 «Биотехнология»

Заведующий кафедрой:

Николайкина Наталья Евгеньевна (подпись)

Научный руководитель:

к.х.н., доц. Кудров Александр Николаевич (подпись)

к.б.н., зав. лаб. Джавахия Вахтанг Витальевич (подпись)

Студент:

Кудинова Виктория Андреевна (подпись)

Москва, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Биопрепараты как перспективный способ защиты сельскохозяйственных растений от фитопатогенных микроорганизмов.	8
1.2. Описание фитопатогенных микроорганизмов сельскохозяйственных культур.....	8
1.2.1. Фузариоз.	8
1.2.2. Альтернариоз.....	9
1.2.3. Фомоз.	10
1.2.4. Церкоспороз.....	10
1.2.5. Серая гниль.	11
1.3. Микроорганизмы, используемые для создания биопрепаратов.	11
1.4. Фотосимбиотические аэробные метиловобактерии.....	13
1.4.1. Штамм <i>M. Extorquens</i>	14
1.5. Грамположительные бактерии рода <i>Bacillus</i>	15
1.5.1. Штамм <i>B. megaterim</i>	15
1.5.2. Штамм <i>B. subtilis</i>	16
1.6. Оптимизация состава питательной среды.	18
1.6.1. Источники углерода.	19
1.6.2. Источники азота.	19
1.6.3. Источники минерального питания.	20
1.6.4. Факторы роста.	21
1.6.5. Математический метод планирования эксперимента.	22

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1. Объект исследования.	24
2.2. Условия культивирования.	25
2.2.1. Штамм <i>M. extorquens</i>	25
2.2.2. Штамм <i>B. subtilis</i> и <i>B.megaterium</i>	26
2.3. Питательные среды.	26
2.3.1. Реактивы и компоненты питательных сред.	26
2.3.2. Состав питательных сред.	29
2.4. Методы исследования штаммов <i>M. Extorquens</i> , <i>B. Megatetium</i> , <i>B. Subtilis</i> и бактериального препарата на их основе.	31
2.4.1. Определение количества биомассы в культуральной жидкости методом определения сухих веществ.	31
2.4.2. Определение КОЕ/мл с помощью камеры Горяева.....	31
2.4.3. Определение КОЕ/мл методом последовательных разведений.	32
2.4.4. Методика приготовления физиологического раствора.....	32
2.4.5. Методика приготовления суспензии исследуемых штаммов <i>M. extorquens</i> , <i>B. Megatetium</i> , <i>B. Subtilis</i> и препарата на их основе с различными концентрациями.....	32
2.5. Изучение влияния биологической активности исследуемых штаммов и бактериального препарата на рост фитопатогенных грибов.	33
2.5.1. Метод радиального роста.....	33
2.5.2. Модифицированный метод бумажных дисков.	34
2.5.3. Метод оценки противогрибной активности на модельном объекте	35
2.6. Статистическая обработка результатов эксперимента.....	35
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	38

3.1. Результаты исследования противогрибной активности штамма <i>Bacillus subtilis</i>	38
3.2. Результаты исследования противогрибной активности штамма <i>Bacillus megaterium</i>	46
3.3. Результаты исследования противогрибной активности штамма <i>Methylobacterium extorquens</i>	56
3.4. Результаты исследования противогрибной активности бактериального препарата.	61
3.4.1. Метод радиального роста.....	61
3.4.2. Модифицированный метод бумажных дисков.	70
3.5 Результаты исследования противогрибной активности.....	76
ВЫВОДЫ	79
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	80

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день одной из основных проблем сельскохозяйственного хозяйства становится защита растений от фитопатогенных микроорганизмов. Заражение сельскохозяйственных культур становится причиной потери урожая, которые в некоторых случаях могут достигать до 100 %, тем самым снижая количественные и качественные показатели растениеводческой продукции. Не смотря на значительные успехи, достигнутые в данном направлении, проблема создания не только эффективных, но и безопасных средств защиты растений по-прежнему остается чрезвычайно актуальной.

Среди существующий современных способов защиты растений ведущее место принадлежит химическим методам, особенно в системах интенсивных технологий возделывания сельскохозяйственных культур. Однако, не смотря на свою экономическую и биологическую эффективность, данный метод имеет ряд существенных недостатков, приводящих к снижению его эффективности и экономической целесообразности, а именно: накопление токсичных веществ, входящих в состав фунгицидов, в сельскохозяйственной продукции, что представляет значительную угрозу для здоровья человека и животных, прогрессирующая устойчивость патогенных организмов к химическим веществам, и как следствие – необходимость в увеличении доз и количества обработок фунгицидными препаратами, не специфичность действия и нарушение экологического равновесия в почве, что приводит к загрязнению окружающей нас среды, а также высокая стоимость фунгицидов. И несмотря на постоянное появление на рынке новых средств и методов химической защиты растений от опасных болезней, общая ситуация не только принципиально не меняется, но и можно выделить негативные тенденции.

Исходя из вышесказанного, стоит отметить, что все более актуальными становятся биологические способы защиты растений. Так, очевидным их

преимуществом перед химическими методами становится их биологическая безопасность по отношению к окружающей среде и экономичность, так как биологические препараты не вызывают резистентности у фитопатогенных микроорганизмов, а значит значительно снижается количество обработок. Помимо прочего стоит отметить высокую эффективность и избирательность действия по отношению к широкому спектру патогенных микроорганизмов, короткий срок ожидания действия и полную безопасность продукции растениеводства, полученную после обработки биологическими препаратами.

Следовательно, биологические средства защиты являются наиболее экологически приемлемым и ресурсосберегающим приемом, способным защитить растения от широкого спектра вредителей и болезней, повысить продуктивность и урожайность сельскохозяйственной продукции без существенных финансовых затрат и невозполнимых природных ресурсов.

Цель работы: Исследование влияния штаммов бактерий *M. extorquens*, *B. megaterium*, *B. subtilis* на фитопатогены сельскохозяйственных растений, создание биопрепарата на их основе с устойчивой антагонистической активностью по отношению к широкому кругу фитопатогенов.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние штаммов бактерий *M. extorquens*, *B. megaterium*, *B. subtilis* на фитопатогенные микроорганизмы *F. solani*, *F. oxysporum*, *A. solani*, *A. alternata*, *C. beticola*, *B. cinerea*.
2. Исследовать синергетическое действия бактериального препарата на основе штаммов бактерий *M. extorquens*, *B. megaterium*, *B. subtilis* на фитопатогенные микроорганизмы *F. solani*, *F. oxysporum*, *A. solani*, *A. alternata*, *C. beticola*, *B. cinerea*.
3. Подобрать концентрацию бактериального препарата, при которой проявляется наибольшая активность по отношению к заявленным фитопатогенным микроорганизмам.

4. Провести исследование эффективности комбинации бактериального препарата на модельном объекте.

ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биопрепараты как перспективный способ защиты сельскохозяйственных растений от фитопатогенных микроорганизмов.

На сегодняшний день известно, что многие сельскохозяйственные растения подвержены различным заболеваниям, вызванными паразитизмом фитопатогенных микроорганизмов, так возбудитель фузариоза колоса зерновых, грибы рода *Fusarium* не только снижают урожай, но и загрязняют зерно и производимые из него продукты питания микотоксинами, что делает такие продукты непригодными и даже опасными для человека [Соколов, 2007; Жиглецова, 2010].

Отмечено, что в странах с развитым сельским хозяйством возросла роль биологических и биологизированных методов защиты растений. Это обусловлено острой необходимостью получения достаточно высокого и безопасного урожая и оздоровлением агроценозов, которые загрязнены остатками пестицидов, тяжелых металлов и нитрозаминов [Монастырский, 2008]. Из этого следует, что биопрепараты для подавления численности фитопатогенных микроорганизмов и фитофагов являются экологически безопасной альтернативой химическим пестицидам, так как разработка биопрепаратов осуществляется на основе природных регуляторов возбудителей болезней растений. К таким регуляторам относятся энтомопатогенные антагонистические микроорганизмы и их метаболиты [Штерншис, 2011].

1.2. Описание фитопатогенных микроорганизмов сельскохозяйственных культур.

1.2.1. Фузариоз.

Фузариоз – это заболевание растений (культурных и дикорастущих), вызываемое грибами рода *Fusarium* (*F. solani*, *F. solani* var. *coeruleum*, *F. sambucinum*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. gibbosum*, *F. culmorum*, *F. moniliform*, *F. sambucinum* var. *minus*, *F. sambucinum* var. *ossicolum*, *F.*

sambucinum var. sublunatum, *F. solani var. eumartrii*, *F. solani var. argillaceum*, *F. sporotrichoides*, *F. anguioides*, *F. sporotrichiella*, *F. sporotrichiella var. tricinctum* и др.) [Машанов, 2012].

Данное заболевание на протяжении многих лет остается проблемой для сельскохозяйственных культур, поскольку имеется широкая распространенность фузариевых грибов в почве, изменчивость под влиянием различных факторов, а также способность продуцировать опасные для окружающей среды токсины. К примеру, фузариоз картофеля занимает второе место по вредоносности после фитофтороза.

Некоторые виды фитопатогенных грибов рода *Fusarium* различают по их экологическим потребностям, исходя из этого, они распределены по различным природным областям не случайно. Условия окружающей среды оказывают сильное влияние на видовой состав патогенов. Большинство фузариевых грибов может паразитировать на широком круге растений, поэтому встречаемость определенного вида определяется по природно-климатическим особенностям региона, а распространенность заболевания зависит от ежегодных метеорологических флуктуаций.

1.2.2. Альтернариоз.

Альтернариоз – заболевание растения, вызванное действием грибов рода *Alternaria*. Наиболее опасными из которых: *A. solani* и *A. alternata*.

В России проблема распространенность альтернариоза имеет глубокие исторические корни, однако остается актуальной и на сегодняшний день. Виды фитопатогенных грибов рода *Alternaria* способны поражать широкий спектр растений, включая экономически значимые сельскохозяйственные культуры, такие как: зерновые, технические, овощные, цветочно-декоративные, плодовые и цитрусовые. Выявлено также, что в продукции зараженной альтернариозом возможно накопление в значительных количествах микотоксинов, чье действие вредоносно для человека, животных и птиц.

1.2.3. Фомоз.

Фомоз – это грибковое заболевание растений, в основном овощных культур, вызываемое грибами рода *Phoma*. Отличительной чертой данного рода является избирательность действия. Так, *Phoma exigua* поражает картофель, *Phoma rostrupii* паразитирует на моркови, а *Phoma betae* вызывает фомоз у свеклы. Чаще всего растения подвергаются заражению в вегетативный период роста. Прохождение болезни возможно в скрытой форме и проявление симптомов заболевания происходит позже.

Одним из самых серьезных заболеваний считается фомоз картофеля. При определенных условиях очаговая инфекция распространяется так быстро, что приобретает масштабы эпифитотий. Урон, нанесенный данным заболеванием, может проявляться как в виде преждевременного отмирания ботвы, так и потери клубней во время хранения.

Географическое распространение фомоза охватывает территорию от Краснодарского края до Дальнего Востока и Сибири.

1.2.4. Церкоспороз.

Возбудителем данного заболевания служит фитопатогенный гриб *Cercospora beticola*. Оптимальными условиями для развития церкоспороза служит температура около 28°C при повышенной влажности воздуха. Паразитизм начинается с листьев растений, на которых имеется капельножидкая влага, а затем грибная культура внедряется в открытые устьица. Местом для дальнейшего роста служит подустыичное пространство близлежащие клетки. Инкубационный период обычно составляет неделю, однако в некоторых случаях может составлять до 40 дней. Широкому распространению заболевания благоприятствует чередование сухой и жаркой погоды с умеренно влажной и дождливой.

Чаще всего от церкоспороза страдает урожай сахарной свеклы. При развитии церкоспороза выявлено, что у растений нарушается передвижение соединений фосфора из ботвы в корнеплоды, а также отмечено увеличение солей аммония и аминокислот, в то время как уровень органических

фосфатов заметно снижен. При сильном поражении у растений нарушается азотный обмен, что способствует увеличению выхода патоки и уменьшению выхода сахара. Исходя из этого, потери урожая сахарной свеклы могут составлять порядка 50% [Стогниенко, 2007].

1.2.5. Серая гниль.

Возбудителем данного заболевания является гриб *Botrytis cinerea*. Чаще всего фитопатогенный гриб паразитируют на опавших листьях. При этом опавшие листья могут задерживаться на различных органах растений и тем самым переносить возбудителя на более благоприятные субстраты для роста. В местах колонизации образуются массовые очаги продуцирования гриба. На лепестках образуются конидиальное спороношение, а в местах их соприкосновения с субстратом *B. cinerea* начинает паразитировать, тем самым распространяясь на соседние части листьев и другие органы растения.

Вначале на листьях возникают светло-коричневые некротические пятна, которые способны к быстрому увеличению в размерах. В некоторых случаях на грани здорового и пораженного участка возникают темно-коричневый некротический контур, ширина которого способна достигать 2-3 мм.

Чаще остальных растений от данного заболевания страдает урожай фасоли [Кирик, 2007]. Также стоит отметить и другие экономически значимые для сельского хозяйства заболевания, вызванные грибом *Botrytis cinerea* – это серая гниль винограда, гороха, гречихи, капусты, льна, подсолнечника и хлопчатника [Лухменев, 2012].

1.3. Микроорганизмы, используемые для создания биопрепаратов.

Первый в мире биологический препарат для защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов был создан в начале прошлого века российским ученым И.И. Мечниковым на основе выделенного энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae*. Следующим отечественным бактериальным препаратом на основе штамма *Bacillus thuringiensis*

становится «Дендробациллин» и «Энтобактерин», производство которых сохранилось по настоящее время.

Также известно, что в качестве средств защиты растений можно применять природные штаммы бактерий и грибов-антагонистов, за счет их широкого спектра антагонистического действия, к примеру, гиперпаразитизм, способность к продуцированию антибиотиков и других веществ, способных угнетать жизнедеятельность фитопатогенных микроорганизмов. Первым грибным препаратом на основе штамма *Trichoderma viride* считается «Триходермин». Было доказано, что в качестве основы для производства грибных биопрепаратов важны представители энтомопатогенных грибов из отделов *Zygomycota* и *Deuteromycota* царства *Fungi* [Глупова, 2001].

Конкуренцию препаратом на основе грибов составляют средства защиты растений на основе бактерий. Эффективность таких препаратов объясняется наличием механизма антибиоза, который регулирует взаимоотношения микроорганизмов в природе. К источнику получения штаммов бактерий-антагонистов можно отнести супрессивные почвы. В основе производства бактериальных препаратов лежат штаммы двух родов бактерий - *Pseudomonas* и *Bacillus*.

Сапрофитные псевдомонады – обитателями ризосферы, которые являются регуляторами фитопатогенных микроорганизмов. Они характерны быстрым ростом, способностью продуцировать антибиотики, бактериоцины и сидерофоры, а также ростовые стимуляторы. Механизм их антагонистического действия основан на образовании стабильного комплекса с трёхвалентным железом, так связывая ионы трехвалентного железа в почве, они лишают фитопатогенные микроорганизмы питательного элемента, что способно привести к остановке их развития.

На основе бактерий рода *Pseudomonas* были созданы следующие бактериальные препараты: «Псевдобактерин-2», «Агат-25-К», «Бинорам», «БиоВайс» [Штерншис, 2012].

На сегодняшний день производство микробных средств защиты растений считается приоритетным направлением в России.

1.4. Фотосимбиотические аэробные метилобактерии.

Аэробные метилобактерии тесно связаны с жизнедеятельностью растений. Они присутствуют на листовой поверхности и в семенах. Это ассимиляция тесно связана с «циклом метанола» в растениях, то есть производством и выбросом метанола, который активно используется аэробными метилобактериями в качестве источника углерода. Преобладающим типом филосферной микробиоты у многих растений является розово пигментированный факультативный вид рода *Methylobacterium* [Doronina , 2014; Fedorov, 2012].

Метилобактерии также принимают активное участие в развитии моно- и двудольных растений. Наглядной демонстрацией данного участия является эксперимент с растительными гнотобиотами. Было показано, что метилобактериальная колонизация растений *in vitro* увеличивает прорастание семян и усиливает способность корнеобразования, активность фотосинтеза, скорость роста и потенциал регенерации. Отличия были замечены и во внешнем виде растений, так колонизированные метилобактериями растения отличались ярко-зеленой окраской, большими листьями и хорошо развитой корневой системой.

Отмечено, что некоторые штаммы метилобактерий способны ингибировать рост фитопатогенных грибов путем синтеза сидерофоров с низкой молекулярной массой. Сидерофоры способны связывать большую часть доступного железа в ризосфере. Способность к синтезу данного вещества была выявлена у 37 метилотрофных эндофитных штаммов, идентифицированных как представителей рода *Methylobacterium*: *M. mesophilicum*, *M. extorquens*, *M. zatmanii*, *M. radiotolerans* и *M. fujisawaense*; однако структура этих соединений еще не определена.

Полученные результаты создали обоснование использования штаммов аэробных метиловобактерий в качестве биопрепаратов для стимулирования роста и развития растений. Дальнейшие исследования физиологических биохимических и молекулярных аспектов фитосимбиоза аэробных метиловобактерий позволят более полно реализовать их метаболический потенциал в агробиотехнологии.

1.4.1. Штамм *M. Extorquens*.

Грамотрицательная альфа-протеобактерия *M. extorquens*, на агаризованной минеральной среде с метанолом образует розовые колонии (за счёт синтеза каротиноидного пигмента). Подвижна благодаря единственному жгутику. Культура *M. extorquens* ассоциирована с растением *Beta vulgaris L.* и выделена из ризосферы свеклы [Ochsner, Sonntag, 2014].

Штамм *M. extorquens* не патогенен, относится к семейству *Methylobacteriaceae* класса *альфа-протобактерий* [Троценко, 2010]. Метиловобактерии - строгие аэробные бактерии [Нетрусов, 2012], которые в качестве источника углерода используют окисленные или замещенные производные метана, однако на самом метане бактерии расти, не могут.

Данный представитель рода *Methylobacterium* является перспективным объектом для биотехнологии (производство биопестицидов для стимуляции роста и развития растений, улучшения прорастания семян, сохранения их всхожести, а также для борьбы с грибными и бактериальными болезнями зерновых, овощных, плодово-ягодных культур, производство поли-β-гидроксibuтирата и т. д.) [Замахаева, Троценко, 2016].

Известно также, что данный штамм обладает ростостимулирующими свойствами за счет синтеза растительных гормонов, таких как ауксины и цитокинины, образуют дезаминазу 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты, что снижает содержание этилена – гормона старения растений, а также стимулирует витамин В12, сидерофоры, фиксирует атмосферный азот, способствует солубилизации фосфора, улучшая тем самым минеральное питание растений [Агафонова, 2017]

1.5. Грамположительные бактерии рода *Bacillus*.

Под родом *Bacillus* семейства *Bacillaceae* объединены бактерии со следующими признаками: палочковидные бактерии, по форме – прямые. Подвижны, жгутики расположены перитрихально. Образуют термоустойчивые эндоспores, однако, не более одной в клетки-спорангии. Строго положительная окраска по Грамму. По типу дыхания относятся к облигативным аэробам [Садунов, 2018].

Грамположительные спорообразующие аэробные почвенные бактерии *B. subtilis* и *B. megaterim* образуют на поверхности жидких питательных сред тонкую беловатую пленку, на плотной питательной среде – выпуклые колонии ризоидной формы. Размер клеток варьируется от 0,7 до 3 мкм. Подвижны благодаря наличию жгутиков.

Некоторые представители данного рода обладают фосфатмобилизирующим, фосфатминерализующим и азотфиксирующим действиями, тем самым являясь для растений источником азота и фосфора [Чан Минь Куан, 2012]. Помимо этого, бактерий рода *Bacillus*, наряду с актиномицетами и грибами обладают выраженной антибиотической активностью против широкого спектра фитопатогенных микроорганизмов бактериального и грибкового происхождения [Маланичева, 2012].

1.5.1. Штамм *B. megaterim*.

Исследование показало, что бактерия *B. megaterim*, выделенная из почвы проявила высокий уровень антимикробной активности. В частности, было выявлено образование антибиотических веществ у девяти штаммов этого вида. При глубинном культивировании установлено, что почти у всех исследуемых штаммов (9 из 10) образуются различные по спектру действия антибиотики [Евременко, 2012].

Известно также, что штамм *B. megaterim* входит в состав комплексного бактериального удобрения. Положительный эффект отмечен благодаря наличию данного штамма, который способен продуцировать биологически активные соединения, улучшающие корневое питание растений и

оказывающее профилактическое влияние на некоторые заболевания растений во время вегетативного периода [Муродова, 2014].

Схожие результаты были получены в экспериментах, проводимых на растениях *Vigna cylindrical*. Было доказано, что штамм *B. megaterim* Q57-31 положительно влияет на всхожесть, рост и развитие растений в раннем периоде роста [Чан Минь Куан, 2012].

1.5.2. Штамм *B. subtilis*.

Штамм *B. subtilis* способен взаимодействовать с корневой системой и стимулировать рост высших растений. Благодаря способности взаимодействовать с множеством растений, формировать эндоспоры и быть источником различных антибиотиков, данный штамм пригоден в качестве агента биоконтроля [Хомяк, 2016].

В связи с этим бактерию *B. subtilis* можно назвать важнейшим инструментом в борьбе с фитопатогенными микроорганизмами, поскольку она обладает супрессивными и фунгицидными качествами *in vitro* по отношению к более чем двадцати фитопатогенным микроорганизмам. Данные свойства вызваны тем, что данный штамм способен вырабатывать множество вторичных метаболитов различных по химическому составу, но большинство из них относится к классу антибиотиков. Данные вещества, преимущественно пептиды, могут быть как рибосомального, так и не рибосомального происхождения [Jacques, 2011].

Основной состав фракции антибиотиков, продуцируемых *B. subtilis* составляют нерибосомально синтезируемые пептидные производные, большинство из них липопептиды [Jacques, 2011]. Образование липопептидных антибиотиков происходит при соединении β -гидроксильных остатков или β -аминогрупп с жирными кислотами. Свойства продукта определяют длина и разветвленность цепочек жирных кислот [Nagorska, 2007].

Широкому распространению штамм *B. subtilis* обязан способности формировать биопленку на поверхности растений. Это свойство также играет

важную роль при использовании штамма в качестве компонента биопрепарата для защиты растений. Биопленка влияет на обсеменение корней растения микроорганизмами и это повышает локальную концентрацию антибиотиков [Сидорова, 2018]. За данную способность отвечает продуцируемый штаммом липопептид – сурфактин. Сурфактин – это циклический липопептид, который содержит 3-гидрокси-13-метилтетрадекановую карбоновую кислоту и несколько аминокислот. Структура вещества охарактеризована наличием гептапептида в соединении с жирной β -гидроксикислотой с помощью лактоновой связи [Farace, 2015; Kino, 2009]. К аналогам сурфактина можно причислить: пумилаципдин, микосубтилин, бацирин, итурин, лишенизин и бацилломицин [Sharma, 2008]. Они также обладают сильной антигрибной и гемолитической активностью, но ограниченным антимикробным действием. Противогрибная активность проявляется при взаимодействии с цитоплазмой клетки, также при этом происходит формирование ионопроницаемых пор [Li, 2009].

Одним из вторичных метаболитов продуцируемым штаммом *B. subtilis* ATCC 6633 – является фосфатсодержащий олигопептидный антибиотик – ризоктицин. В своем составе он имеет аминокислоту аргинин и L-2-амино-5-фосфорно-3-пентеноиновую аминокислоту, которая не типична для структуры белка. Резоктицин взаимодействует с грибной клеткой с помощью олигопептидной транспортной системы. Результатом данного взаимодействия является высвобождение фосфатсодержащей аминокислоты, которая впоследствии ингибирует синтез белка.

Следующим производным бактерии *B. subtilis* являются лантабиотики. Это пептидные антибиотики рибосомального происхождения, к ним можно отнести лантионин, субтилин, эрицин S, субтиломицин. Все они способны ингибировать синтез пептидогликана и укорачивать его молекулу, что способствует образованию спор.

Наряду с пептидными антибиотиками, вторичными метаболитами *B. subtilis* являются поликетоны. Поликетоны – это ферменты

поликетонсинтетазы, которые способны проявлять антимикробную активность благодаря своему свойству собирать многофункциональные полипептиды в пептидные комплексы. Строение поликетонов отличается наличием двух амидных связей и различных остатков, и заместителей. По строению и функциям поликетоны можно разделить на группы: бацилоены, дегидробацилоены, дифицидин, оксидифицидин и макролацин [Zhong, 2014].

Некоторые штаммы проявляют способность продуцировать метаболиты, относящиеся к классу полиеновых антибиотиков, которые имеют в своей структуре сопряженные двойные связи. Данные соединения в разной степени имеют способность ингибировать рост фитопатогенных грибов *Fusarium culmorum*, *F. sporotrichiella*, *F. oxysporum*, *Botrytis sorokiniana*, *Alternaria tenuis* и *Phytophthora infestans* [Kudryashova, 2005].

Таким образом, *B. subtilis* способен выделять значительное количество биологически активных соединений, различных по химическому составу и структуре, такие как: белки, полипептиды, циклические липопептиды, кетоны и полиеновые соединения. Так стоит отметить, что способность бактерий синтезировать определенные соединения предполагает наличие специфического механизма воздействия на фитопатогенный микроорганизм. Именно это способно объяснить специфичную активность определенного штамма в отношении конкретных фитопатогенных микроорганизмов. Поэтому для создания эффективных биопрепаратов необходимо уделить внимание подбору штаммов-продуцентов и исследовать структуру и свойства продуцируемых ими метаболитов, поскольку на этой основе возможна разработка новых экологически безопасных способов защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов.

1.6. Оптимизация состава питательной среды.

Ключевым фактором увеличения выхода целевого продукта является оптимизация питательной среды.

Оптимизированные среды – это такие среды, состав и концентрация компонентов которых обеспечивают определенный максимальный процесс жизнедеятельности – накопление биомассы, отдельных метаболитов, спорообразование [Пименова, 1995].

Метод длительного эмпирического подбора компонентов оптимизированной питательной среды является неотъемлемой составляющей планирования эксперимента. В ходе подбора устанавливается качественный и количественный состав среды [Савельева, 2017].

1.6.1. Источники углерода.

Углеводы – одна из важнейших составных частей питательной среды для выращивания микроорганизмов. Обмен углеводов должен удовлетворять три основные потребности клетки: 1) получение энергии; 2) образование предшественников, необходимых для биосинтеза; 3) создание окислительно-восстановительных механизмов для превращения этих предшественников в соответствующие промежуточные или конечные продукты, пригодные в качестве клеточных компонентов [Пименова, 1995].

Источниками углерода могут служить: углеводы (сахара и их производные, олиго- и полисахариды), спирты, органические кислоты жирного и бензольного рядов и др.

Многие микроорганизмы используют только определенные источники углерода. Например, для культивирования штамма *M. extorquens* лучшим источником углерода и энергии является метанол.

1.6.2. Источники азота.

При глубинном культивировании микроорганизмов, источники азота играют немаловажную роль, так являются не только компонентом питания, но и активатором процесса биосинтеза. Источниками азота в питательных средах могут служить минеральные соли и азот в органических соединениях.

К органическим источникам следует отнести различные животные белки, такие как: пептон, казеин, яичный белок, желатин и др. Существуют также источники азота растительного происхождения – это обезжиренная соя

и кукурузный экстракт. Кукурузный экстракт – побочный продукт крахмалопаточного производства, вследствие чего является легкодоступным и экономически мало затратным. Ещё одним богатым источником органического азота (в основном в виде белков) является соевая мука. Помимо белков, в ней содержится до 25% углеводов, в большинстве трудноусваиваемых микроорганизмами, а также 4,5-6,5% минеральных элементов и некоторые витамины. Выпускается три вида соевой муки: необезжиренная (полножировая), полу-обезжиренная и обезжиренная [Арзамасцев, 2000].

При оценке натуральных субстратов (соевая мука, кукурузный экстракт и т.п.) следует принимать во внимание, что их воздействие на направленный процесс обмена веществ микроорганизмов обуславливается не только наличием белков и аминокислот, но и присутствием наряду с ними углеводов, нуклеиновых кислот, жиров, микроэлементов, органических кислот и других соединений.

К источникам азота неорганической природы относятся различные аммонийные соли и соли азотной кислоты.

По некоторым данным совместное добавление органических и неорганических источников азота, является наиболее эффективным решением, чем их применение по отдельности.

1.6.3. Источники минерального питания.

Минеральные элементы играют функциональную и структурную роль и необходимы для роста и жизнедеятельности многих микроорганизмов. Кроме углерода, кислорода, водорода и азота большое значение для микроорганизмов играет концентрация в среде и других минеральных элементов, таких как фосфор, сера, марганец, железо, кобальт и др.). Сера может входить в состав солей макроэлементов (сернокислый магний, сернокислое железо и др.). Источниками магния наиболее часто бывает сульфат магния, источником калия – хлорид калия.

1.6.4. Факторы роста.

Факторы роста – это необходимые для роста микроорганизмов на питательной среде вещества. К ним обычно относят азотистые основания, различные аминокислоты и витаминopodobные вещества. Все они присутствуют в живых организмах в различном соотношении. Для различных микроорганизмов необходимы свои особенные факторы роста.

Важнейшими для бактерий факторами роста служат:

- Тиамин – составная часть некоторых коферментов, а также является участником углеводного обмена.
- Рибофлавин – участник окислительно-восстановительных процессов.
- Пантотеновая кислота – необходима для формирования ферментных систем у бактерий, в частности кофермента А.
- Пиродоксин – принимает непосредственное участие в аминокислотном обмене.
- Витамин В₁₂ – составная активной части ферментов, которые участвуют в синтезе нуклеотидов.
- Фолиевая кислота – ее производные входят в состав ферментов, которые катализируют реакции синтеза азотистых оснований и аминокислот.
- Биотин – играет важную роль в синтезе ненасыщенных жирных кислот, также является участником азотистого обмена.
- *Пара*-аминобензойная кислота – является участником обмена веществ, а также составной частью фолиевой кислоты.
- Никотиновая кислота – является необходимым компонентом в синтезе коферментов.
- Гемин – составная часть ферментов, катализирующих реакции окисления.
- Холин – необходим для синтеза клеточных липидов и является донором метильных групп в биосинтетических реакциях [Реброва, 2010]

1.6.5. Математический метод планирования эксперимента.

Для оптимизации питательных сред часто используют математический метод планирования эксперимента, что позволяет обоснованно подходить к конструированию питательных сред и делать их более экономичными, а также быстро достигать поставленной цели [Савельева, 2017].

Математическое планирование эксперимента имеет несомненные преимущества перед традиционными однофакторными экспериментами, так как позволяют учитывать и варьировать одновременно все факторы и получать количественные оценки, как основных факторов, так и картину взаимодействия между ними. Стоит также отметить, что результаты, полученные с помощью данного метода, отличаются большей достоверностью, чем традиционные [Бирюков, 1985].

Одной из основных задач эксперимента является взаимосвязь между входными и выходными параметрами объекта и их численным выражением в виде математической модели. Эта модель представляет собой математическое представление наиболее важных отношений между объектными параметрами. Набор уравнений, условий и алгоритмических механизмов для поиска оптимизированных условий, а также информация об объектах, которые могут использоваться для управления имитируемым объектом для анализа и проектирования систем.

Переменные, которые могут влиять и измерять объект, называются внешними факторами. Очевидно, что факторы для эффективных экспериментов должны контролироваться и быть независимыми.

Точную комбинацию каждого фактора можно рассматривать как точку многомерных факторов. Диапазон комбинаций факторов, созданных в многомерной факторной среде, называется областью экспериментального плана. При разработке эксперимента для поиска наиболее благоприятных условий критерии оптимальности (параметр оптимизации) являются единственным выходным значением, зависящим от выходных параметров объекта. Эта функция называется ответом объекта на определенные факторы

и функцией ответа. Соответствующая функция ответа называется поверхностью ответа геометрического изображения в фазе фактов.

Выбор параметров оптимизации (критерии оптимизации) является одним из основных этапов первоначального исследования предмета исследования. Под оптимизацией понимается количественная цель. Параметр оптимизации - ответ на воздействие факторов, определяющих поведение исследуемой системы. Каждый реальный объект может быть представлен несколькими параметрами оптимизации. Параметры оптимизации должны выбираться на основе набора требований. Он должен быть:

- количественный, т. е. ввод числа;
- статистическое чувство единственности, присвоенный коэффициент должен соответствовать значению параметра оптимизации, инверсная проверка недействительна: значения переменных могут совпадать с одним и тем же значением параметра;
- характеристики объекта, процесса, явления должны быть универсальными и универсальными. Статистически эффективный параметр оптимизации имеет наименьшие погрешности измерения;
- есть ясный физический смысл. Это требование не только идентифицирует цель исследования, но и упрощает интерпретацию полученных результатов [Aksenova, 2015].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования.

В работе использовались штаммы *Methylobacterium extorquens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* из коллекции лаборатории биотехнологии физиологически активных веществ, Института Биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН.

Бактерии рода *Methylobacterium* строгие аэробы, кислород им служит терминальным акцептором электронов. Используют в качестве источника углерода метанол, а также, как было экспериментально доказано, глицерин, 3-метилортоформиат, метилать и другие. Каталазо-, уреазо- и оксидазоположительные [Kutscher, 2007].

Штамм *M. extorquens* хранили в течение 1 месяца при температуре +4°C на твердой питательной среде К с метанолом, в лиофилизованной форме в течении 1 года.

Бактерии рода *Bacillus* облигативные аэробы, используют кислород не только для клеточного дыхания, но и для окисления органических соединений, с целью получения энергии. В качестве источника углерода используется меласса, сахароза, глюкоза [Асатурова, 2009].

Штамм *B. subtilis* хранили в течении 1 месяца при температуре +4 °C на твердой питательной среде 5/5, в лиофилизированной форме в течении год.

Штамм *B. megaterium* хранили в течении 1 месяца при температуре +4°C на твердой питательной среде 5/5, в лиофилизированной форме в течении год.

Исследуемый препарат содержал бактериальные культуры в равных весовых соотношениях (*Bacillus megaterium*:*Bacillus subtilis*:*Methylobacterium extorquens*=1:1:1).

2.2. Условия культивирования.

2.2.1. Штамм *M. extorquens*.

Культивирование штамма *M. extorquens* проводили при следующих условиях:

- Температура $30 \pm 1^\circ\text{C}$;
- Исходное перемешивание (350 об/мин);
- Исходном минимальном расходе воздуха.

Как только значение растворенного кислорода снижалось на 20% от насыщения, его поддерживали на этом уровне постепенным увеличением числа оборотов мешалки до 900 об/мин, а затем постепенным увеличением расхода воздуха.

В процессе культивирования поддерживали рН культуральной жидкости на уровне 6,7-6,8 автоматически добавляя 25-% раствор аммиака. Периодически в ферментер стерильно подавали порциями метанол (от 5 до 20 мл), чтобы его концентрация в культуральной жидкости поддерживалась не выше 0,5%. Сигналом потребления метанола является резкий скачок значения растворенного кислорода, после подачи порции метанола данный показатель возвращается в норму.

При сильном вспенивании в ферментер подавали небольшое количество пеногасителя (3%-ную эмульсию Пропинола-Б 400).

Для получения большего количества биомассы по мере роста бактерий в культуральную жидкость добавляли 500 мл 10-кратного концентрата минеральной питательной среды. Обычную добавку концентрата среды вносили при достижении оптической плотности в пределах 25-30 ед.

Процесс культивирования прекращали при остановке роста оптической плотности культуральной жидкости.

Общее время ферментации составило 75-80 ч.

2.2.2. Штамм *B. subtilis* и *B.megaterium*.

Культивирование штаммов *B. subtilis* и *B.megaterium* проводили при следующих условиях:

- Температура $37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- Давлении 0,3 атм;
- Исходное перемешивание (250 об/мин);
- Исходном минимальном расходе воздуха;
- Возраст посевного материала – 24 ч.

В процессе культивирования поддерживали рН культуральной жидкости на уровне 7,0-7,2 автоматически добавляя 20-% раствор едкого натра.

При сильном вспенивании в ферментер подавали небольшое количество пеногасителя (3%-ную эмульсию Пропинола-Б 400).

Для получения большего количества биомассы по мере роста бактерий в культуральную жидкость добавляли 500 мл концентрата, состав которого представлен в таблице 1.

Таблица 1. Состав концентрата для культивирования штаммов *B. subtilis* и *B.megaterium*

№ п/п	Компонент	Содержание, г/л
1	Желатин	25
2	Сахароза	100

Процесс культивирования прекращали при остановке роста оптической плотности культуральной жидкости.

2.3. Питательные среды.

2.3.1. Реактивы и компоненты питательных сред.

Для культивирования штамма *M. extorquens* использовались следующие компоненты: калий фосфорнокислый, однозамещенный (ГОСТ 4198-75, АО «ЛенРеактив»), натрий фосфорнокислый, двухзамещенный

двенадцативодный (ГОСТ 4172-76, ООО «Компонент-Реактив»), аммоний серноокислый (ГОСТ 3769-78, АО «Реахим»), магний серноокислый, семиводный (ГОСТ 4523-77, ООО «Стромэкс»), кальций хлористый, двуводный (ГОСТ 450-77, ОАО «Техстрой»), железо серноокисное, закисное, семиводное (ГОСТ 4148-78 ООО «Компонент-Реактив»), кобальт хлористый, шестиводный (ГОСТ 4525-77, ООО «ПрофСнаб»), марганец серноокислый, пятиводный (ГОСТ 435-77, ООО "УЛИСС"), цинк серноокислый, семиводный (ГОСТ 4174-77, ООО «Спектр-Хим»), натрий молибденовоокислый, двенадцативодный (ГОСТ 10931-74, ООО "СибМеталлТорг"), медь серноокислая, пятиводная (ГОСТ 4165-78, ООО «Промхим»), сахароза (ГОСТ 5833-75, ООО «Русская Торговая Организация»), желатин (ГОСТ 11293-89, ООО «Профитрейд»), манит (ГОСТ, ТУ 6 - 09 - 5484 – 90, ООО «Химпромторг»).

Для культивирования штамма *M. extorquens* использовались следующие реагенты: метанол (ГОСТ 6995-77, ЗАО «ЭКОС-1», Россия), триметилортоформиат (ТУ 6-09-11-950-77, ООО «Кемикал Лайн»), метилацетат (ГОСТ 12712-2013, ООО «ХимСинтез»), метилаль (ТУ 2319-002-57170644-02, ООО «Синтез-Инжиниринг»), этиленгликоль (ГОСТ 19710-83, ООО «Куранты»), глицерин (ГОСТ 6824-96, ООО «Синтез»), формиат Na (ГОСТ: 243241, ООО «Рубин»), диметилформамид (ГОСТ 20289-74, ООО «МСД Кемикалс»), диметилсульфоксид (ТУ 2635-114-44493179-08, ООО «ЭКОС-1»), мочеви́на (ГОСТ 2081-2010, ЗАО «Ретиноиды»), хлористый метилен (ГОСТ 9968-86, ООО «Органическая Химия»), формиат аммония (ГОСТ 30333-2007, ООО «Мариуполь»), метиламин (ГОСТ Р 52756-2007, ООО «УКР-Химия»), изопропанол (ГОСТ 9805-84, ООО «МСД Кемикалс»), этилформиат (ГОСТ 31684-2012, ООО «Biochem»).

Для культивирования штамма *B. subtilis* использовались следующие компоненты: глюкоза (ГОСТ 975-88, ООО «Русский Химик»), соевый пептон («НІМЕDІА»), дрожжевой экстракт (ООО «Диаэм» #3017), агар микробиологический (ГОСТ 17206-96, «НІМЕDІА» lot 0000274043),

глицерин (ГОСТ 6259-75, ООО «Русский Химик»), соевая мука полножирная (ГОСТ 3898-56, ООО «Тагрис»), MgCl₂ (ГОСТ 4209-77, ООО «Русский Химик»), KН₂РO₄ (ГОСТ 2493-77, ООО «Русский Химик»), KNO₃ (ГОСТ 4217-77, ООО «Русский Химик»), СаСl₂ (ГОСТ 450-77, ООО «Русский Химик»), СОМ (ОАО «Савушкин продукт»), CuSO₄ (ГОСТ 4165-78, ООО «Русский Химик»), MgSO₄ (ГОСТ 4523-77, ООО «Русский Химик»), FeSO₄ (ГОСТ 4148-78, ООО «Русский Химик»), MnSO₄ (ГОСТ 435-77, ООО «Русский Химик»), (NH₄)₂SO₄ (ГОС 3769-78, ООО «Русский Химик»), гороховая мука (ТУ 9293-414-23476484-02), соевая обезжиренная мука (ГОСТ 3898-56, ООО «Тагрис»), хлопковая мука («Chandrashekhar exports private limited»), перьевая мука (ООО «Агрикор»), пшеничная мука (ГОСТ Р 52189-03), мясной пептон (ГОСТ 13805-76, ООО «Русский Химик»), кукурузный экстракт (ООО «Каргилл», СТО 00365517-005-2010).

Для культивирования штамма *B. subtilis* использовались следующие реагенты: лапрол (ТУ 2226-023-10488057-95, ПАО «Нижекамскнефтехим»), желатин (ГОСТ 11293-89, (ООО «Русский химик»), сахароза (ГОСТ 5833-75 ТД «ХАВИАР»).

Для культивирования штамма *B. megaterium* использовались следующие компоненты: глюкоза (ГОСТ 975-88, ООО «Русский Химик»), соевый пептон («НІМЕDІА»), дрожжевой экстракт (ООО «Диаэм» #3017), агар микробиологический (ГОСТ 17206-96, «НІМЕDІА» lot 0000274043), глицерин (ГОСТ 6259-75, ООО «Русский Химик»), соевая мука полножирная (ГОСТ 3898-56, ООО «Тагрис»), MgCl₂ (ГОСТ 4209-77, ООО «Русский Химик»), KН₂РO₄ (ГОСТ 2493-77, ООО «Русский Химик»), KNO₃ (ГОСТ 4217-77, ООО «Русский Химик»), СаСl₂ (ГОСТ 450-77, ООО «Русский Химик»), СОМ (ОАО «Савушкин продукт»), CuSO₄ (ГОСТ 4165-78, ООО «Русский Химик»), MgSO₄ (ГОСТ 4523-77, ООО «Русский Химик»), FeSO₄ (ГОСТ 4148-78, ООО «Русский Химик»), MnSO₄ (ГОСТ 435-77, ООО «Русский Химик»), (NH₄)₂SO₄ (ГОС 3769-78, ООО «Русский Химик»), гороховая мука (ТУ 9293-414-23476484-02), соевая обезжиренная мука

(ГОСТ 3898-56, ООО «Тагрис»), хлопковая мука («Chandrashekar exports private limited»), перьевая мука (ООО «Агрикор»), пшеничная мука (ГОСТ Р 52189-03), мясной пептон (ГОСТ 13805-76, ООО «Русский Химик»), кукурузный экстракт (ООО «Каргилл», СТО 00365517-005-2010).

2.3.2. Состав питательных сред.

2.3.2.1. Состав питательных сред для штамма *M. extorquens*.

В ходе выполнения исследований, применялись следующие питательные среды:

1. Твёрдая агаризованная среда К для поддержания штамма в активном состоянии (г/л): KH_2PO_4 – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; NaCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,002; Агар - агар – 17; CH_3OH /другой источник углерода – 5 мл/л.

2. Жидкая питательная среда К для выращивания посевного материала в качалочных колбах (г/л): KH_2PO_4 – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; NaCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,002; CH_3OH /другой источник углерода – 5 мл/л.

3. Ферментационная питательная среда К для выращивания посевного материала в биореакторах и культивирования штамма *M. extorquens* в ферментерах (г/л): KH_2PO_4 – 1,0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,002; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,002; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; глицерин – 5 мл/л. pH среды = 6,7-6,8.

4. Защитная среда при лиофилизации (г/л): 50 г сахарозы, 10 г желатина или манита.

2.3.2.2. Состав питательных сред для штамма *B. megatetium*.

В ходе выполнения исследований, применялись следующие питательные среды:

1. Твёрдая агаризованная среда 5/5 для поддержания штамма в активном состоянии (г/л): аминокептид – 60 мл/л; гидролизат казеина – 5 г/л; соевый пептон – 1 г/л; дрожжевой экстракт – 1 г/л; агар-агар – 18 г/л.

2. Жидкая питательная среда 5/5 для выращивания посевного материала в качалочных колбах (г/л): аминокептид – 60 мл/л; гидролизат казеина – 5 г/л; соевый пептон – 1 г/л; дрожжевой экстракт – 1 г/л.

3. Ферментационная питательная среда для выращивания посевного материала в биореакторах и культивирования штамма *B. megatetium* в ферментерах (г/л): меласса -25 г/л; кукурузный экстракт – 12,5 г/л; дрожжевой экстракт – 1 г/л; MgSO₄ – 0,25 г/л; MnSO₄ – 0,03 г/л; CoCl₂ – 0,046 г/л; CaCl₂- 1 г/л; лапрол – 1 г/л.

4. Защитная среда при лиофилизации (г/л): 50 г сахарозы, 10 г желатина или манита.

2.3.2.3. Состав питательных сред для штамма *B. Subtilis*.

В ходе выполнения исследований, применялись следующие питательные среды:

1. Твёрдая агаризованная среда 5/5 для поддержания штамма в активном состоянии (г/л): аминокептид – 60 мл/л; гидролизат казеина – 5 г/л; соевый пептон – 1 г/л; дрожжевой экстракт – 1 г/л; агар-агар – 18 г/л.

2. Жидкая питательная среда 5/5 для выращивания посевного материала в качалочных колбах (г/л): аминокептид – 60 мл/л; гидролизат казеина – 5 г/л; соевый пептон – 1 г/л; дрожжевой экстракт – 1 г/л.

3. Ферментационная питательная среда для выращивания посевного материала в биореакторах и культивирования штамма *B. megatetium* в ферментерах (г/л): меласса -25 г/л; кукурузный экстракт – 12,5 г/л; дрожжевой экстракт – 1 г/л; MgSO₄ – 0,25 г/л; MnSO₄ – 0,03 г/л; CoCl₂ – 0,046 г/л; CaCl₂- 1 г/л; лапрол – 1 г/л.

4. Защитная среда при лиофилизации (г/л): 50 г сахарозы, 10 г желатина или манита.

2.4. Методы исследования штаммов *M. Extorquens*, *B. Megatetium*, *B. Subtilis* и бактериального препарата на их основе.

2.4.1. Определение количества биомассы в культуральной жидкости методом определения сухих веществ.

Для определения количества биомассы клеток в культуральной жидкости использовали метод определения сухих веществ центрифугированием и дальнейшим высушиванием биомассы в термостате в течение 2-3 суток при 37°C. Полученный результат представлен на рисунке 1.



Рисунок 1 – Образец высушенной биомассы штамма *B. megaterim*

2.4.2. Определение КОЕ/мл с помощью камеры Горяева.

Наиболее распространенным методом определения КОЕ/мл суспензии является их подсчет под микроскопом с использованием счетной камеры Горяева.

Подсчет клеток проводили под микроскопом, который настраивали таким образом, чтобы была видна нанесенная на камеру сетка и клетки штаммов *M. extorquens*, *B. Megatetium*, *B. Subtilis* и препарата на их основе равномерно распределенных на ней. Считали число клеток в 5 горизонтальных и 15 диагональных больших квадратах, после чего определяли число клеток (x) в 1мл исследуемой взвеси по формуле:

$$x = \frac{a}{20} * N * k * b = \frac{a * 225 * 1111}{20} * b = a * 12499 * b, \text{ где:}$$

a – число клеток в 20 квадратах;

N = 225 – число больших квадратов в камере Горяева;

k – коэффициент, равный величине, обратной объему камеры Горяева ($v=0,9 \text{ мм}^3=0,910\text{-}3\text{мл}$);

b – разведение исходной взвеси микроорганизма.

[ОФС.1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток].

2.4.3. Определение КОЕ/мл методом последовательных разведений.

Готовую суспензию штаммов *M. Extorquens*, *B. Megatetium*, *B. Subtilis* и препарата на их основе в количестве 1 мл при помощи микропипетки со стерильным наконечником вносили в первую пробирку, содержащую 9 мл воды. Тщательно перемешивали и новым стерильным наконечником переносили 1 мл раствора в воду во вторую пробирку, содержащую первоначально 9 мл воды. Эту процедуру повторяли, пока не приготовили весь необходимый ряд разведений.

Таким образом, получили ряд пробирок с разведениями исходной суспензии штаммов *M. extorquens*, *B. Megatetium*, *B. Subtilis* и препарата на их основе концентрации которых отличаются в соседних пробирках в 10 раз.

После приготовления разведений, последние три сеяли по 100 мкл на чашки Петри с твердой питательной средой и инкубировали в течение 2-3 суток при температуре 28 °С.

2.4.4. Методика приготовления физиологического раствора.

Взвешивали 9 г NaCl и растворяли в дистиллированной воде. Полученный раствор стерилизовали 30 минут при 1 атм.

2.4.5. Методика приготовления суспензии исследуемых штаммов *M. extorquens*, *B. Megatetium*, *B. Subtilis* и препарата на их основе с различными концентрациями.

К 20 мл стерильного физиологического раствора добавляли 1 г лиофильно высушенных культур *M. extorquens*, *B. Megatetium*, *B. Subtilis* и препарата на их основе, затем полученную суспензию подвергали процессу гидратации при перемешивании 220 об/мин в течение часа при температуре 28°С.

Далее готовую суспензию штаммов *M. extorquens*, *B. Megatetium*, *B. Subtilis* и препарата на их основе (концентрация 5 г/л) использовали для приготовления серии разведений и получения концентраций – 1; 0,5; 0,1.

2.4.6. Определение оптической плотности раствора.

Для определения концентрации суспензии штамма *B. Subtilis* в фотоколориметре КФК 3-01 применяли метод сравнения оптических плотностей среды 5/5 и культуральной жидкости при $\lambda=600$ нм. По данным измерения оптической плотности оценивали увеличение биомассы спустя 1, 2 и 3 сутки культивирования штамма *B. Subtilis*.

2.5. Изучение влияния биологической активности исследуемых штаммов и бактериального препарата на рост фитопатогенных грибов.

2.5.1. Метод радиального роста.

Противогрибную активность исследуемых штаммов *M. extorquens*, *B. Megatetium*, *B. Subtilis* бактериального препарата на их основе оценивали *in vitro* в отношении *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Phoma exigua*, *Cercospora beyicola*, *Botrytis cinerea* методом радиального роста на агаризованной среде КГА [Qiu, 2014].

Суспензию препарата с концентрациями 5,0, 1,0, 0,5, 0,1 г/л в количестве 0,1 мл вносили в стерильные чашки Петри диаметром 85 см со средой КГА. В стерильных условиях с помощью стерильного стеклянного шпателя суспензию клеток равномерно распределяли по поверхности агаризованной среды и оставляли на 10-15 минут.

Далее в центр испытуемых чашек помещали диск диаметром 10 мм с суточными культурами *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Phoma exigua*, *Cercospora beyicola*, *Botrytis cinerea* и инкубировали при 26 °С. Рост грибов на чашках в контроле и опытных вариантах замеряли на 3, 7 и 15 сутки.

Противогрибную активность вычисляли по формуле (1):

$$\text{Противогрибная активность (ПА)} = (1 - D_a / D_b) \times 100\%, \quad (1)$$

где D_a - диаметр колонии в опытном варианте, мм

D_b - диаметр колонии в контрольном варианте, мм

Были выполнены три повторности каждого эксперимента, для расчета брали среднеарифметическое значение.

2.5.2. Модифицированный метод бумажных дисков.

Действие бактериального препарата на фитопатогенные грибы – *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Phoma exigua*, *Cercospora beyicola*, *Botrytis cinerea* изучали с использованием модифицированного метода бумажных дисков, смоченных в суспензии препарата с концентрациями 5.0, 1.0, 0.5, 0.1 г/л [МУК 4.2.1890—04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам]. Приготовленный КГА разливали в стерильные чашки Петри.

В ламинар-боксе готовили споровые суспензии патогенов, для этого в чашку с патогеном наливали 10-15 мл стерильного физиологического раствора и микробиологической петлей сбивали споры с воздушного мицелия, затем полученную суспензию фильтровали через асептический ватный фильтр. Концентрацию спор в суспензии подсчитывали с помощью камеры Горяева и доводили путем разведения до 1×10^6 спор/мл, после чего раскатывали по 0.1 мл полученной споровой суспензии в каждую чашку Петри и стеклянным шпателем осторожно растирали по всей поверхности агара.

Стерильные бумажные диски (диаметр 6 мм), смоченные в суспензии препарата с исследуемой концентрацией (5.0, 1.0, 0.5, 0.1 г/л), раскладывали равномерно на агазизованную среду (на каждую чашку Петри по 3 бумажных диска).

В контрольном варианте диски смачивались в стерильном физиологическом растворе.

Опытные чашки Петри помещали в термостат при температуре 26°C. На 3-и и 7-е сутки измеряли диаметр зоны ингибирования фитопатогенных грибов вокруг дисков с испытуемыми вариантами. Опыт проводили дважды в 3-кратной повторности.

Полученные результаты были проанализировали с помощью программы Statistica 6.0 при значении $p < 0.05$, Данные экспериментов представлены усредненными значениями.

2.5.3. Метод оценки противогрибной активности на модельном объекте

Эксперимент проводится в ламинар-боксе при соблюдении аспетических условий. Предварительно перед постановкой эксперимента плоды промываюли сначала водопроводной, затем стерильной водой и высушивали. Далее в ламинар-боксе стерильной деревянной палочкой повреждают плоды. Затем поврежденные плоды помещают в заранее приготовленную суспензию бактериального препарата с концентрацией 5 г/л и выдерживают 10-15 мин. По прошествии времени плоды переносят в индивидуальные стерильные пластиковые емкости и высушивают около 20 минут. Далее в отверстие вносят по 0, 2 мл споровой суспензии с титром спор 10^3 , в каждую индивидуальную емкость вносят также 1 мл стерильной воды и инкубируют при 25 градусах. Контрольный образец не замачивается в суспензии бактериального препарата. Результат оценивают на 3, 7 и 14 сутки визуально [Минаева, 2018].

2.6. Статистическая обработка результатов эксперимента

Результаты u_k повторностей одного опыта различаются друг от друга и являются случайными величинами, подчиняющимися нормальному закону распределения вероятностей (здесь u – критерий оптимальности; k - номер повторности опыта; $k = 1 \div m$).

Экспериментальные оценки истинного значения определяемого параметра и его дисперсии.

По имеющимся в распоряжении исследователя m результатам повторностей одного опыта можно получить не истинное значение

измеряемого параметра y и его дисперсии σ^2 , а лишь их экспериментальные оценки в виде средней арифметической \tilde{y} и выборочной дисперсии $S^2(y_k)$:

$$\tilde{y} = m^{-1} \sum_{k=1}^m y_k:$$

$$S^2(y_k) = \sum_{k=1}^m (y_k - \tilde{y})^2 / (m-1) = \sum_{k=1}^m \Delta y^2_k / (m-1)$$

Оценка среднеквадратичного отклонения единичного результата равна корню квадратному из выборочной дисперсии единичного результата:

$$S(y_k) = \sqrt{\sum_{k=1}^m \Delta y^2_k / (m-1)},$$

где $f = m-1$ число степеней свободы, имевшее место при определении дисперсии по m повторностям, разность между числом независимых переменных (число результатов y_k) и числом уравнений, связывающих эти переменные (одно уравнение для расчёта \tilde{y}).

Среднеквадратичное отклонение из всех повторностей определяется по формуле:

$$S(\tilde{y}) = S(y_k) / \sqrt{m},$$

так как дисперсия среднеарифметического результата \tilde{y} в m раз меньше дисперсии единичного значения. При $m \rightarrow \infty$ $S^2(\tilde{y}) \rightarrow 0$.

Если в распоряжении экспериментатора находятся результаты нескольких серий многократных измерений величины одного и того же параметра при различных условиях ведения процесса, то появляется возможность использовать результаты повторностей всех серий для расчёта так называемой средневзвешанной оценки дисперсии единичного результата.

В каждой серии из N серий ($u=1+N$) дисперсия единичного результата

$$S^2(y_{uk}) = \sum_{k=1}^m \Delta y^2_{uk} / (m-1).$$

Если эти оценки однородны, то средневзвешанную для всех серий дисперсию единичного результата $S^2(y_k)$ можно посчитать по следующим соотношениям: при $m_u = m = \text{const}$

$$S^2(y_k) = N^{-1} \sum_{u=1}^N S^2(y_{uk}) = \sum_{u=1}^N \sum_{k=1}^m \Delta y^2_{uk} / [N(m-1)].$$

В этом случае $f=N(m-1)$;

При разных $m_u S^2(y_k) = \left[\sum_{u=1}^N (m_u - 1) \right]^{-1} \sum_{u=1}^N S^2(y_{uk})(m_u - 1)$.

В этом случае $f= \sum (m_u - 1)$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Результаты исследования противогрибной активности штамма *Bacillus subtilis*.

Эксперимент по изучению влияния активности штамма *Bacillus subtilis* по отношению к следующим фитопатогенным микроорганизмам: *F. solani*, *F. oxysporum*, *A. solani*, *A. alternata*, *C. beticola*, *B. cinerea* был проведен по методике, описанной в п. 2.5.1. Результаты эксперимента, зафиксированные на 3 сутки инкубации представлены на рисунке 2.

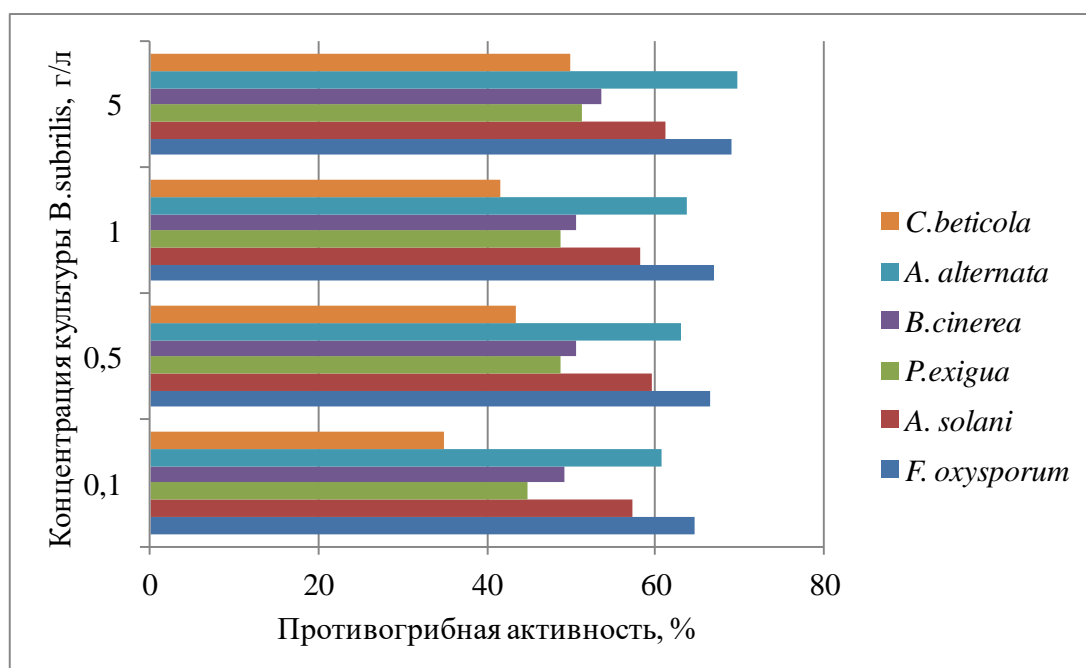


Рисунок 2 – Противогрибная активность штамма *B. subtilis* в отношении исследуемых фитопатогенных грибов на 3 сутки инкубации

Наибольшая активность штамма *B. subtilis* по отношению к изученным фитопатогенным грибам проявляется при концентрации 5 г/л, максимальное угнетение роста отмечено у *A. alternata* и *F. oxysporum*. По отношению ко всем изученным фитопатогенным микроорганизмам штамм проявляет высокую активность, которая составляет более 50%.

Влияние штамма *B. subtilis* на рост исследуемых фитопатогенных грибов на 7 сутки инкубации представлен на рисунке 3.

Наибольшая активность штамма *B. subtilis* по отношению к изученным фитопатогенным грибам проявляется при концентрации 5 г/л, максимальное угнетение роста отмечено у *B.cinerea*, так же высокую активность штамм проявляет в отношении следующих фитопатогенов: *A. alternata*, *A. solani* и *F. oxysporum*.

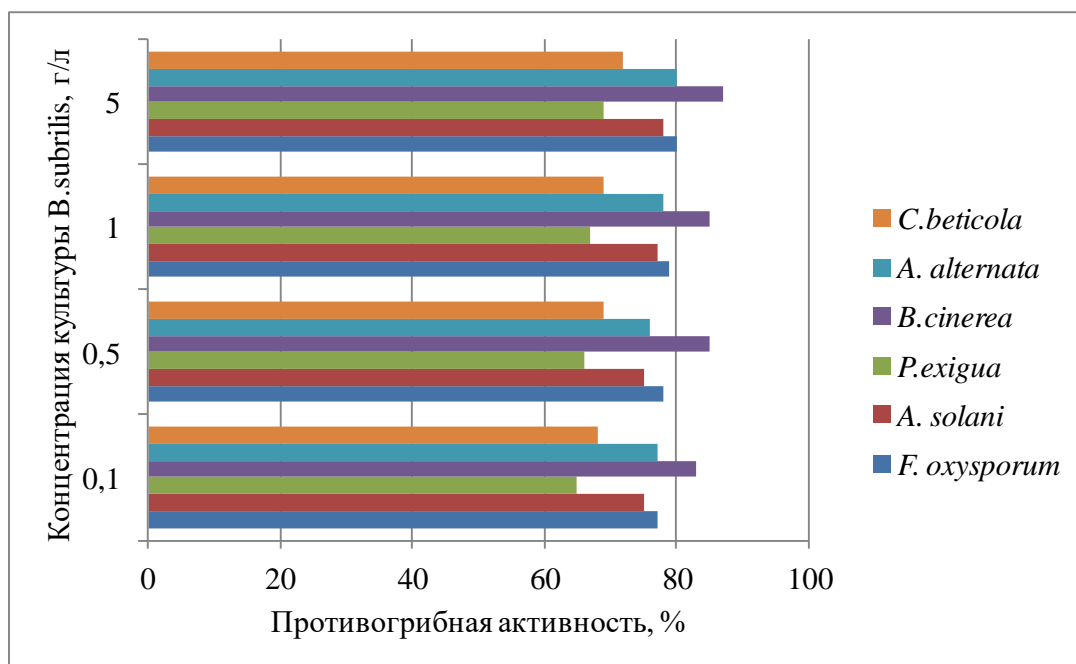


Рисунок 3 – Противогрибная активность штамма *B. subtilis* в отношении исследуемых фитопатогенных грибов на 7 сутки инкубации

Далее нами было изучено влияние штамма *B. subtilis* на рост фитопатогенных грибов на 14 сутки инкубации, полученные данные, были обработаны согласно методике, описанной в пункте 2.5.1 и сведены в диаграмму, представленную на рисунке 4.

Согласно полученным данным, штамм проявляет высокую активность в отношении всех исследуемых фитопатогенных грибов, стоит отметить, что максимальное угнетение роста (более 80 %) отмечено у следующих фитопатогенных грибов: *B. cinerea*, *P. exigua*, *F. oxysporum*, *A. solani* при различных концентрациях бактериального штамма.

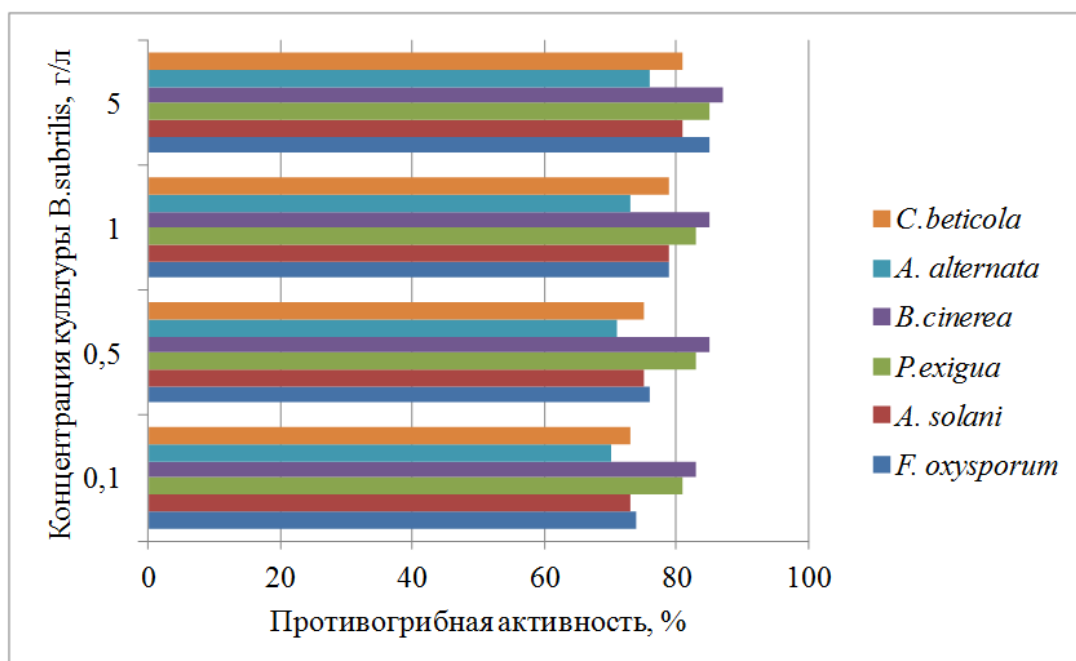
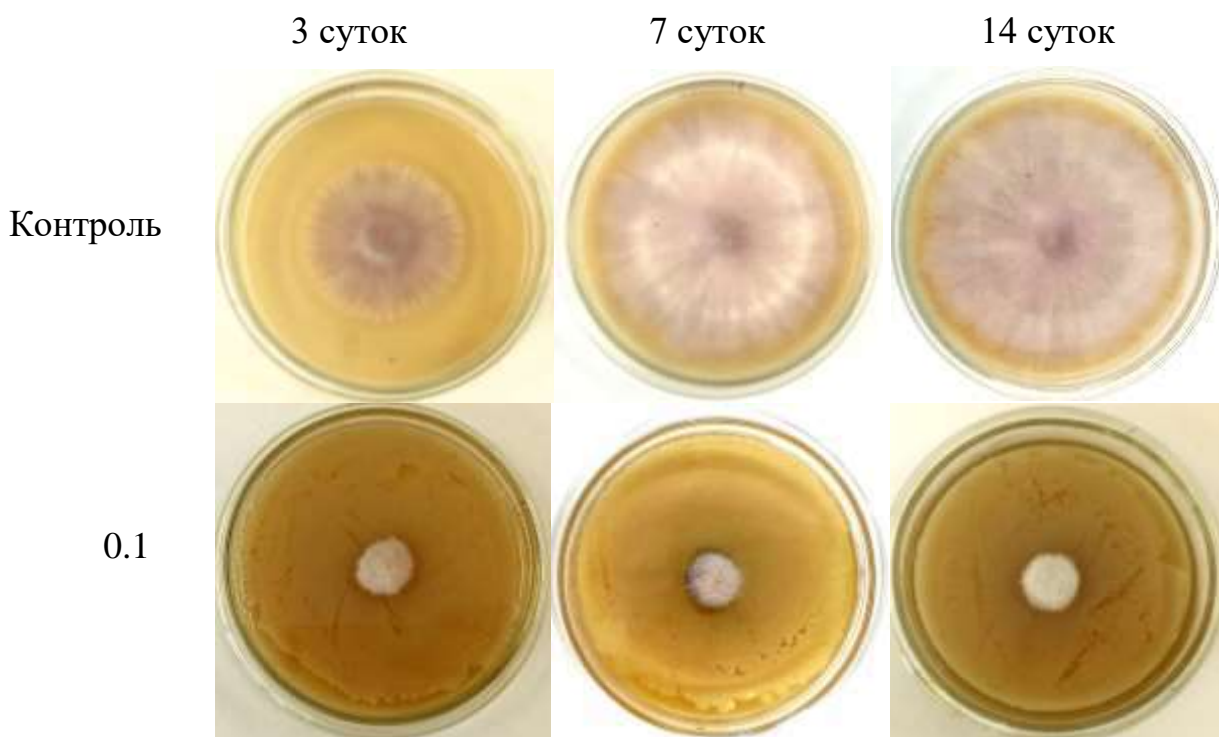
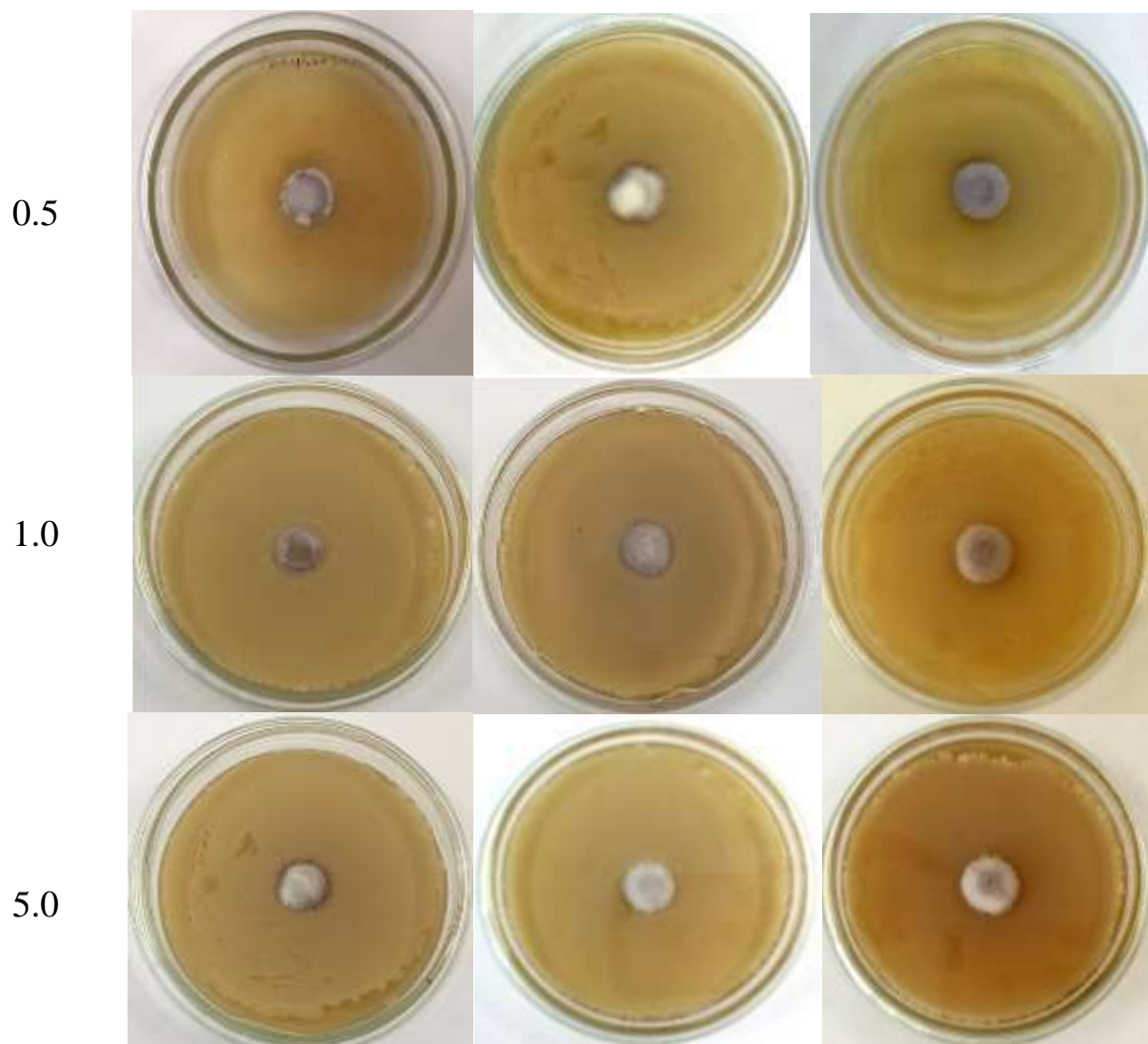


Рисунок 4 – Противогрибная активность штамма *B. subtilis* в отношении исследуемых фитопатогенных грибов на 14 сутки инкубации

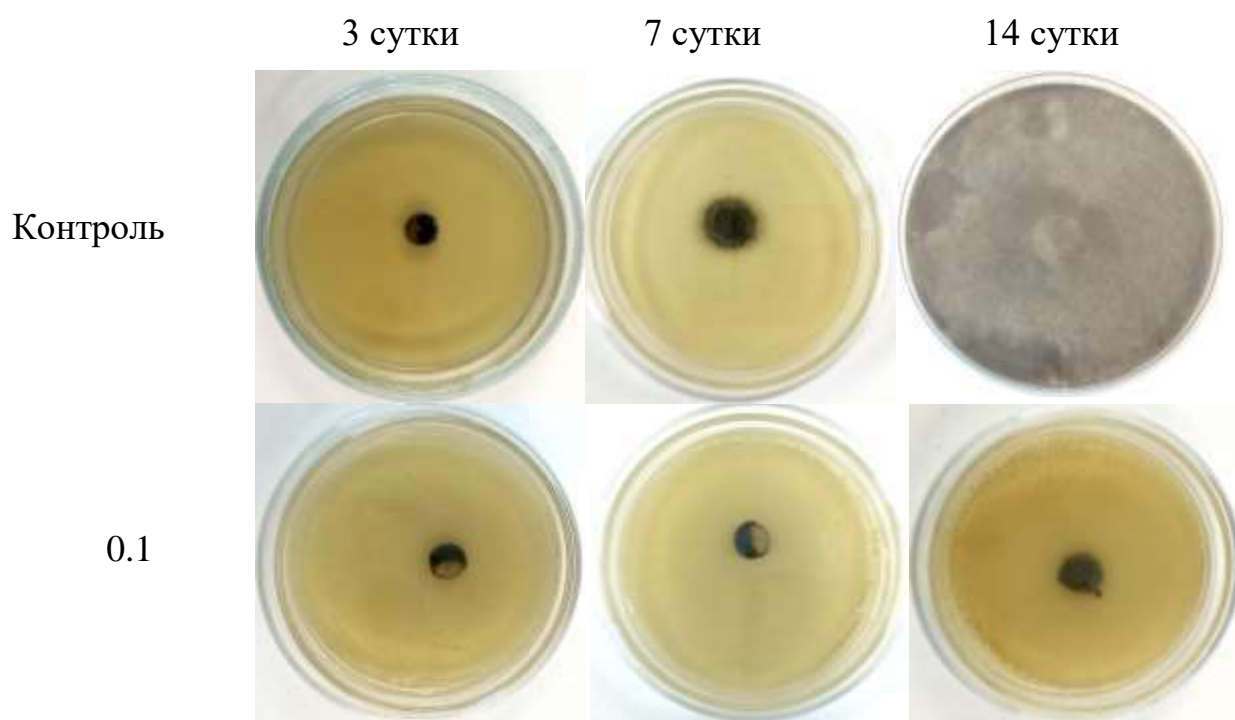
На рисунке 5 представлены данные, демонстрирующие влияние различных концентраций суспензии штамма *Bacillus subtilis* на рост исследуемых фитопатогенных микроорганизмов, зафиксированные на 3, 7 и 14 сутки инкубации.

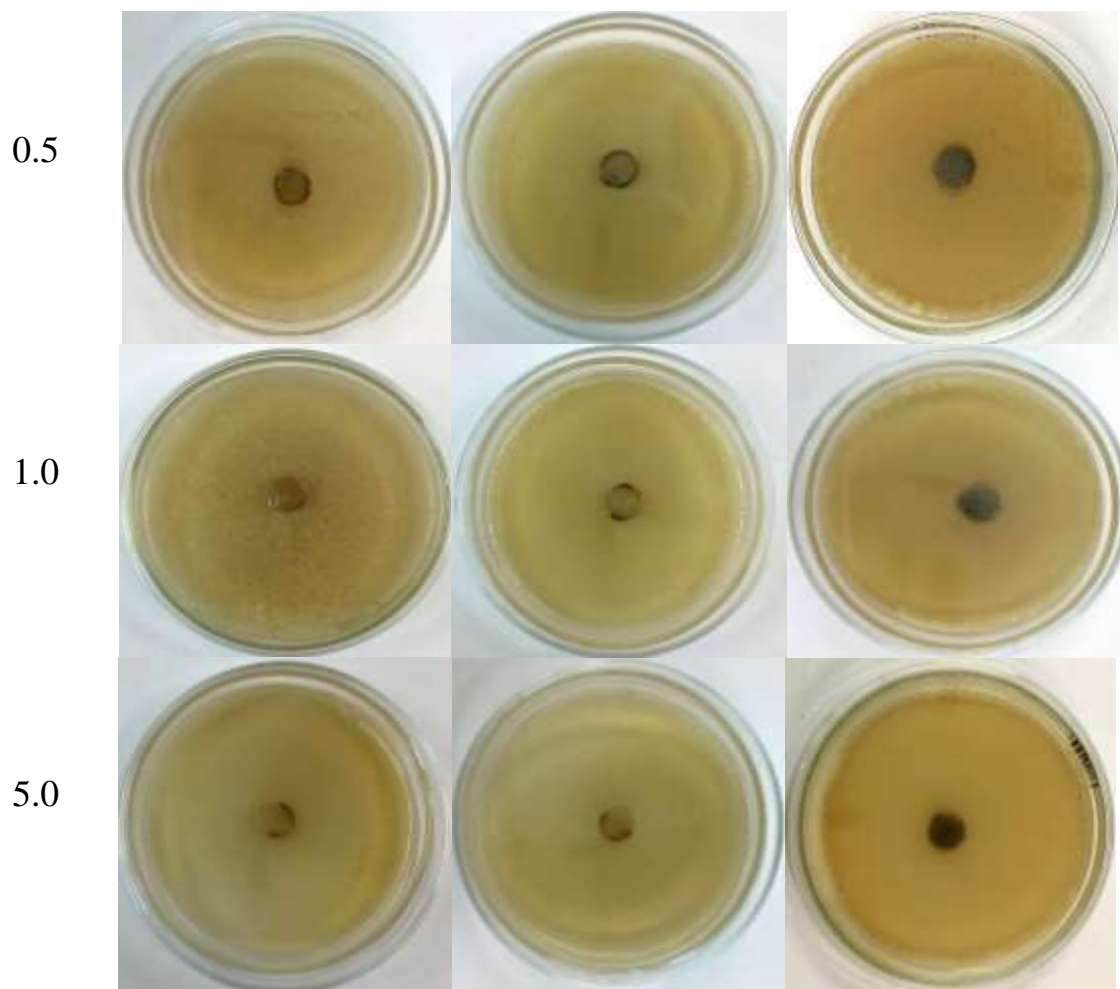
a) *Fusarium oxysporum*



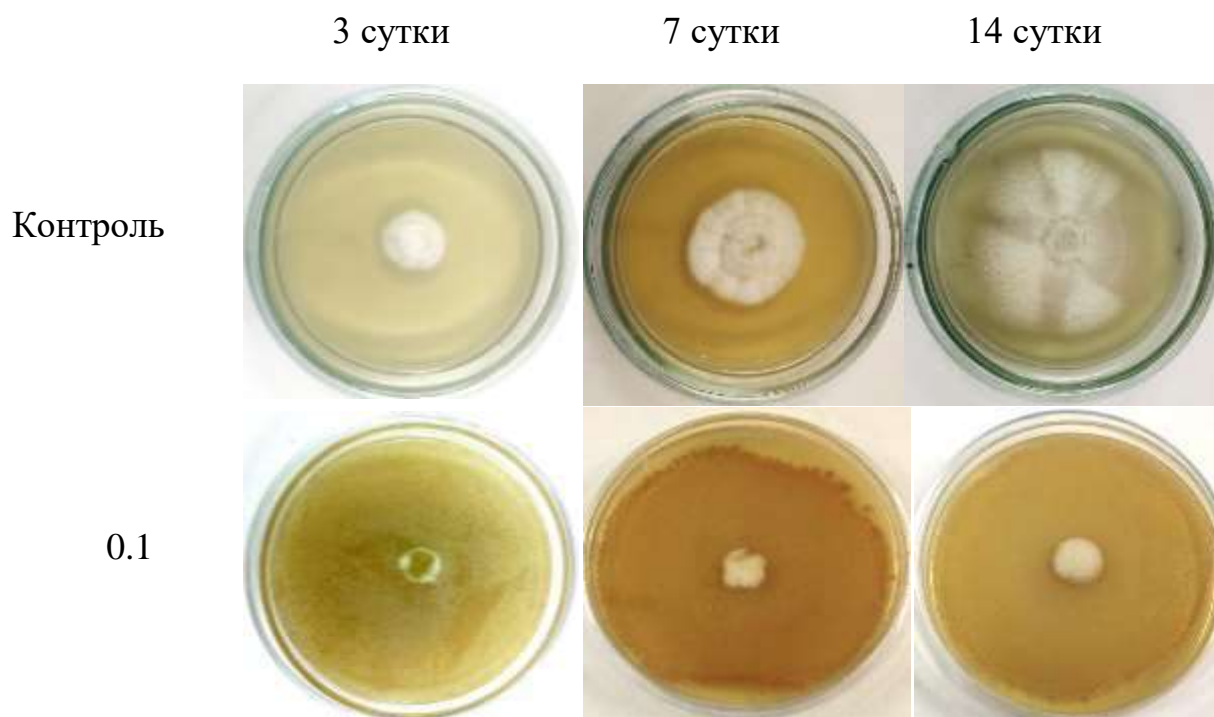


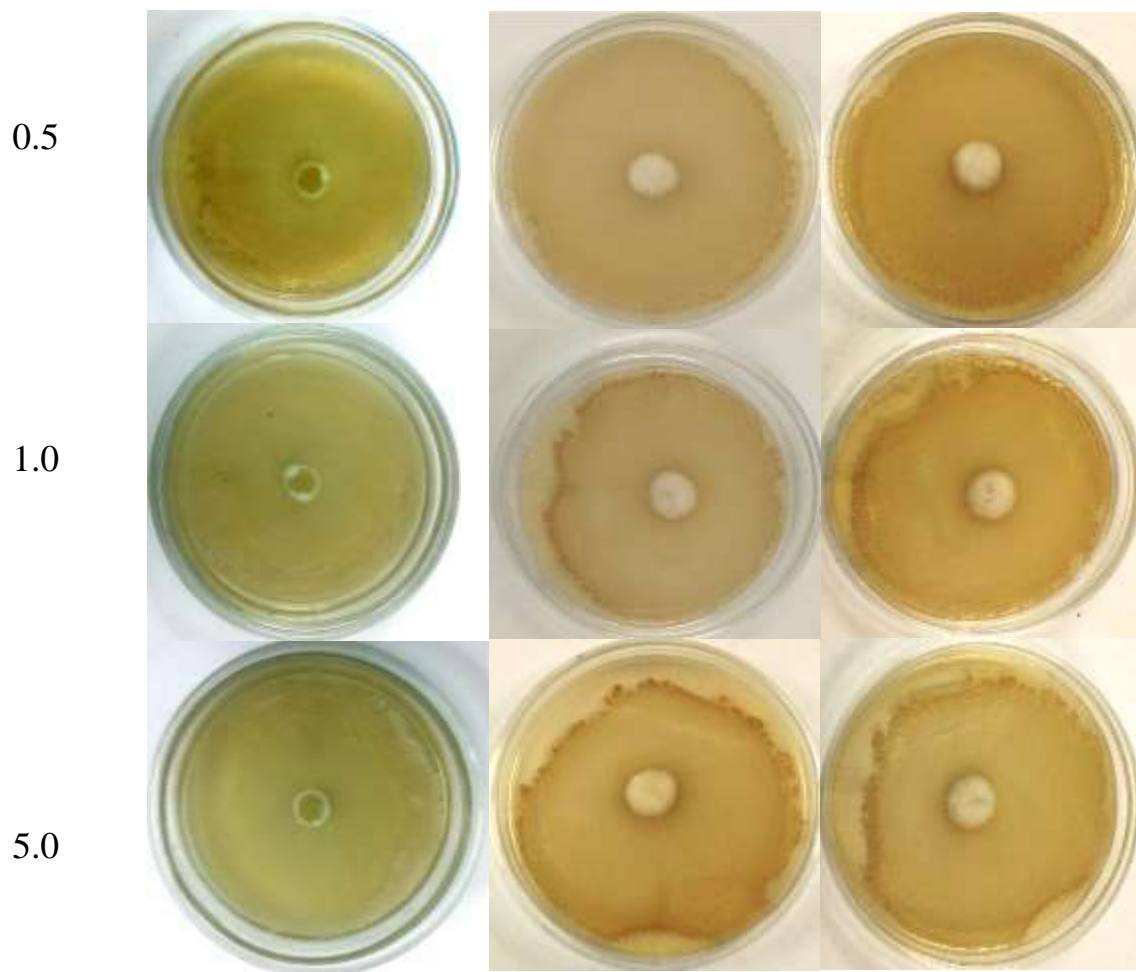
б) *Botrytis cinerea*



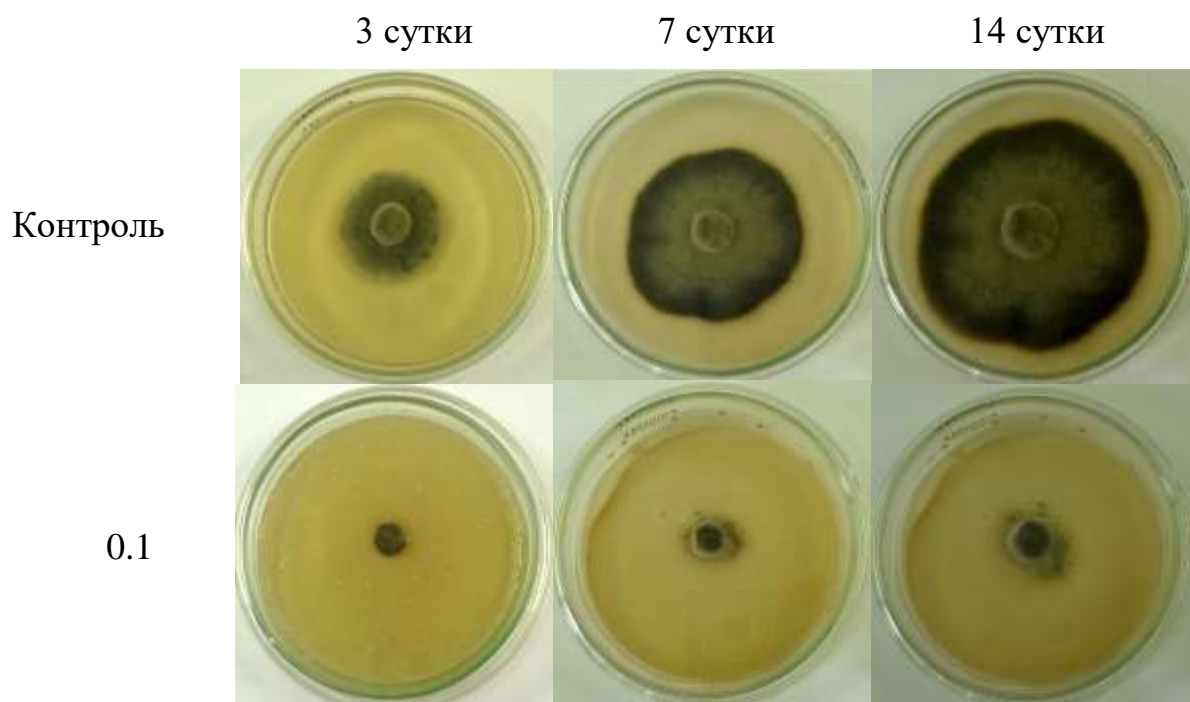


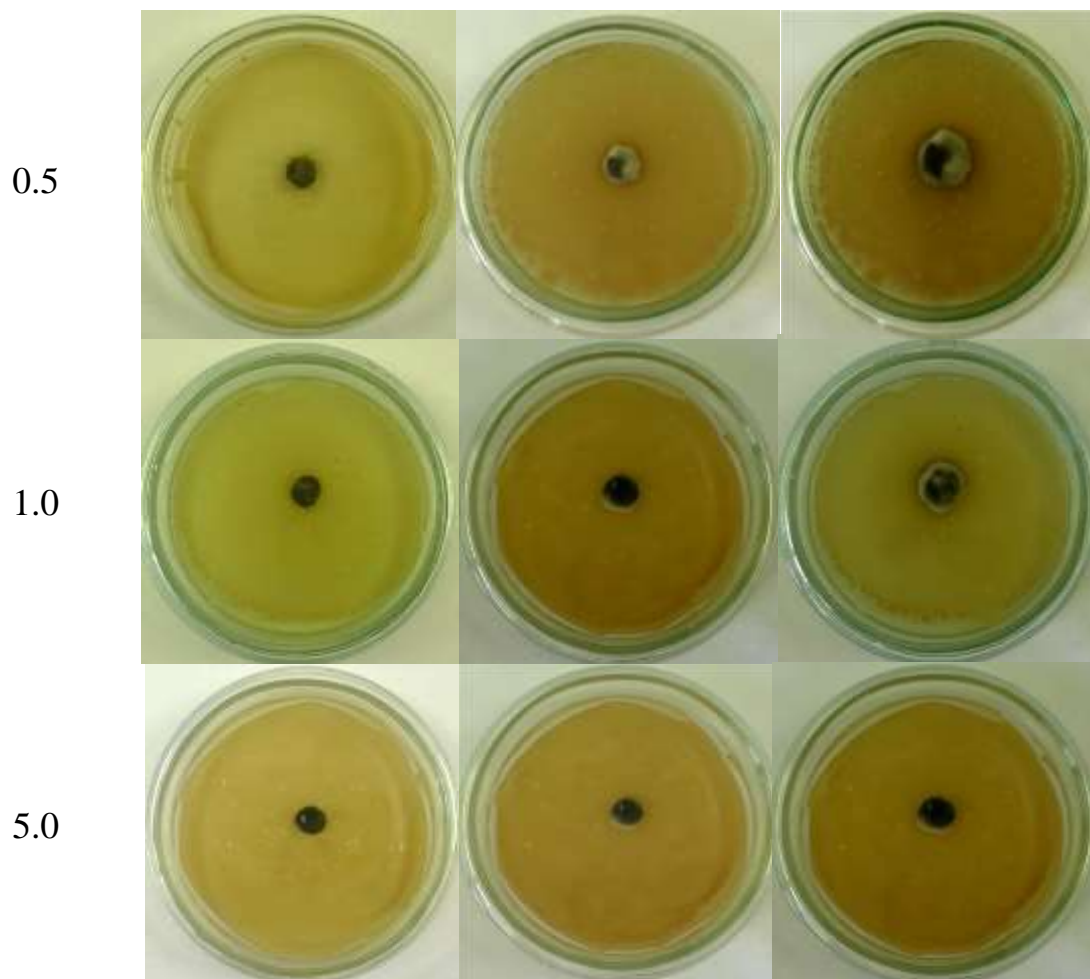
в) *Phoma exigua*





г) *Cercospora beticola*





д) *Alternaria alternata*

3 сутки

7 сутки

14 сутки

Контроль



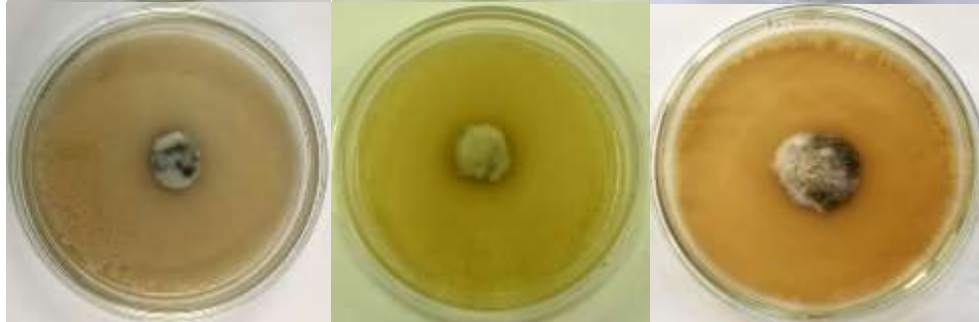
0.1



0.5



1.0



5.0



e) *Alternaria solani*

3 сутки

7 сутки

14 сутки

Контроль



0.1



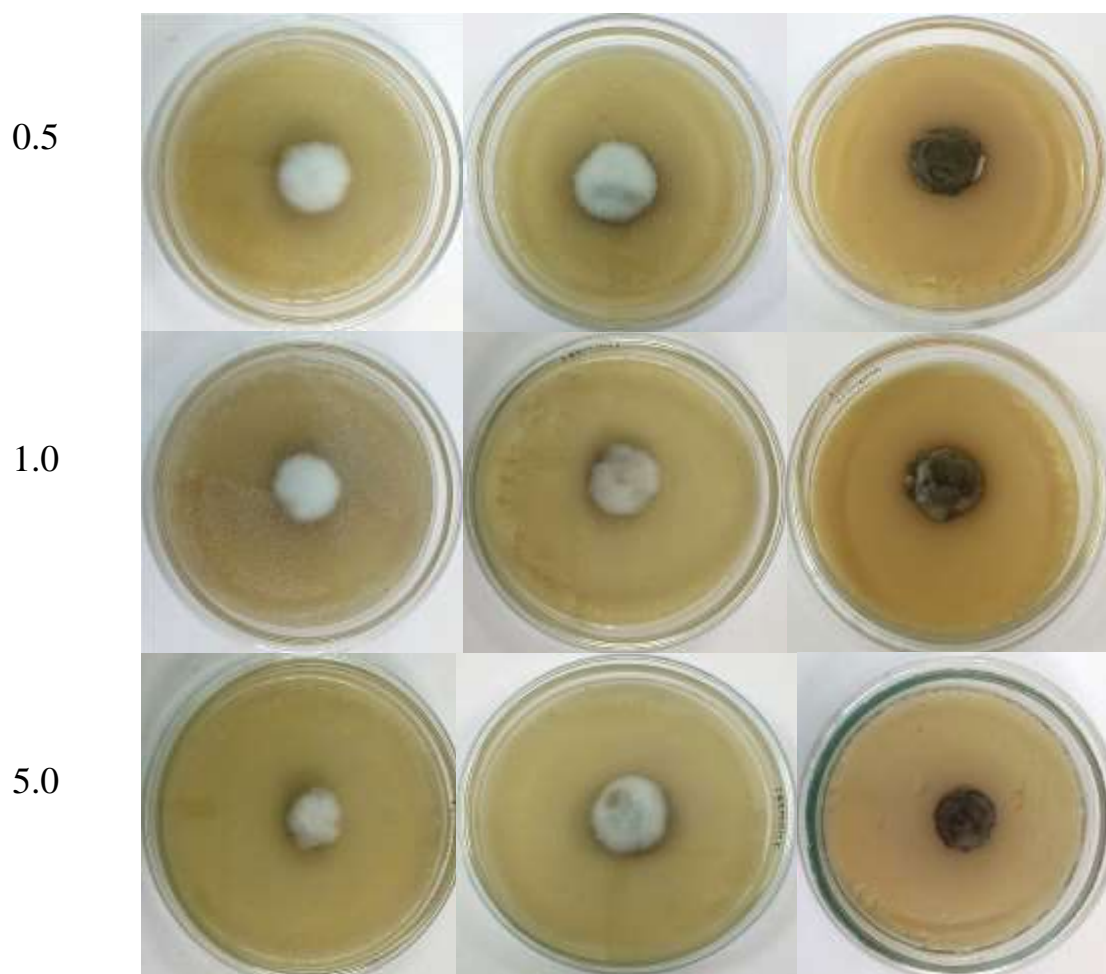


Рисунок 5 – Влияние различных концентраций суспензии штамма *B.subtilis* на рост фитопатогенных грибов

Полученные данные подтверждают высокую противогрибную активность штамма *Bacillus subtilis* в отношении исследуемых фитопатогенных грибов, что позволяет рекомендовать его использование в качестве компонента бактериального препарата.

3.2. Результаты исследования противогрибной активности штамма *Bacillus megaterium*.

Эксперимент по изучению влияния активности штамма *Bacillus megaterium* по отношению к следующим фитопатогенным микроорганизмам: *F. solani*, *F. oxysporum*, *A. solani*, *A. alternata*, *C. beticola*, *B. cinerea*. был проведен по методике, описанной в пункте 2.5.1. Результаты эксперимента, зафиксированные на 3 сутки представлены на рисунке 6 в виде диаграммы.

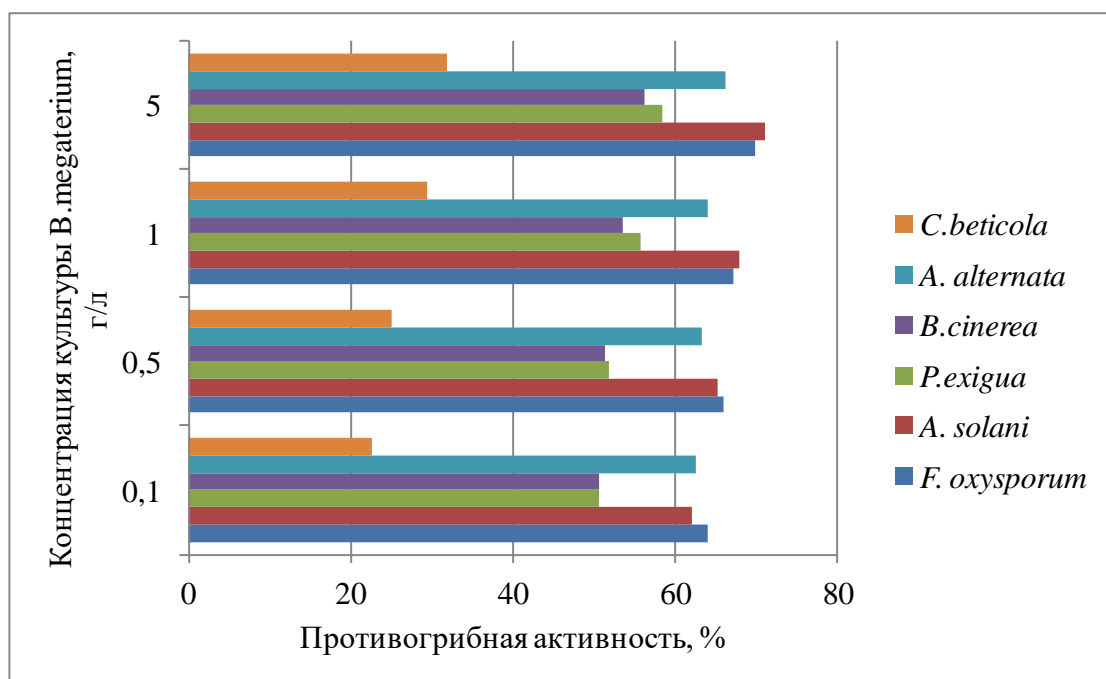


Рисунок 6 – Противогрибная активность штамма *V. megaterium* в отношении исследуемых фитопатогенных грибов на 3 сутки инкубации

Исходя из полученных данных, представленных на диаграмме видно, что штамм *V. megaterium* на 3 сутки инкубации проявляет высокую активность (более 80%) по отношению к следующим фитопатогенным грибам: *A. solani*, *A. alternata*, *F. oxysporum*. По отношению к фитопатогенам *B. cinerea* и *P. exigua* активность бактериального штамма составляет более 50%. Наименьшую активность (менее 50%) штамм проявляет по отношению к фитопатогену *C. beticola*.

На рисунке 7 представлено влияние бактериального штамма *V. megaterium* на рост исследуемых фитопатогенных грибов, зафиксированный на 7 сутки инкубации.

Данные полученные в ходе эксперимента указывают на высокую эффективность данного штамма в отношении следующих фитопатогенных грибов: *B. cinerea*, *P. exigua* и *C. beticola* – активность в отношении данных штаммов составила более 80%. По отношению к остальным фитопатогенам, активность бактериального штамма *V. megaterium* превышает 50%.

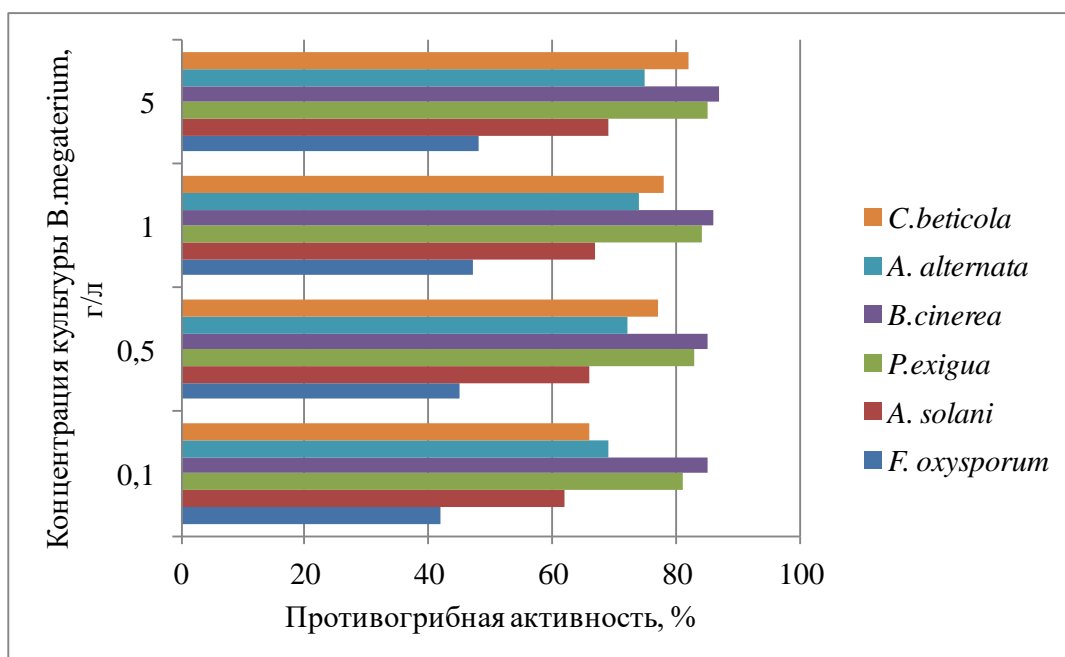


Рисунок 7 – Противогрибная активность штамма *B. megaterium* в отношении исследуемых фитопатогенных грибов на 7 сутки инкубации

Далее было проведено исследования влияние бактериального штамма *B. megaterium* на рост фитопатогенных грибов на 14 сутки инкубации, которые являются завершающими и наиболее показательными. Результаты были обработаны и сведены в диаграмму, представленную на рисунке 8.

Полученные данные свидетельствуют об эффективности данного штамма в отношении всех исследуемых фитопатогенных грибов. Наибольшая активность (более 80%) бактериального штамма проявляется в отношении фитопатогенов *B. cinerea*, *P. exigua* и *A. alternata*. В отношении остальных фитопатогенных грибов активность штамма составляет более 60%.

На рисунке 9 представлены данные, демонстрирующие влияние различных концентраций суспензии штамма *Bacillus megaterium* на рост исследуемых фитопатогенных грибов, зафиксированные на 3, 7 и 14 сутки инкубации.

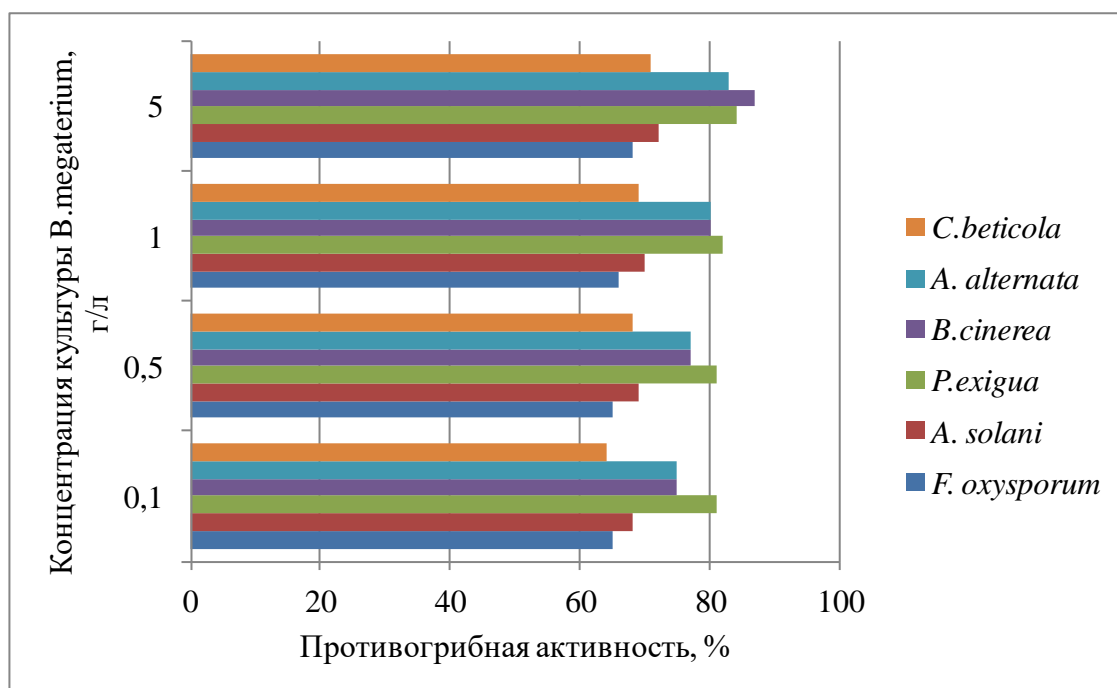
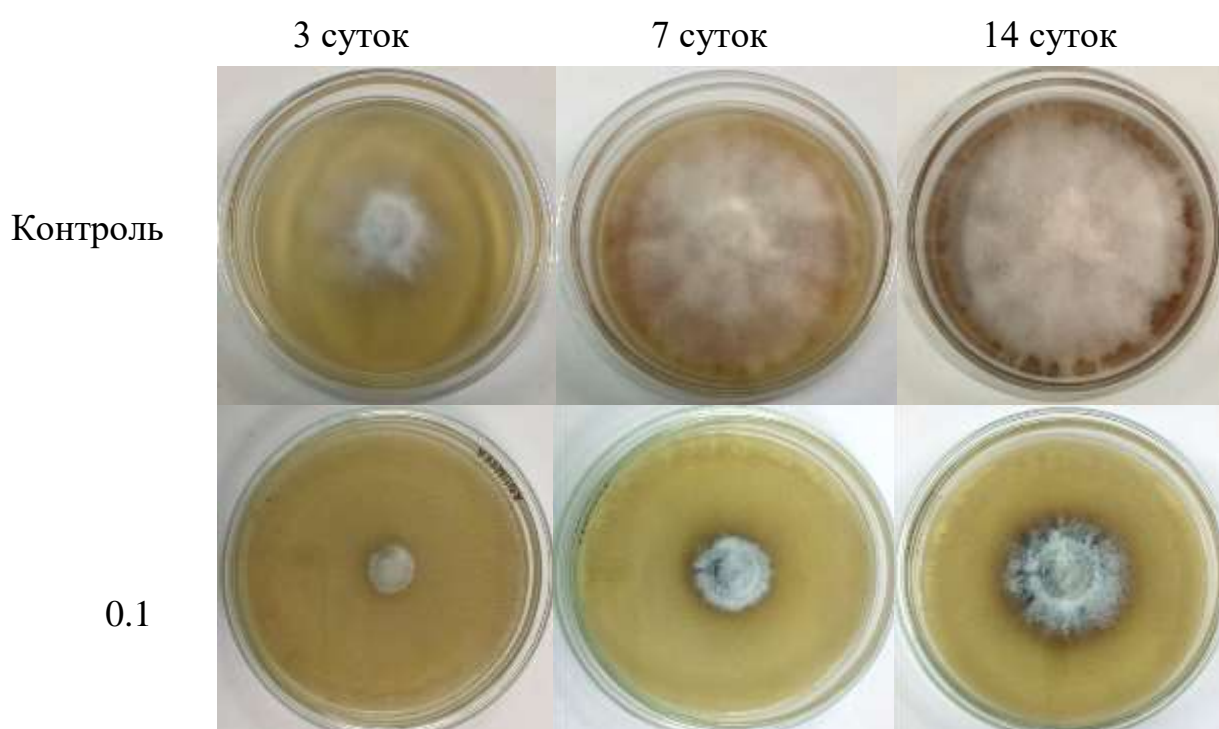
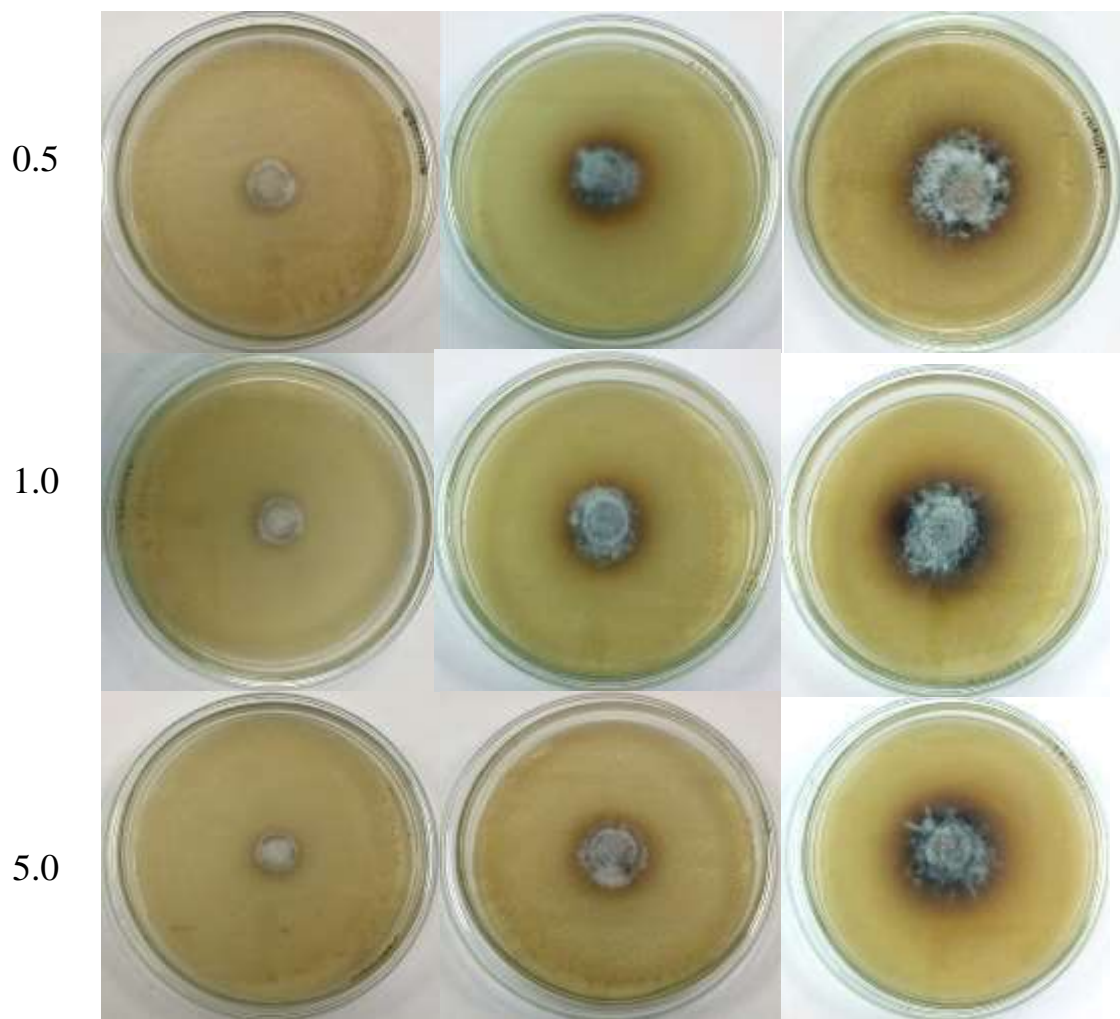


Рисунок 8 – Противогрибная активность штамма *B. megaterium* в отношении исследуемых фитопатогенных грибов на 14 сутки инкубации

а) *Fusarium oxysporum*





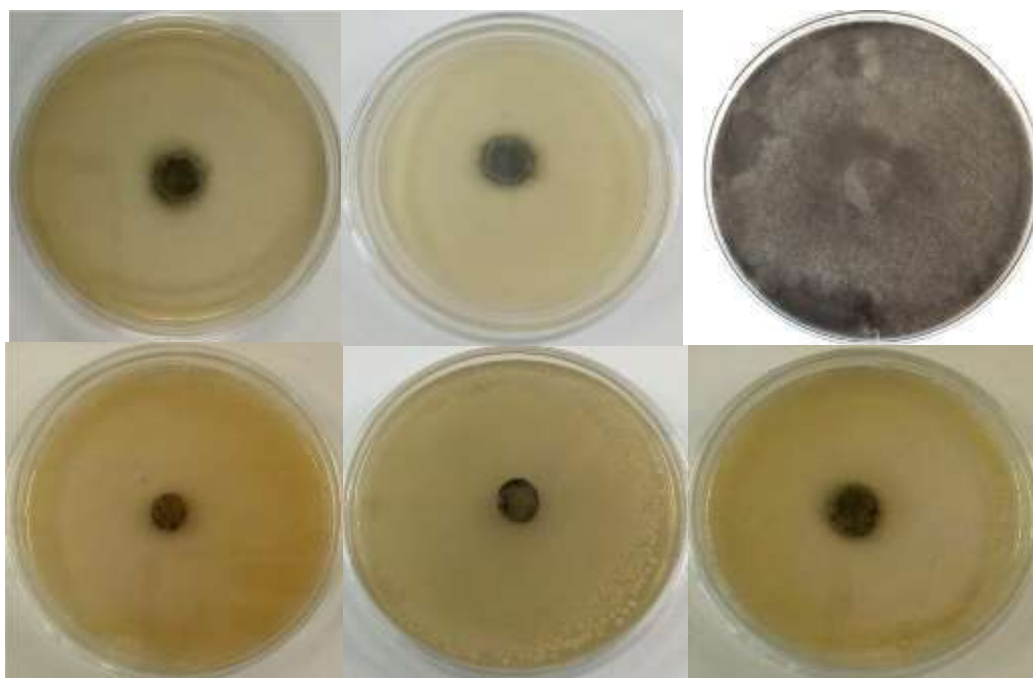
б) *Botrytis cinerea*

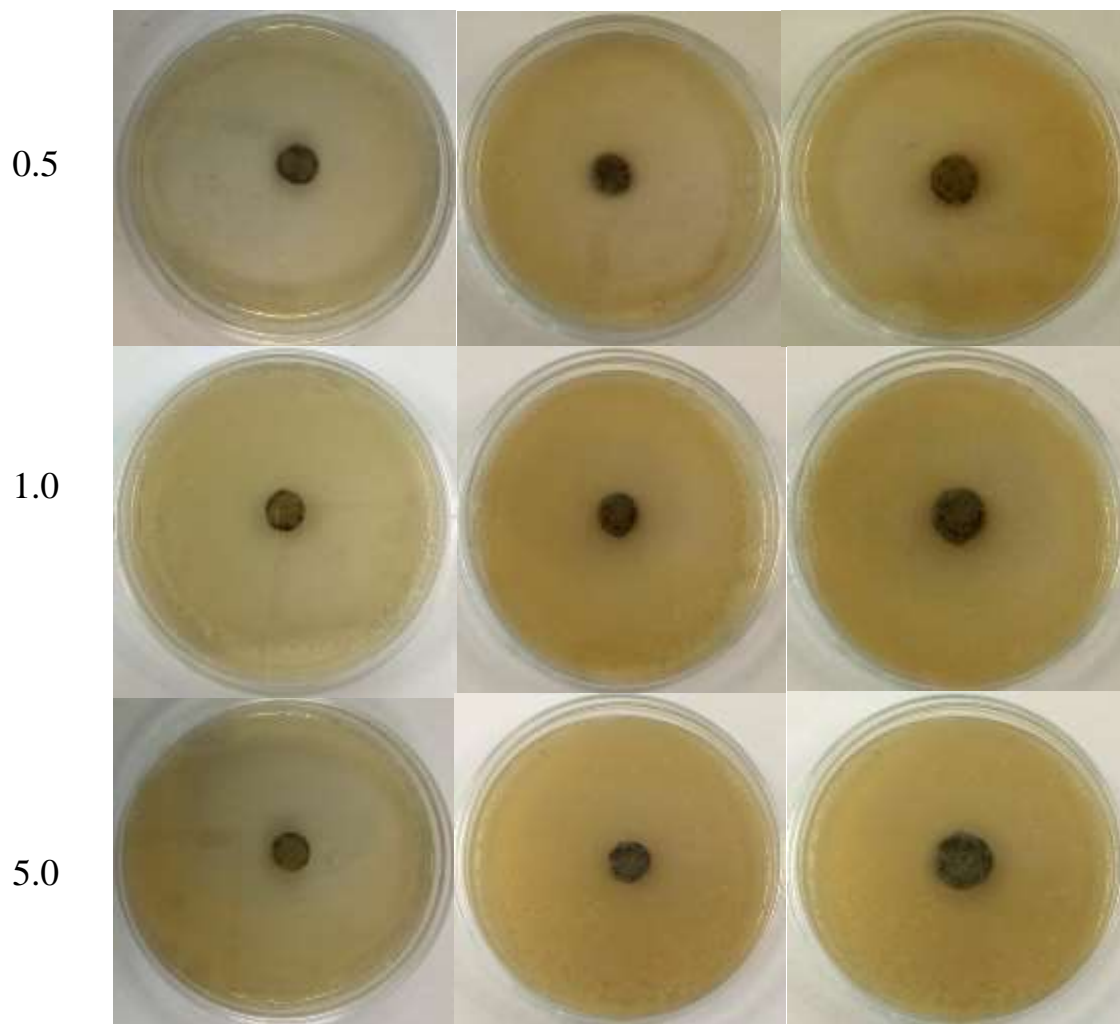
3 сутки

7 сутки

14 сутки

Контроль





в) *Phoma exigua*

3 сутки

7 сутки

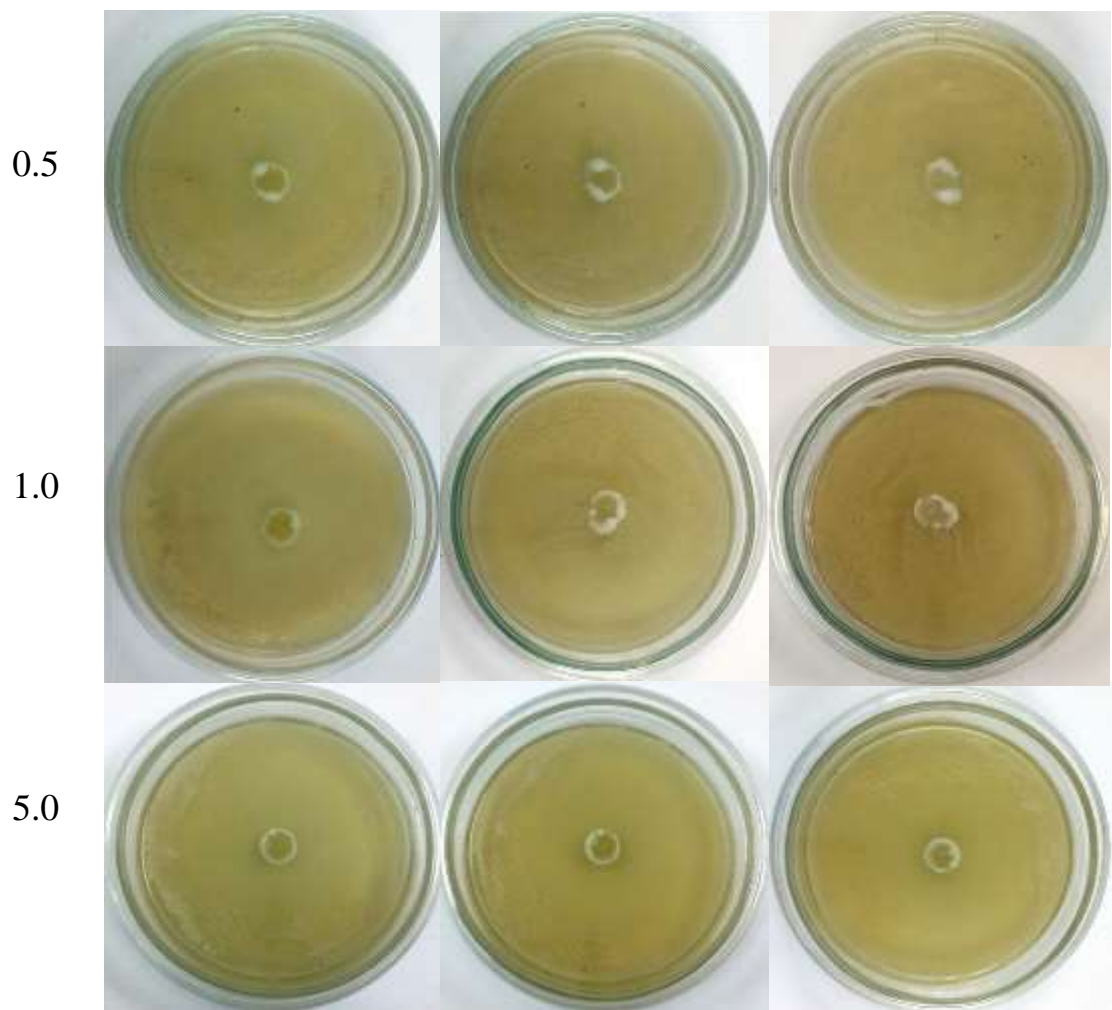
14 сутки

Контроль

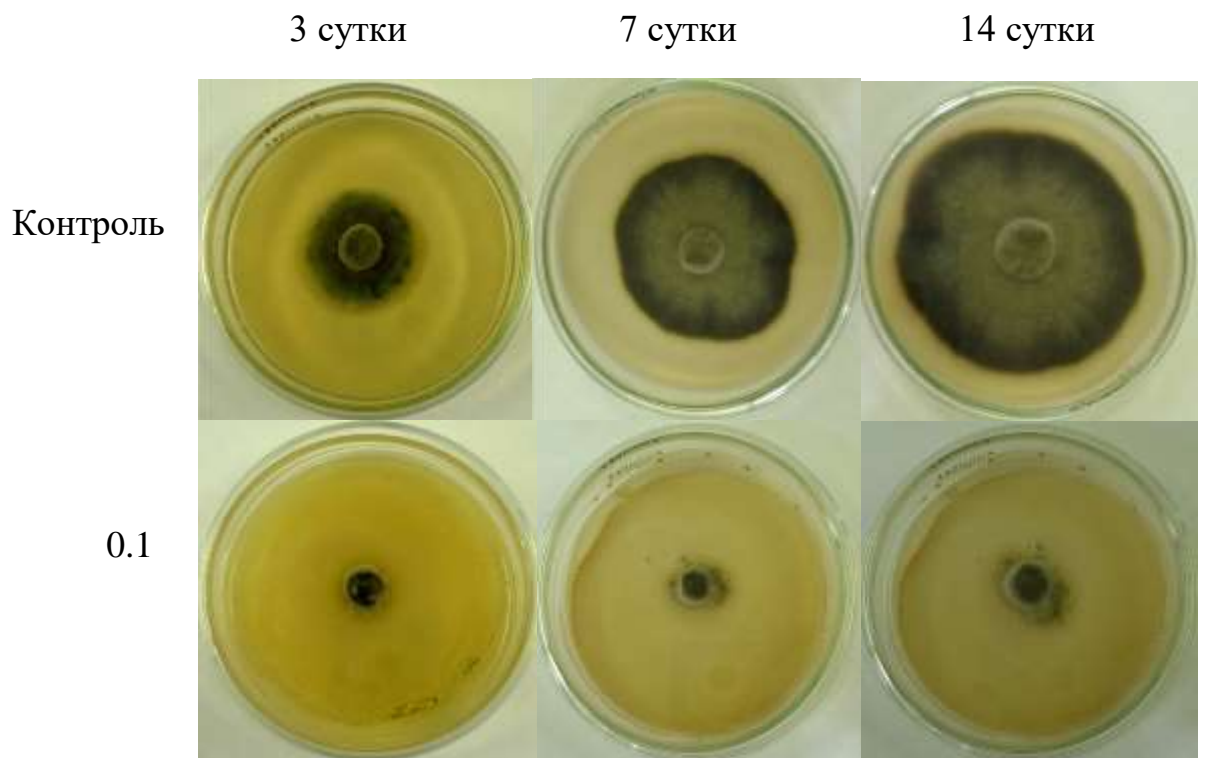


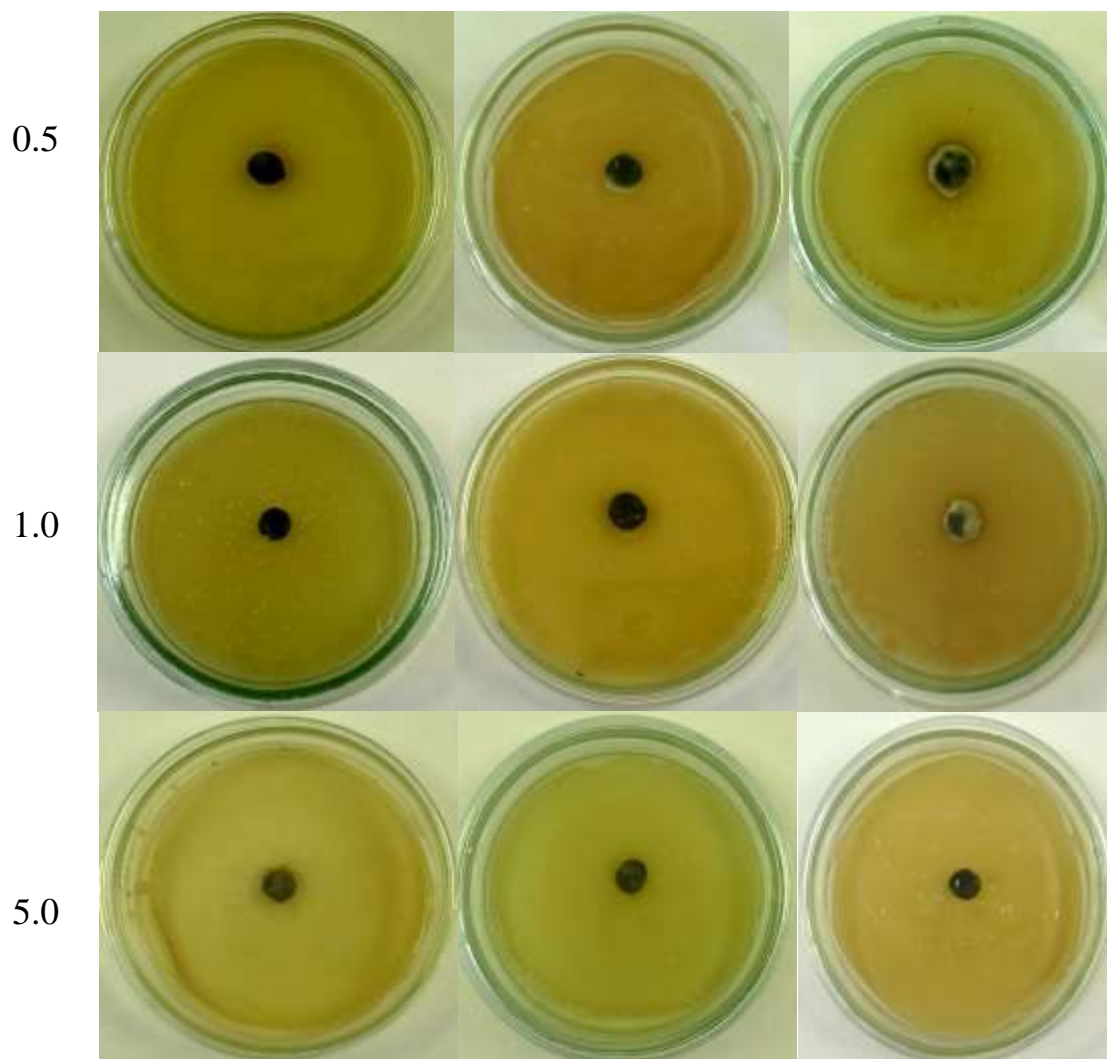
0.1





г) *Cercospora beticola*





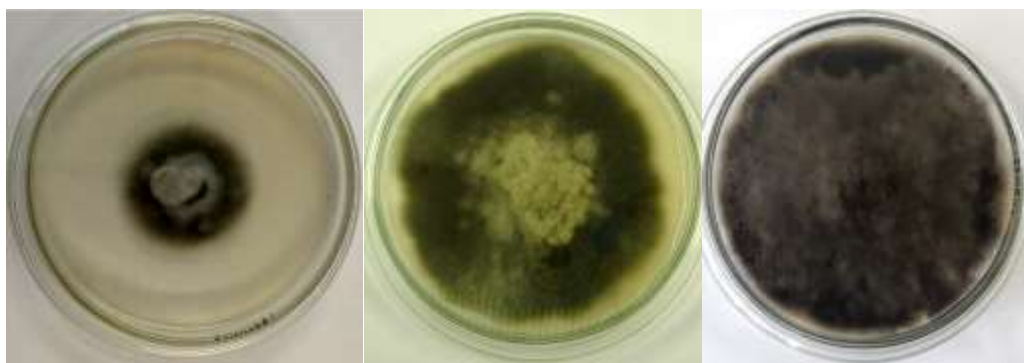
д) *Alternaria alternata*

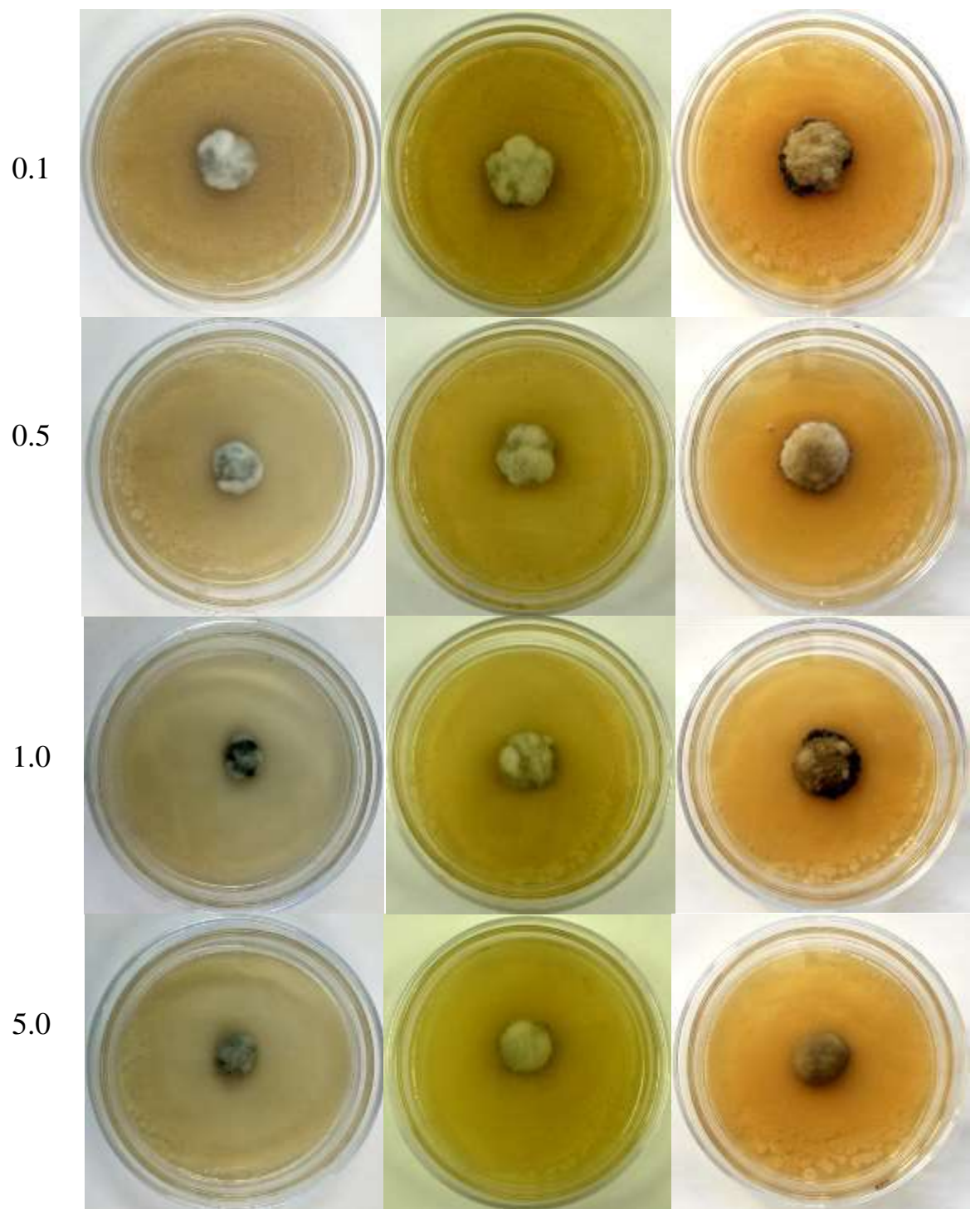
3 сутки

7 сутки

14 сутки

Контроль





e) *Alternaria solani*

3 сутки

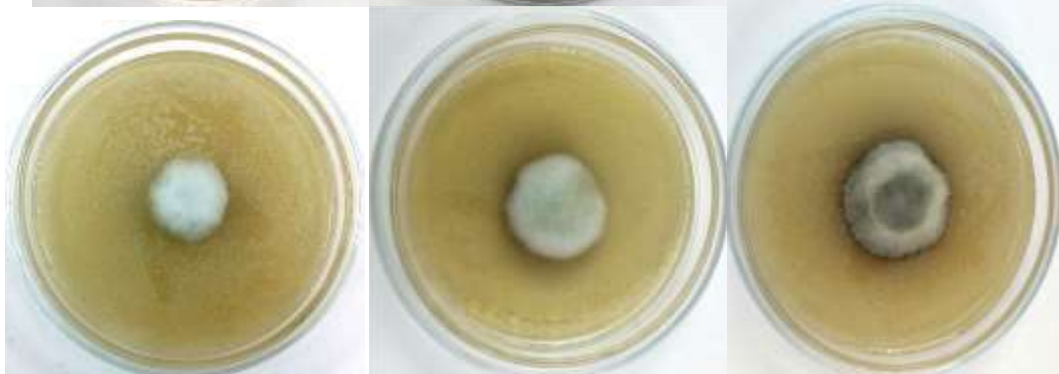
7 сутки

14 сутки

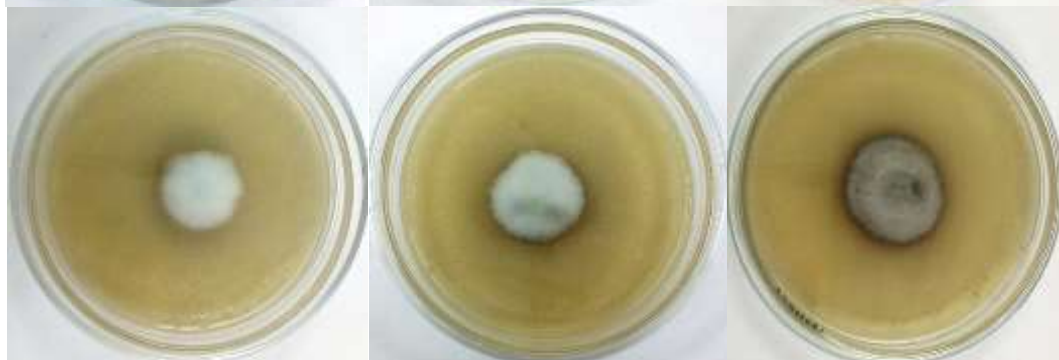
Контроль



0.1



0.5



1.0



5.0

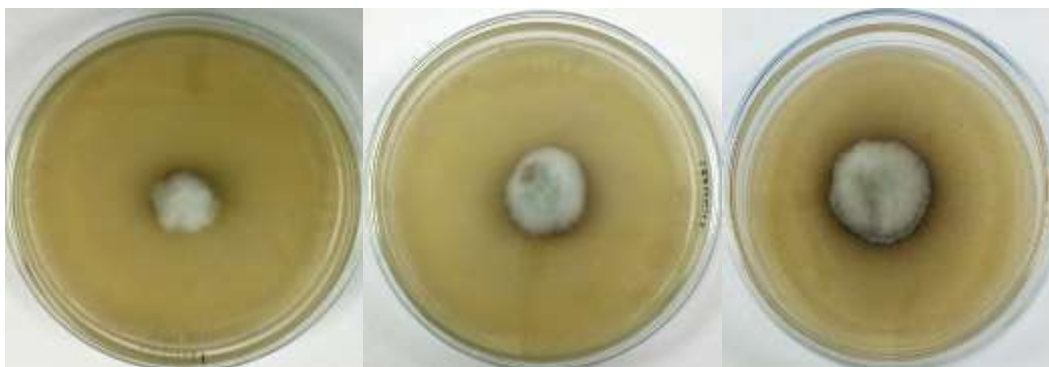


Рисунок 9 – Влияние различных концентраций суспензии штамма *B.megaterium* на рост фитопатогенных грибов

Полученные данные подтверждают высокую противогрибную активность штамма *Bacillus megaterium* в отношении исследуемых фитопатогенных грибов, что позволяет рекомендовать его использование в качестве компонента бактериального препарата.

3.3. Результаты исследования противогрибной активности штамма *Methylobacterium extorquens*.

Известно, что штамм *M. extorquens* способен ингибировать рост фитопатогенных грибов путем синтеза сидерофоров с низкой молекулярной массой [Doronina, 2014; Fedorov, 2012]. Исходя из этого, были проведены серии экспериментов по изучению влияния противогрибной активности данного штамма по отношению к следующим фитопатогенным микроорганизмам: *F. oxysporum*, *A. solani*, *A. alternata*, *C. beticola*, *B.cinerea*, *P. exigua*. Методика проведения эксперимента описана в п. 2.5.1. Результаты были статистически обработаны и приведены на рисунке 10.

Исходя из данных полученных в ходе эксперимента на 3 сутки инкубации штамм *M. extorquens* проявляет высокую активность (более 60%) по отношению к следующим фитопатогенным грибам: *P.exigua*, *F.oxysporum*, *B.cinerea*. По отношению к фитопатогенам *C. beticola*, *A. solani* и *A. alternata* противогрибная активность бактериального штамма снижена и составляет менее 50%.

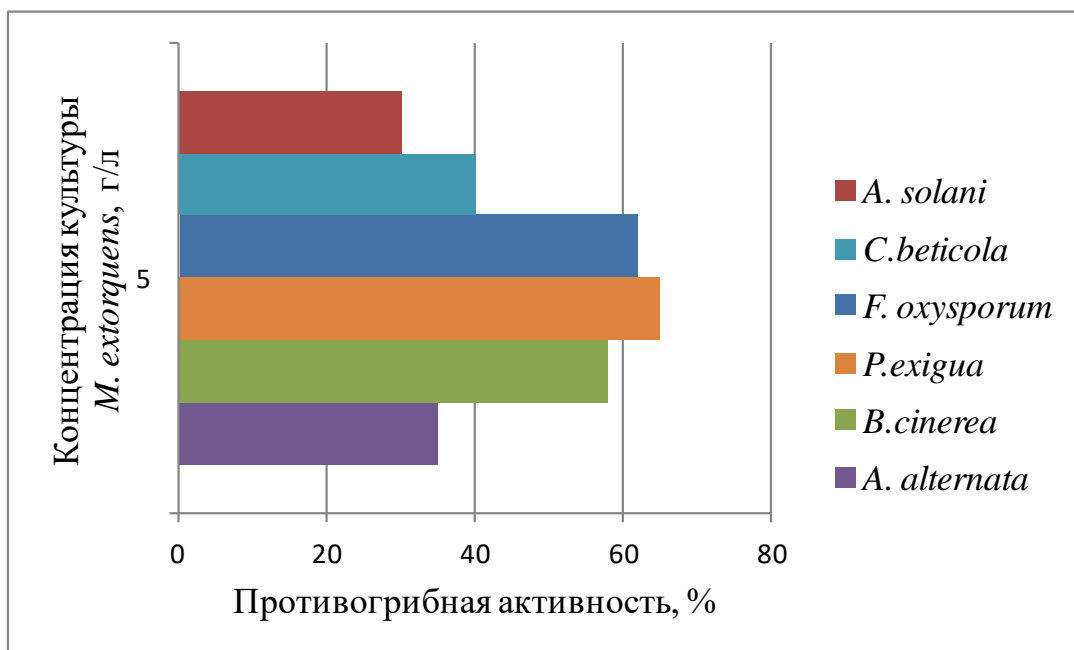


Рисунок 10 – Противогрибная активность штамма *M. extorquens* в отношении исследуемых фитопатогенных грибов на 3 сутки инкубации

На рисунке 11 представлено влияние бактериального штамма *M. extorquens* на рост исследуемых фитопатогенных грибов, зафиксированный на 7 сутки инкубации.

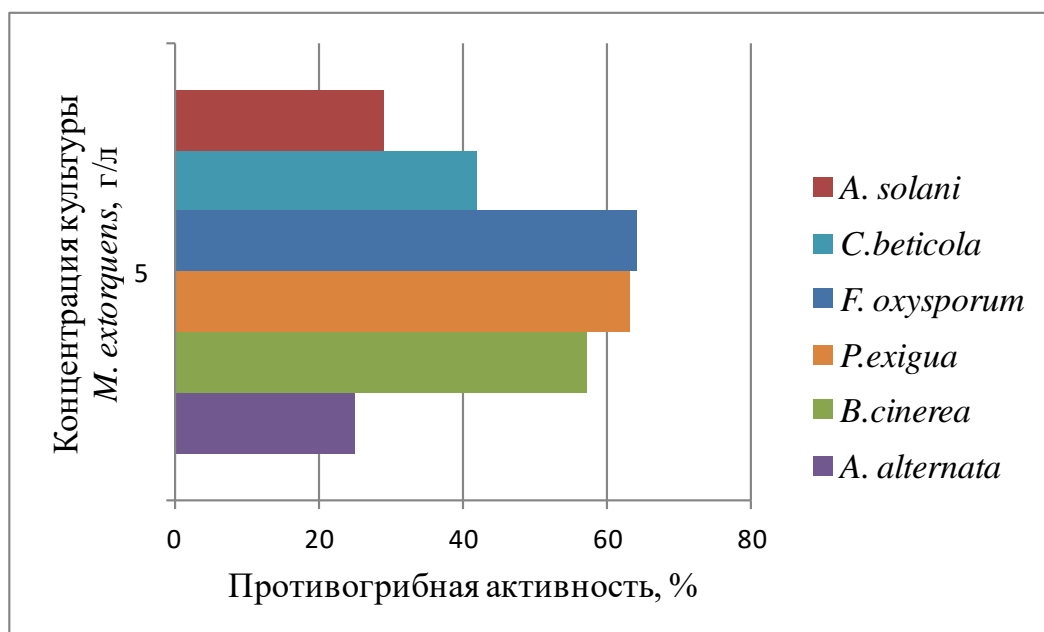


Рисунок 11 – Противогрибная активность штамма *M. extorquens* в отношении исследуемых фитопатогенных грибов на 7 сутки инкубации

Результаты исследования, зафиксированные на 7 сутки инкубации свидетельствуют о высокой противогрибной активности в отношении следующих штаммов фитопатогенных культур: *F.oxysporum*, *P.exigua* и *B.cinerea*. Однако в отношении фитопатогенных грибов *C. beticola*, *A. solani* и *A. alternate* остается на низком уровне и составляет менее 50%.

Далее было проведено исследования влияние бактериального штамма *M. extorquens* на рост фитопатогенных грибов на 14 сутки инкубации, которые являются завершающими и наиболее показательными. Результаты были обработаны и сведены в диаграмму, представленную на рисунке 12.

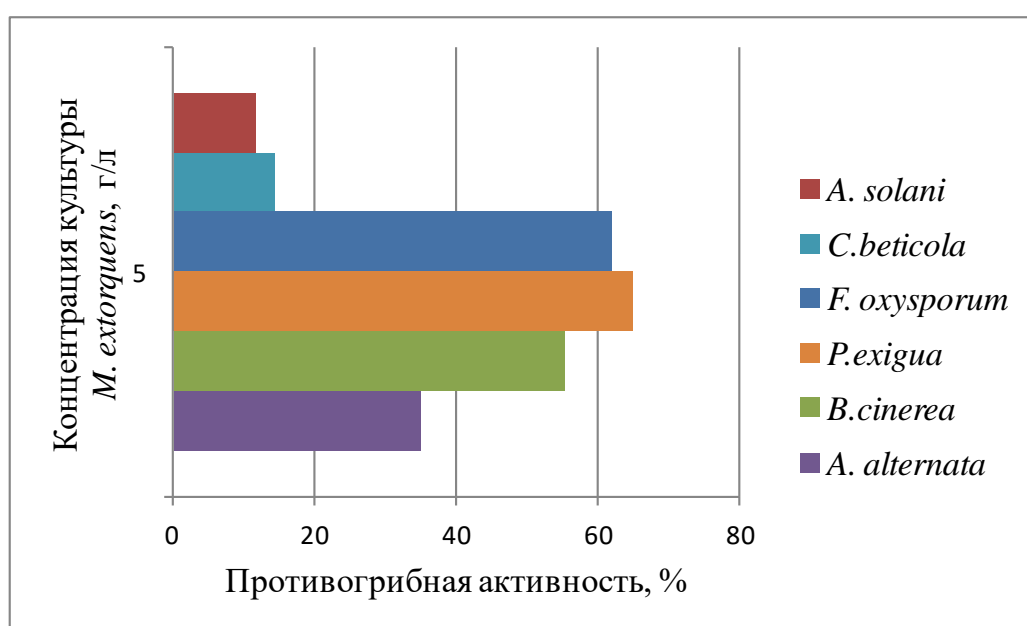


Рисунок 12 – Противогрибная активность штамма *M. extorquens* в отношении исследуемых фитопатогенных грибов на 14 сутки инкубации

Полученные данные свидетельствуют об эффективности данного штамма в отношении следующих штаммов фитопатогенных культур: *F.oxysporum*, *P.exigua* и *B.cinerea*. Однако в отношении фитопатогенных грибов *C. beticola*, *A. solani* и *A. alternate* остается на низком уровне и составляет менее 50%.

На рисунке 13 представлены данные, демонстрирующие влияние суспензии штамма *M. extorquens* на рост исследуемых фитопатогенных грибов, зафиксированные на 3, 7 и 14 сутки инкубации.

a) *Fusarium oxysporum*

Контроль

3 суток

7 суток

14 суток



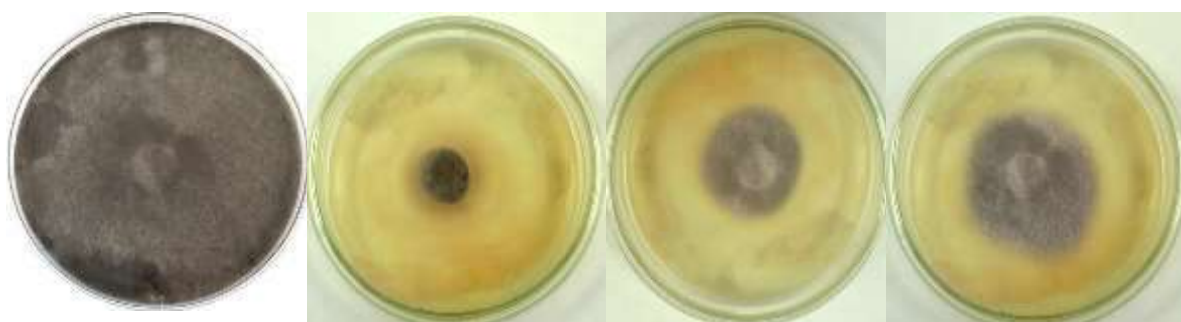
б) *Botrytis cinerea*

Контроль

3 суток

7 суток

14 суток



в) *Phoma exigua*

Контроль

3 суток

7 суток

14 суток



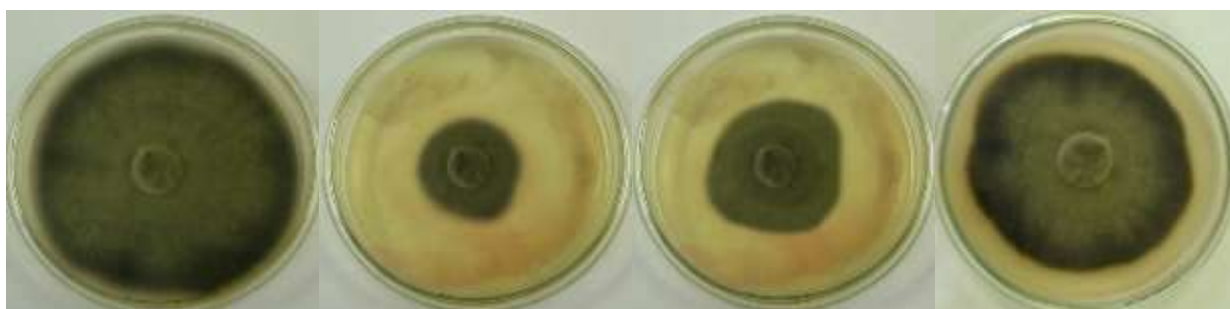
г) *Cercospora beticola*

Контроль

3 суток

7 суток

14 суток



д) *Alternaria alternata*

Контроль

3 суток

7 суток

14 суток



е) *Alternaria solani*

Контроль

3 суток

7 суток

14 суток



Рисунок 13 – Противогрибная активность штамма *M. extorquens* в отношении исследуемых фитопатогенов, представленная в динамике

По результатам исследования противогрибной активности в отношении исследуемых фитопатогенных грибов было установлено, что штамм *Methylobacterium extorquens* проявляет высокую активность по отношению к трем из шести фитопатогенным микроорганизмам – *F.oxysporum*, *P.exigua* и *B.cinerea*. Однако бактериальный штамм не оказал существенного влияния на ингибирование роста фитопатогенных грибов *C. beticola*, *A. solani* и *A.alternata*. Таким образом, учитывая ростостимулирующие свойства штамма *Methylobacterium extorquens* и данные полученные в ходе исследования, рекомендуется его применение в качестве компонента бактериального препарата.

3.4. Результаты исследования противогрибной активности бактериального препарата.

3.4.1. Метод радиального роста.

Эксперимент по изучению влияния противогрибной активности бактериального препарата по отношению к следующим фитопатогенным микроорганизмам: *F. solani*, *F. oxysporum*, *A. solani*, *A. alternata*, *C. beticola*, *B.cinerea* был проведен согласно методике, описанной в п. 2.5.1. Результаты эксперимента, зафиксированные на 3 сутки инкубации, представлены на рисунке 14.

Результаты, полученные в ходе серии экспериментов, свидетельствуют об ингибировании радиального роста все исследуемых фитопатогенных грибов. Наиболее чувствительной культурой является штамм универсального и широко распространенного фитопатогена *B.cinerea*. При концентрации 5 г/л отмечено максимальное угнетение роста фитопатогенных микроорганизмов. Однако биопрепарат демонстрирует высокую активность и при более низких концентрациях.

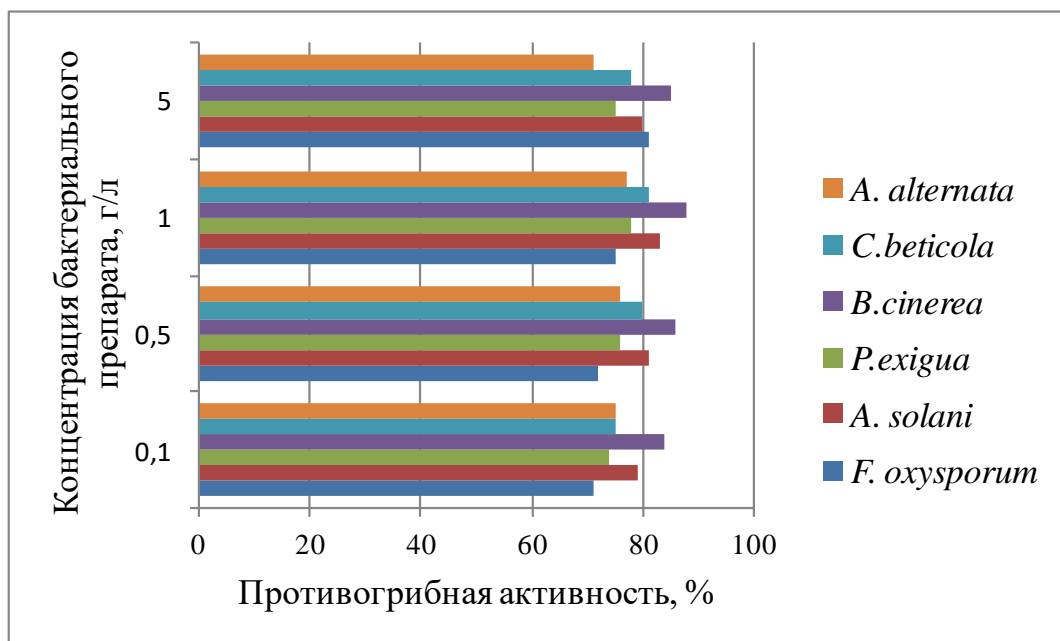


Рисунок 14 – Противогрибная активность бактериального препарата в отношении исследуемых фитопатогенных грибов на 3 сутки инкубации

На рисунке 15 представлено влияние бактериального препарата на рост исследуемых фитопатогенных грибов, зафиксированный на 7 сутки инкубации.

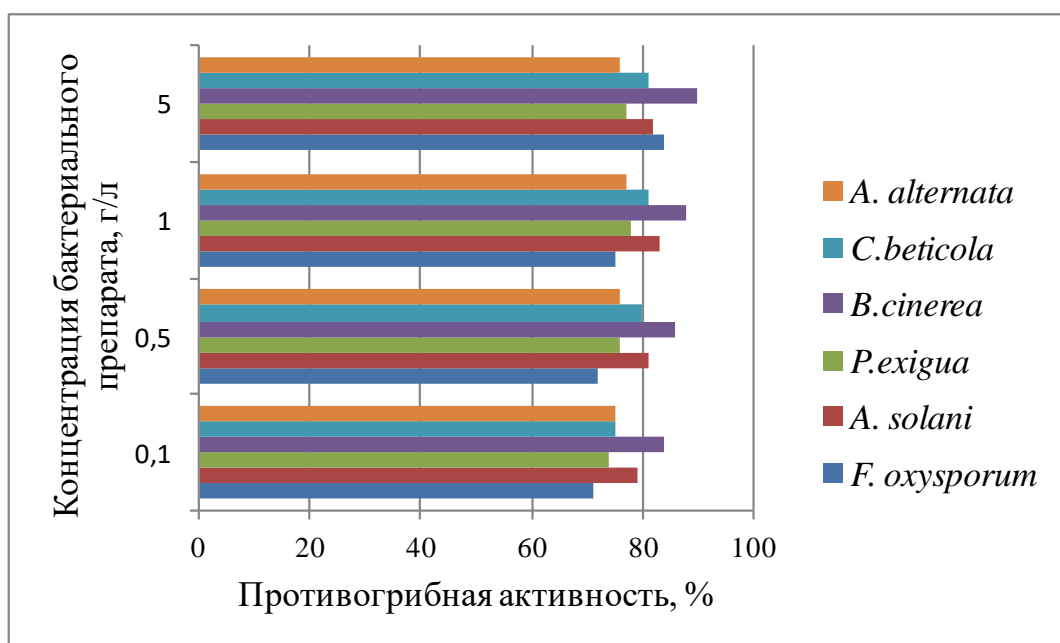


Рисунок 15 – Противогрибная активность бактериального препарата в отношении исследуемых фитопатогенных грибов на 7 сутки инкубации

Согласно данным, представленным на диаграмме, бактериальный препарат проявляет высокую противогрибную активность в отношении всех исследуемых фитопатогенных грибов. Наиболее чувствительными культурами на данном этапе исследования проявили себя *B.cinerea*, *F. oxysporum*, *A.solani* и *C. beticola*. Противогрибная активность для данных штаммов составляет более 80%.

Далее было проведено исследования влияние бактериального препарата на рост фитопатогенных грибов на 14 сутки инкубации, которые являются завершающими и наиболее показательными. Результаты были обработаны и сведены в диаграмму, представленную на рисунке 16.

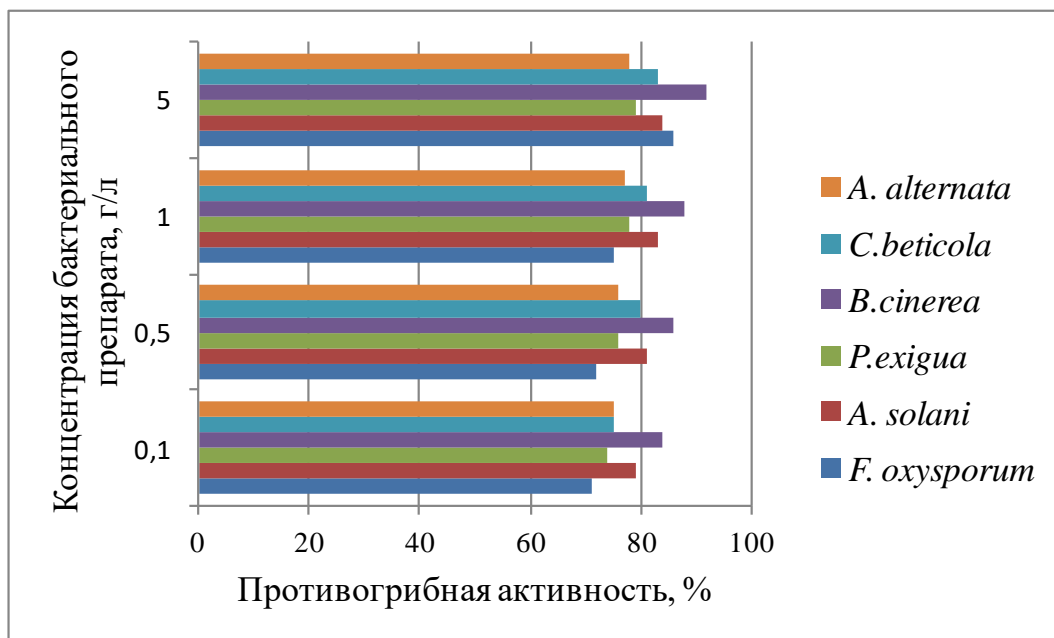
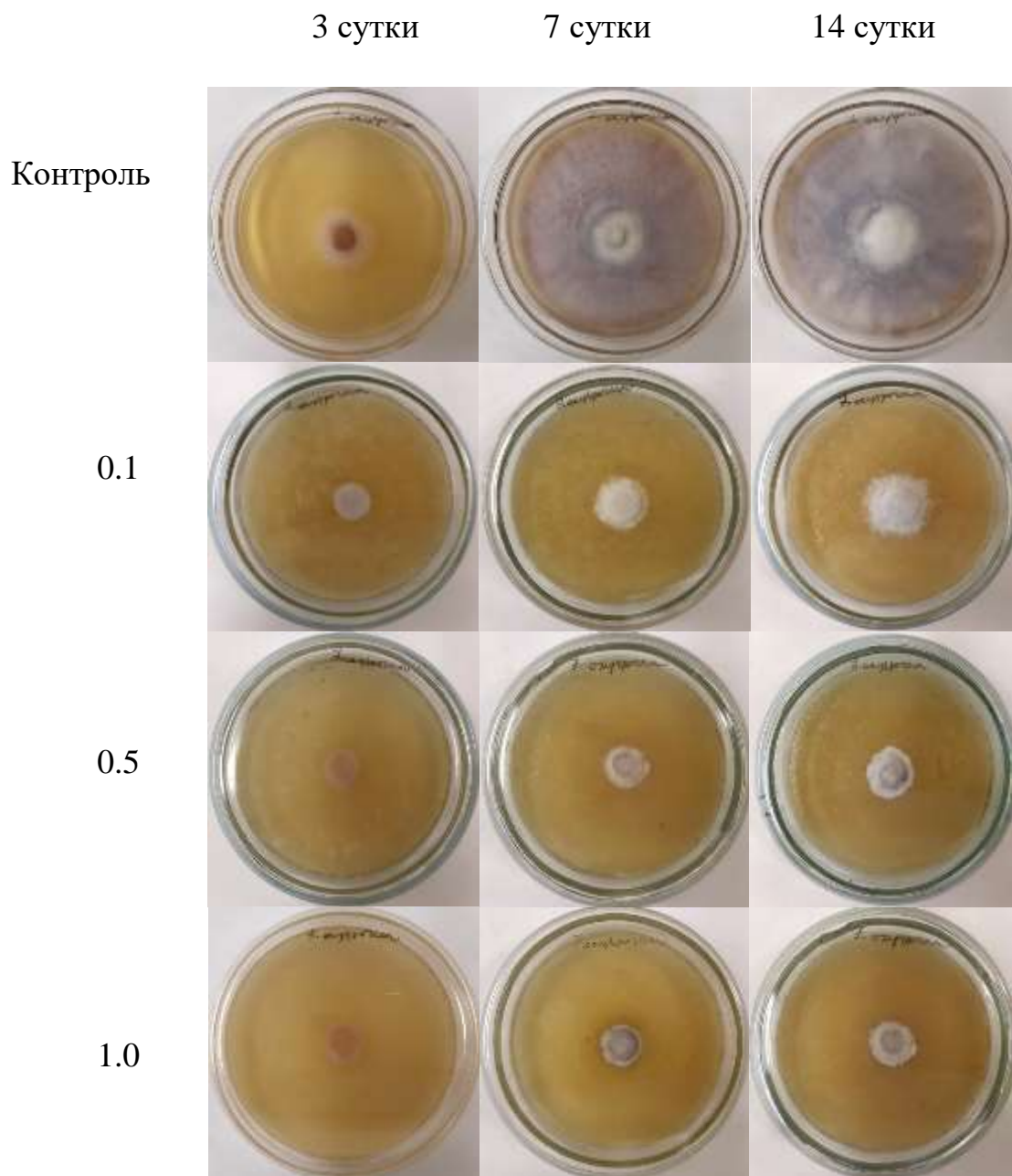


Рисунок 16 – Противогрибная активность бактериального препарата в отношении исследуемых фитопатогенных грибов на 14 сутки инкубации

Согласно полученным данным, биопрепарат проявляет высокую противогрибную активность в отношении всех исследуемых фитопатогенных грибов, стоит отметить, что максимальное угнетение роста (более 80 %) отмечено у следующих штаммов: *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *A. solani* при различных концентрациях бактериального препарата.

На рисунке 17 представлены данные, демонстрирующие влияние различных концентраций суспензии бактериального препарата на рост исследуемых фитопатогенных грибов, зафиксированные на 3, 7 и 14 сутки инкубации.

a) *Fusarium oxysporum*



5.0



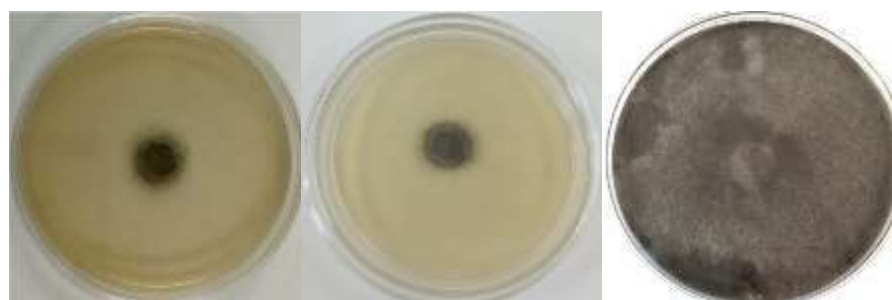
б) *Botrytis cinerea*

3 сутки

7 сутки

14 сутки

Контроль



0.1



0.5



1.0



5.0



в) *Phoma exigua*

3 сутки

7 сутки

14 сутки

Контроль



0.1



0.5



1.0



5.0



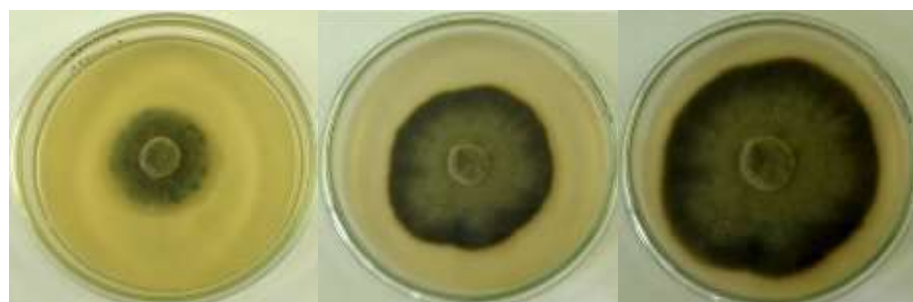
г) *Cercospora beticola*

3 сутки

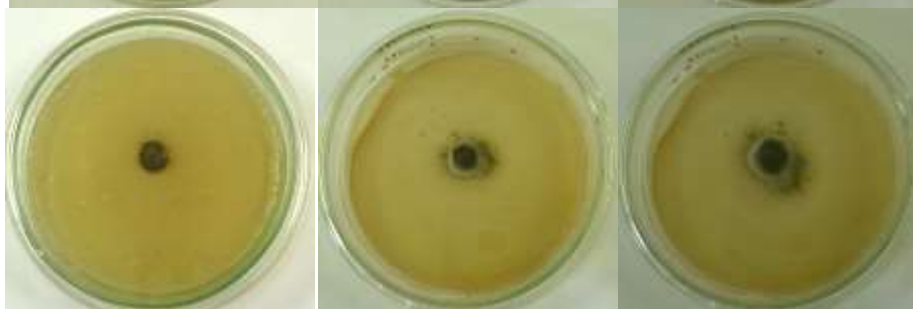
7 сутки

14 сутки

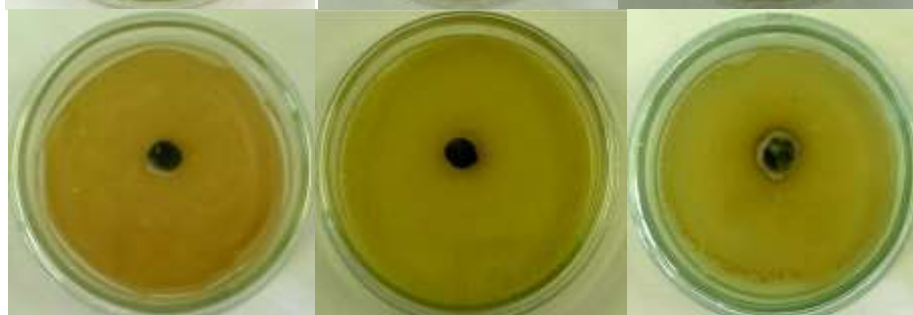
Контроль



0.1



0.5



1.0



5.0



д) *Alternaria alternata*

3 сутки

7 сутки

14 сутки

Контроль



0.1



0.5



1.0



5.0



e) *Alternaria solani*

3 сутки

7 сутки

14 сутки

Контроль



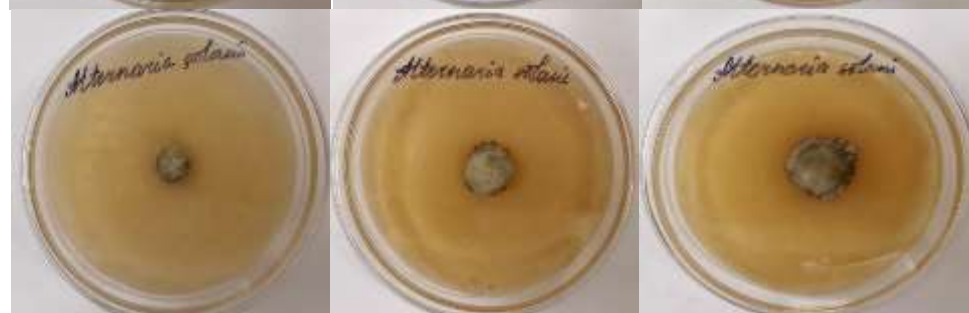
0.1



0.5



1.0



5.0



Рисунок 17 – Влияние различных концентраций бактериального препарата на рост фитопатогенных грибов

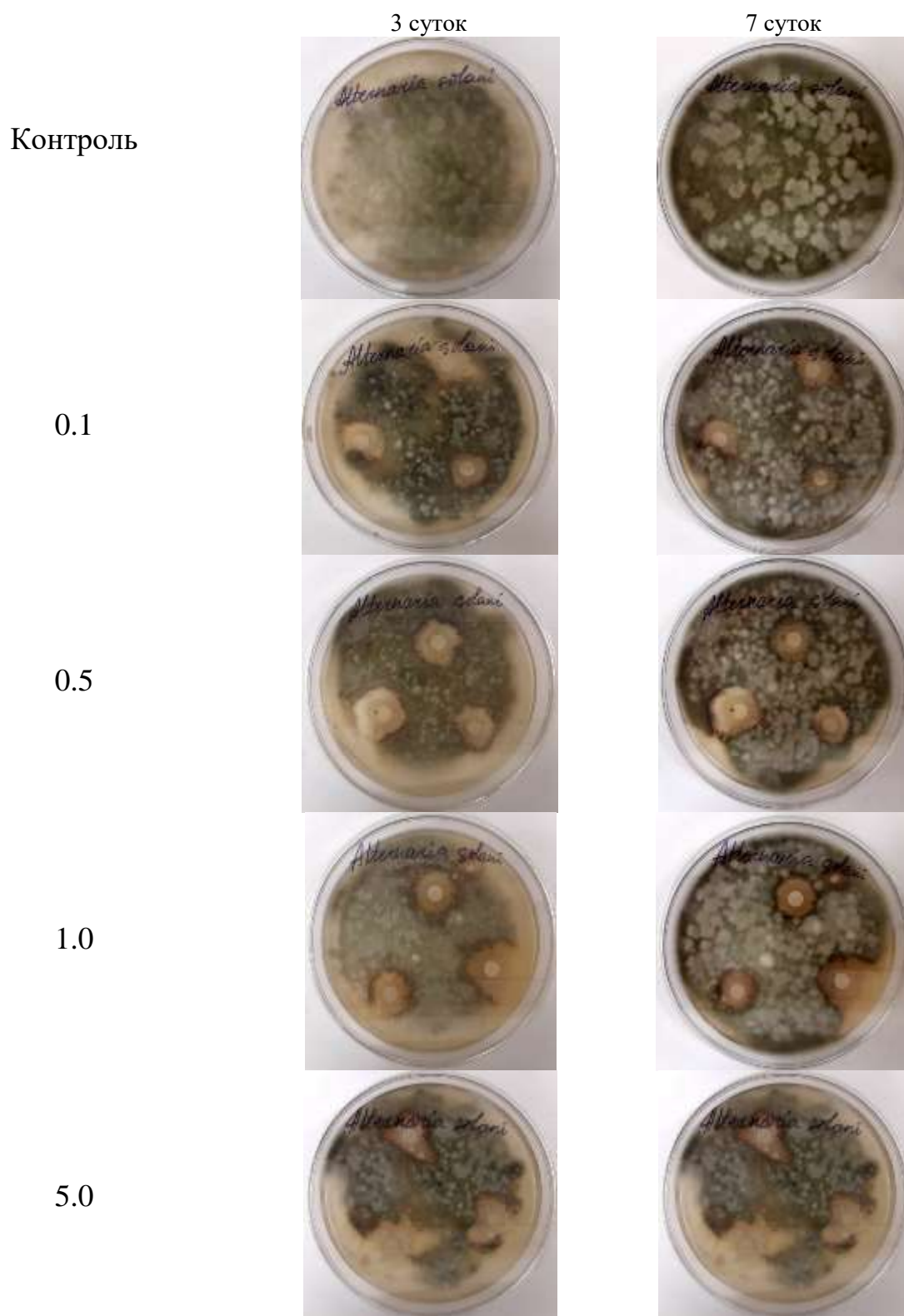
Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности бактериального препарата по отношению ко всем заявленным фитопатогенным микроорганизмам. Таким образом, целесообразно использование комбинаций бактериальных культур, для создания биопрепаратов, так как выявлено, что действие отдельных компонентов, усиливается при их совместном применении.

3.4.2. Модифицированный метод бумажных дисков.

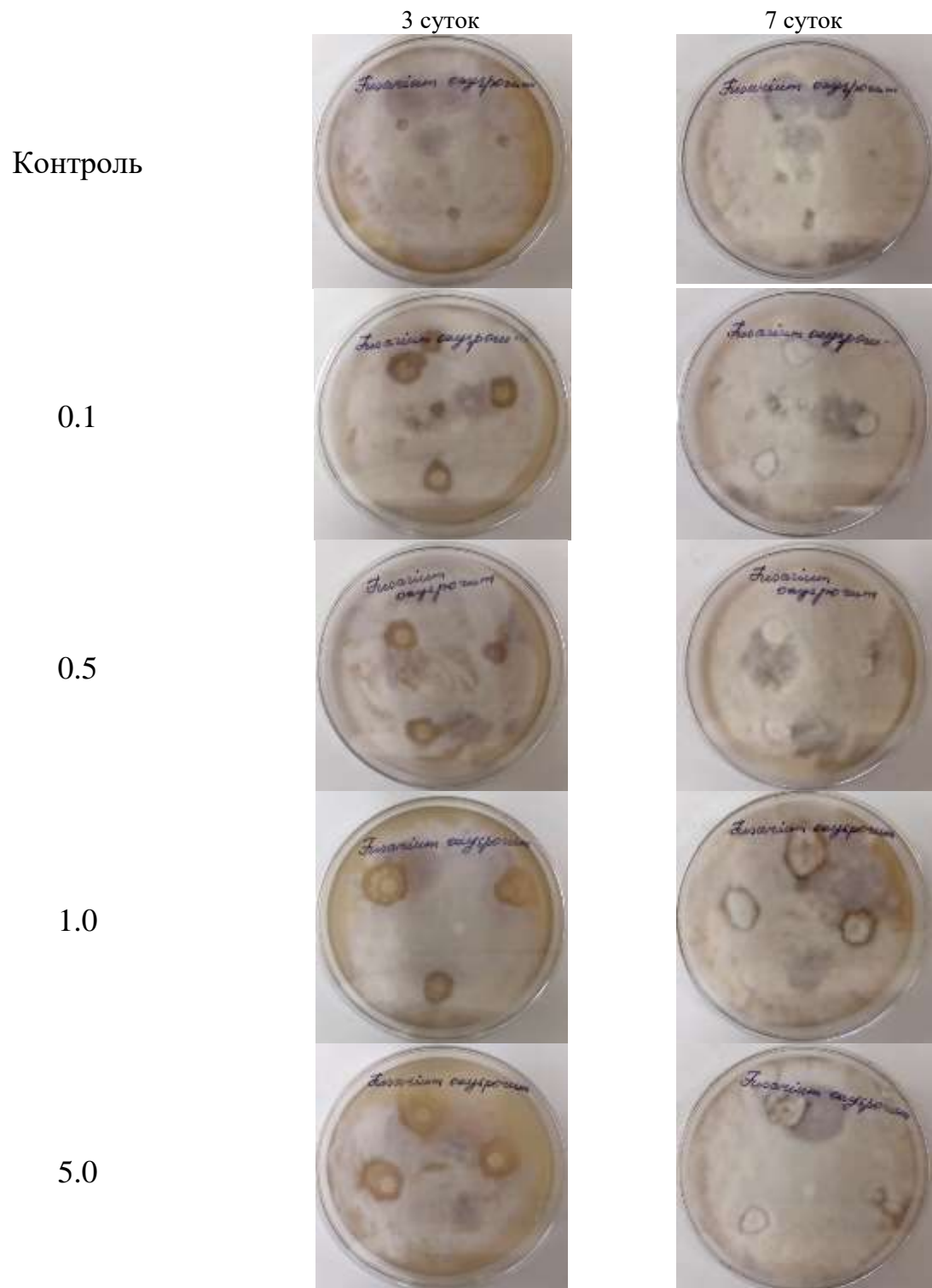
Эксперимент по изучению влияния противогрибной активности бактериального препарата по отношению к следующим фитопатогенным микроорганизмам: *F. solani*, *F. oxysporum*, *A. solani*, *A. alternata*, *C. beticola*, *B. cinerea* был проведен согласно методике, описанной в п. 2.5.2. Результаты эксперимента представлены на рисунке 18 и приведены в таблице 3.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о высокой активности бактериального препарата в отношении заявленных фитопатогенных микроорганизмов. При концентрации бактериального препарата 5 г/л отмечена максимальная зона ингибирования роста фитопатогенов.

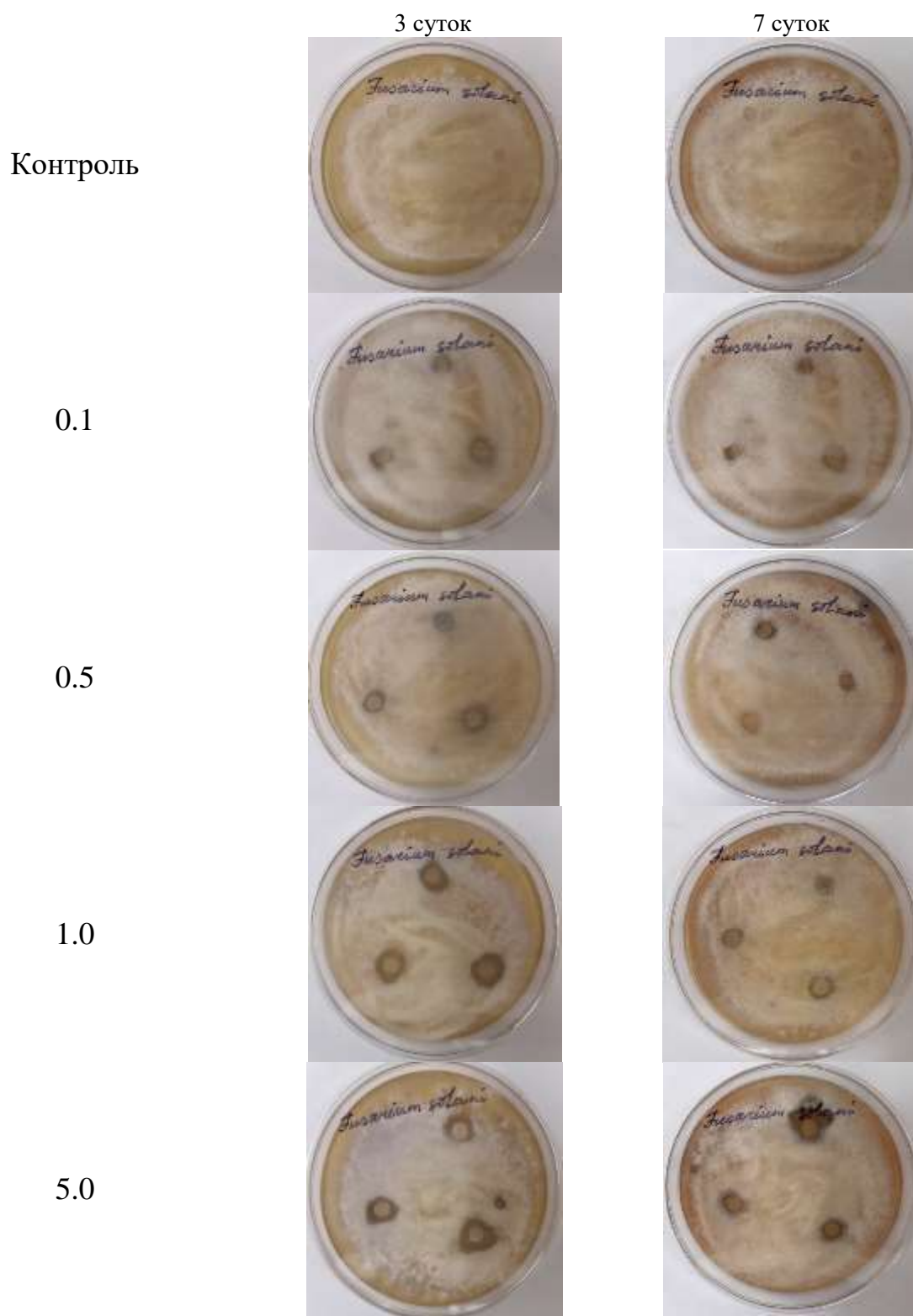
a) *Alternaria solani*



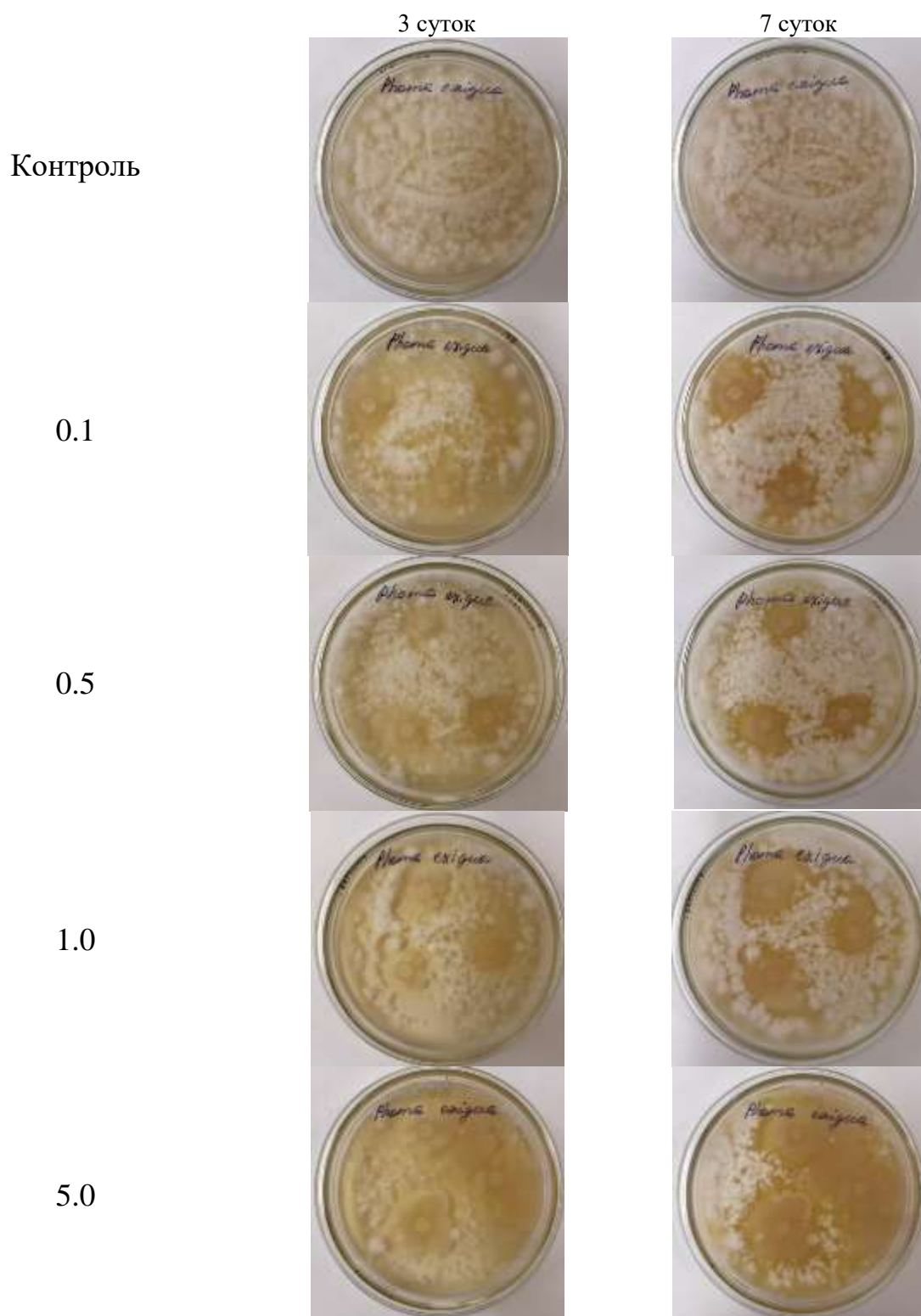
б) *Fusarium oxysporum*



в) *Fusarium solani*



г) *Phoma exigua*



д) *Rhizoctonia solani*

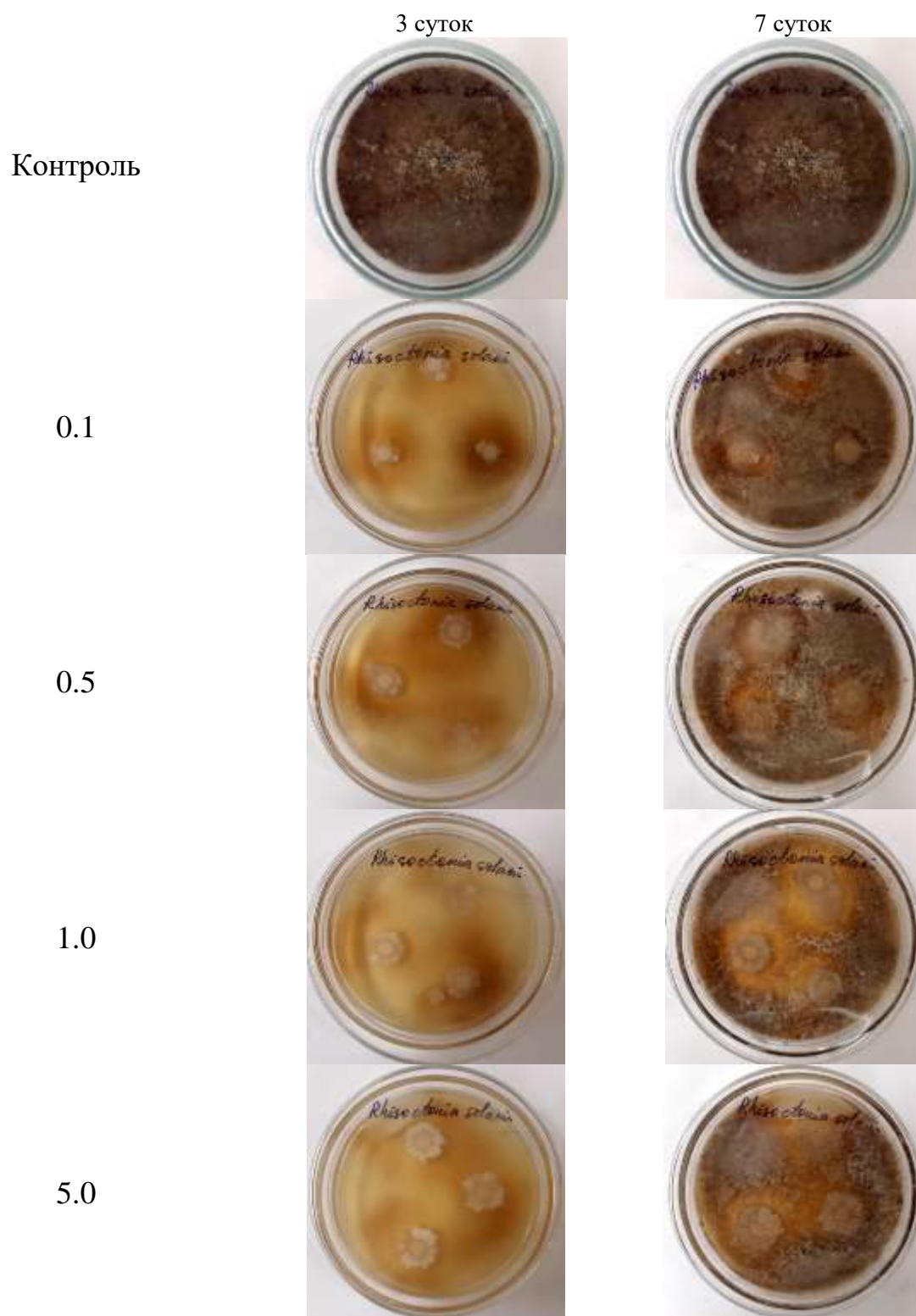


Рисунок 18 – Влияние различных концентраций исследуемого биопрепарата на линейный рост фитопатогенных грибов.

Таблица 2. Результаты промеров зоны ингибирования (мм) фитопатогенных грибов испытуемым биопрепаратом

Концентрация препарата, г/л	<i>R. solani</i>	<i>A. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. exigua</i>	<i>F. solani</i>
3 суток					
0.1	10-11	17-18	11-12	13-15	23-25
0.5	10-13	18-20	12-13	12-13	24-27
1.0	12-14	20-22	12-14	15-17	28-33
5.0	15-16	25-27	13-16	17-25	32-35
7 суток					
0.1	8-10	13-15	11-14	19-23	30-35
0.5	9-13	14-15	12-15	23-25	28-36
1.0	8-14	17-18	12-16	23-25	35-38
5.0	13-16	16-22	13-17	26-33	35-45
14 суток					
0.1	9-11	15-17	12-14	20-21	28-30
0.5	10-14	16-18	13-15	22-23	30-35
1.0	12-15	19-21	13-17	21-24	33-36
5.0	16-17	20-25	17-19	26-32	37-45

3.5 Результаты исследования противогрибной активности

Эксперимент по изучению влияния противогрибной активности бактериального препарата в отношении универсального фитопатогена *B. cinerea* был проведен согласно методике, описанной в п. 2.5.3. На рисунке 19 представлены результаты, зафиксированные на 3 сутки инкубации.



Рисунок 19 – Результаты исследования бактериального препарата на 3 сутки инкубации

а) контрольный образец; б) образец, обработанный биопрепаратом

Полученные результаты, свидетельствуют об эффективной защите модельного объекта, в качестве которого были выбраны помидоры сорта тестери с калибром 20:30 бактериальным препаратом. Визуальная оценка позволяет отметить минимальную контаминацию плодов, обработанных биопрепаратом, по отношению к контрольным образцам.

Далее на рисунке 20 представлены результаты эксперимента, зафиксированные на 7 сутки инкубации.



Рисунок 20 – Результаты исследования бактериального препарата на 7 сутки инкубации

а) контрольный образец; б) образец, обработанный биопрепаратом

Следующий этап оценки противогрибной активности бактериального препарата в отношении фитопатогенного гриба *B.cinerea* показал, что обработанные биопрепаратом помидоры менее подвержены распространению заболевания, по сравнению с контрольным образцом.

Заключительные результаты данного эксперимента представлены на рисунке 21 и свидетельствуют о высокой эффективности бактериального препарата. Исходя из этого рекомендуется применять бактериальный препарат с концентрацией 5 г/л для защиты сельскохозяйственных растений от фитопатогенных заболеваний.



а)



б)

Рисунок 21 – Результаты исследования бактериального препарата на 14 сутки инкубации

ВЫВОДЫ

В результате проделанной работы:

1. Экспериментально установили, что штаммы *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* обладают антагонистической активностью в отношении фитопатогенных грибов *F.oxysporum*, *A.solani*, *A.alternata*, *P. exigua*, *C. beticola*, *B.cinerea*.

2. Штамм *Methylobacterium extorquens* проявил высокую противогрибную активность по отношению к фитопатогенным грибам – *F.oxysporum*, *P.exigua* и *B.cinerea*. Однако бактериальный штамм не оказал существенного влияния на ингибирование роста фитопатогенных грибов *C. beticola*, *A. solani* и *A.alternata*.

3. В ходе проведенных экспериментов было выявлено, что целесообразно использование комбинаций бактериальных культур, так как действие отдельных компонентов – *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* и *Methylobacterium extorquens*, усиливается при их совместном использовании.

4. Была подобрана концентрация бактериального препарата – 5 г/л, при которой проявлялась максимальная противогрибная активность по отношению ко всем исследуемым фитопатогенным грибам.

5. Была доказана высокая эффективность бактериального препарата на модельном объекте (помидорах сорта тестери), в отношении универсального фитопатогенного *B.cinerea*.

В результате был получен бактериальный препарат с высокой антагонистической активностью по отношению к заявленным фитопатогенным микроорганизмам.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Агафонова Н. В. Таксономическая и функциональная характеристика аэробных метилотрофных бактерий-фитосимбионтов, 2017 – 142 с.
2. Асатурова А.М. Физиологические признаки перспективных штаммов бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas* – продуценты микробиопрепаратов. МАСЛИЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ. Научно-технический бюллетень. Всероссийский научно-исследовательского института масличных культур. Вып. 2 (141), 2009 – 7 с.
3. Арзамасцев А.А. Математические модели кинетики микробного синтеза: возможности использования и новые подходы к разработке// Вестн. Тамбов. ун-та. Серия: Естеств. и техн. Науки, 2000. – Т. 5 (1). – 111 с.
4. Бирюков В.В. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза / Бирюков В.В. Кантере В.М. // М: Наука, 1985 – 296 с.
5. Ефременко О.В., Зенкова В.А., Катруха Г.С. и др. Анттимикробная активность представителей вида *Bacillus megaterim*. Микробиология. Т.81.№2, 2012 – 196-204 с.
6. Жиглецова С.К., Дунайцев И.А., Бесаева С.Г. Возможности применения микроорганизмов для решения задач экологической и продовольственной безопасности. Агрехимия. №6, 2010. – 83-96 с.
7. Замахаева, С. А., Федоров, Д. Н., Доронина, Н. В., & Троценко, Ю. А. Клонирование и характеристика полигидроксибутиратсинтазы из *Methylobacterium extorquens* AM1, 2016 – 15 с.
8. Кирик Н. Н., Пиковский М. И. Симптоматика серой гнили фасоли // Защита и карантин растений. №12, 2007 – 31 с.
9. Лухменёв В.П. Фитопатология. Учебное пособие для студентов вузов, обучающихся по специальности агрономии. Оренбург, 2012. – 299 с.

10. Маланичева И.А., Козлов Д.Г., Мумаруова И.Г., Ефременко О.В. Антимикробная активность представителей вида *Bacillus megaterium*. МИКРОБИОЛОГИЯ, Т.8, № 2, 2012, С. 196-204.
11. Машанов А.И., Бышко Н.А. Идентификация и характеристика патогенных грибов, поражающих клубни картофеля при хранении. // Вестник КрасГАУ. 2012. № 5. С.: 423-426.
12. Минаева О.М., Акимова Е.Е., Зюбанова Т.И., Терещенко Н.Н. Биопрепараты для защиты растений: оценка качества и эффективности: учеб. Пособие. – Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2018. – С.130.
13. Монастырский О.А. Состояние и перспективы развития биологической защиты растений в России. Защита и карантин растений. №12. 2008 – С.41-44.
14. Муродова С.С., Давронов К.Д. Комплексные микробные препараты. Применение в сельскохозяйственной практике. BIOTECHNOLOGIA АСТА. Т.7, №6. Изд.: Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины. Украина, 2014 – С.92-101.
15. МУК 4.2.1890—04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.
16. Нетрусов А. И., Котова И. Б. Микробиология. – Academia, 2006. – С. 167-168.
17. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / под ред. В.В. Глупова. М.: Круглый год, 2001. – С.736.
18. Пименова М. Н., Гречушкина Н. Н., Азова Л. Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Малый практикум: Учебное пособие. – МГУ, 1971.
19. Реброва И.А. Планирование эксперимента: учебное пособие. – Омск: СибАДИ, 2010. – С.105.
20. Савельева В. В. Оптимизация питательной среды для *streptomyces hygroscopicus* – продуцента фармацевтической субстанции рапамицина /

- В. В. Савельева, В. В. Джавахия, Е. В. Глаголева и др. // Международный научно-исследовательский журнал. — 2017. — № 03 (57) Часть 3. — 20 с.
21. Садунов А.В. Общая характеристика бактерий рода *Bacillus*. Сборник материалов международной студенческой научной конференции «Современные проблемы науки и образования», Т.1, М, 2018 – 30 с.
22. Соколов М.С., Коломбет Л.В. Агротехногенные факторы минимизации вредоносности фузариоза колоса пшеницы // Агротехнология. № 12, 2007 – 80 с.
23. Сидорова Т.М., Асатунова А.М., Хомяк А.И. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов. Сельскохозяйственная биология. Т.53, №1, 2018 – 29 с.
24. Соколов М.С., Коломбет Л.В. Агротехногенные факторы минимизации вредоносности фузариоза колоса пшеницы // Агротехнология. № 12. 2007 – С. 63–80.
25. Стогниенко О. И., Мелькумова Е. А. Церкоспороз сахарной свеклы в Центрально-Черноземном регионе // Защита и карантин растений. №8, 2007 – 33 с.
26. Троценко Ю. А., Торгонская М. Л. Аэробные метилотрофы-перспективные объекты современной биотехнологии, 2012– 243-279 с.
27. Хомяк А. И., Асатунова А. М., Сидорова Т. М. Технология получения биофунгицидов на основе новых бактерий рода *Bacillus* для защиты озимой пшеницы и других сельскохозяйственных культур от экономически значимых болезней. Мат. II науч.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Современные аспекты производства и переработки сельскохозяйственной продукции». Краснодар, 2016 – 216-224 с.
28. Чан Минь Куан, Егоров М.А., Батаева Ю.В. Ростостимулирующий эффект штамма *Bacillus megaterium* в вегетативном опыте. Вестник

- Алтайского государственного аграрного университета. Алтайский государственный университет №3 (89). Барнаул, 2012 – 46-49 с.
- 29.Штерншис М.В. Состояние и перспективы использования биопрепаратов для защиты растений в Сибири. Вестник Новосибирского государственного аграрного университета. Изд.: НГАГ. №5 (21), Новосибирск, 2011 – 48-55 с.
- 30.Штерншис М.В. Тенденции развития биотехнологии микробных средств защиты растений в России. Вестник ТГУ. Биология. – №2 (18) – 2012 – 92-100 с.
- 31.Aksenova E.N. Methods for processing of Measurement Results. – М.: МИФИ, 2015 – 10 с.
- 32.Doronina, N. V., Torgonskaya, M. L., Fedorov, D. N., & Trotsenko, Y. A. Aerobic methylobacteria as promising objects of modern biotechnology //Applied biochemistry and microbiology. – 2015. – Vol. 51. – №. 2. – P. 125-134.
- 33.Farace G., Fernandez O., Jacquens L., Coutte F., Krier F., Jacques Ph., Clément Ch., Barka E.A., Jacquard C., Dorey S. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defense responses in grapevine. *Mol. Plant Pathol.* – 2015 – № 16(2) – P. 147.
- 34.Fedorov D. N., Doronina N. V., Trotsenko Y. A. Phytosymbiosis of aerobic methylobacteria: new facts and views //Microbiology. – 2011. – Vol. 80. – №. 4. – P. 443.
- 35.Jacques P. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In: Biosurfactants. Microbiology monographs /G. Soberón-Chávez (ed.). Springer, Berlin, Heidelberg – 2011, Vol. 20 – №52. – P. 169.
- 36.Kino K., Kotanaka Y., Arai T., Yagasaki M. A novel L-amino acid ligase from *Bacillus subtilis* NBRC3134, a microorganism producing peptide — antibiotic rhizocticin. *Biosci. Biotech. Bioch.* – 2009 – Vol. 73(4) – P. 901-907.

37. Li J., Yang Q., Zhao L., Zhang S., Wang Y., Zhao X. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *J. Zhejiang Univ.-Sc. B* – 2009 – Vol. 10(4) – P. 264-272.
38. Ochsner, A. M., Sonntag, F., Buchhaupt, M., Schrader, J., & Vorholt, J. A. *Methylobacterium extorquens*: methylotrophy and biotechnological applications // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2015. – Vol. 99, №. 2. – P. 517-534.
39. Qiu, M., Wu, C., Ren, G., Liang, X., Wang, X., Huang, J. Effect chitosan and its derivatives as antifungal and preservative agents on postharvest green asparagus. // *Food Chem* – 2014 – V.155, P.105–111.
40. Zhong J., Zhang X., Ren Y., Yang J., Tan H., Zhou J. Optimization of *Bacillus subtilis* cell growth effecting jian-peptide production in fed batch fermentation using central composite design. *Electron. J. Biotechn.* – 2014 – Vol. 17 – P. 132-136.