

На правах рукописи



БУРОВА ЮЛИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**Изучение свойств бактерии *Pseudomonas aureofaciens* и получение на ее основе
биопрепарата для защиты растений**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва, 2013

Работа выполнена на базе кафедры биотехнологии и научно-образовательного центра «Нанобиотехнологии» Биологического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Ревин Виктор Васильевич

Официальные оппоненты:

Алимова Фарида Кашифовна,
доктор биологических наук, профессор,
Институт фундаментальной медицины и биологии
Казанского (Приволжского) федерального университета,
заведующая кафедрой биохимии

Еланский Сергей Николаевич,
доктор биологических наук,
биологический факультет Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова, кафедра альгологии
и микологии, старший научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского Российской академии наук

Защита состоится «24» декабря 2013 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1. Тел.8(495)939054-83, эл. почта npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ.

Автореферат разослан «20» ноября 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Пискункова Нина Федоровна.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время актуальной проблемой растениеводства является борьба с заболеваниями сельскохозяйственных культур, возбудителями которых являются различные фитопатогенные грибы. Используемые методы химической защиты имеют ряд существенных недостатков, поскольку их применение приводит к загрязнению окружающей среды, накоплению токсичных соединений в продуктах питания, что, несомненно, сказывается на здоровье людей и животных. Использование естественных обитателей почвы в качестве основных биоконтролирующих агентов позволяет устранить данные недостатки, а также способствует ее оздоровлению. В связи с этим актуальным является поиск наиболее активных штаммов микроорганизмов для борьбы с фитопатогенами и получение на их основе новых видов препаратов.

В настоящее время имеется большой опыт по использованию псевдомонад в сельскохозяйственной практике (Логинов О. Н., 2005). Данные микроорганизмы зарекомендовали себя как активные антагонисты грибов *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Phytophthora* и т.д., вызывающих массовые заболевания сельскохозяйственных культур (Санин С. С., 2010; Баранова Е. В. с соавт., 2011; Jung W. J. et al., 2011; Pérez-García A. et al., 2011; Raio A. et al., 2011; Хархун Е. В. с соавт., 2012).

При разработке технологии получения биопрепаратов большое внимание следует уделять повышению эффективности их действия и снижению себестоимости. Последнее возможно за счет использования отходов промышленности в качестве основы питательной среды. Известны способы культивирования бактерий на послеспиртовой барде (Лукаткин А. А., 2010), на нефтесодержащих субстратах (Анохина Т. О., 2011) и т.д. Перспективным субстратом является отход свеклосахарного производства - меласса. Однако, сведений о ее применении в качестве основного компонента питательной среды для культивирования псевдомонад недостаточно (Goksungur Y. et al., 2004; Küçükaşık F. et al., 2011). Данный подход позволит расширить спектр применения мелассы и снизить себестоимость полученного бактериального препарата.

Цель исследования. Изучение свойств отселектированного штамма бактерии *Pseudomonas aureofaciens* и оптимизация условий его культивирования на мелассной среде с целью получения высокоактивного биопрепарата для защиты от фитопатогенных грибов и стимуляции роста сельскохозяйственных культур.

Задачи исследования.

1. Исследовать основные физиолого-биохимические свойства отселектированного штамма бактерии *P. aureofaciens*.
2. Оптимизировать состав среды на основе мелассы и подобрать условия культивирования, обеспечивающие максимальный рост бактерии.
3. Изучить фунгицидное действие *P. aureofaciens* по отношению к ряду фитопатогенных грибов.
4. Исследовать ростостимулирующие свойства полученного биопрепарата в лабораторных и полевых условиях.

Научная новизна работы. Впервые исследованы основные физиолого-биохимические особенности нового штамма бактерии *P. aureofaciens* и биологически активные метаболиты (индолил-3-уксусная кислота (ИУК) и антибиотические вещества феназинового ряда). Впервые оптимизирована среда на основе свеклосахарной мелассы для культивирования бактерии *P. aureofaciens* и получен высокоактивный биопрепарат, характеризующийся стабильным высоким титром и жизнеспособностью клеток в процессе хранения. Выявлено наличие фунгицидного действия полученной культуральной жидкости (КЖ) в отношении ряда фитопатогенных грибов. При обработке семян злаковых культур бактериальной суспензией (БС) отмечен выраженный ростостимулирующий эффект в лабораторных и полевых условиях.

Научно-практическая значимость работы. Оптимизированы условия получения биопрепарата комплексного действия с использованием высокоэффективного штамма бактерии *P. aureofaciens*. В качестве основного питательного субстрата предложено использование

свеклосахарной мелассы, позволяющее снизить себестоимость целевого продукта. Результаты исследования, проведенного в условиях открытого грунта, свидетельствуют о высокой эффективности использования БС *P. aureofaciens* для предпосевной обработки, позволяющей снизить степень заражения культурных растений и увеличить биологическую урожайность. Экспериментальные результаты и методики, изложенные в работе, используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении практических занятий по курсу «Теоретические основы биотехнологии» на кафедре биотехнологии ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарёва».

Основные положения, выносимые на защиту.

- Изучены физиолого-биохимические свойства отселекционированного штамма бактерии *P. aureofaciens*.
- Оптимизирован состав мелассной среды и условия культивирования бактерии *P. aureofaciens*.
- Полученный биопрепарат обладает ростостимулирующим и фунгицидным действиями, проявление которых обусловлено синтезом биологически активных веществ фитогормональной (ИУК), антибиотической (феназиновые соединения) и ферментативной природы (гидролитические ферменты).

Связь работы с научными программами. Представленные результаты были получены в ходе исследований при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «У.М.Н.И.К.» (проект № 13168) по теме «Разработка состава оболочки для обработки семян и изучение ее свойств».

Личный вклад автора. В работе приведены результаты, полученные лично автором, при выполнении работ в рамках совместной деятельности, кроме идентификации штамма бактерии, которая проводилась во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов ФГУП Гос НИИ Генетика. Постановка проблемы, методическая разработка, планирование и проведение экспериментов, обработка полученных данных и апробация осуществлялись автором. Публикация полученных результатов проводилась в соавторстве, доля личного участия пропорциональна числу соавторов.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены для обсуждения на научных конференциях: Огаревские чтения в Мордовском государственном университете им. Н.П. Огарева (Саранск, 2010-2012); на научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева (Саранск, 2010-2012); Междисциплинарном микологическом форуме (Москва, 2010), Московской международной научно-практической конференции «Биотехнология: экология крупных городов» (Москва, 2010), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Экология родного края: проблемы и пути их решения» (Киров, 2010), Международной научной конференции «Биотехнология начала III тысячелетия» (Саранск, 2010), 2-м Международном Конгресс-Партнеринг и Выставке по биотехнологии и биоэнергетике «ЕвразияБио-2010» (Москва, 2010), Всероссийской конференции «Проблемы и перспективы изучения естественных и антропогенных экосистем Урала и прилегающих регионов» (Стерлитамак, 2010), международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2012» (Москва, 2012), 7 международной конференции «Проблемы лесной фитопатологии и микологии» (Ульяновск, 2012).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 24 работы, в том числе 4 в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 146 страницах машинописного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка использованной литературы. Диссертационная работа включает 50 рисунков и 19 таблиц. Список цитируемой литературы включает 260 источников, в том числе 125 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает сердечную благодарность за неоценимую помощь, понимание и поддержку на всех этапах работы над диссертацией всем сотрудникам кафедры биотехнологии Мордовского государственного университета имени Н.П. Огарёва, особая

благодарность научному руководителю – д.б.н., профессору Ревину В.В. и к.б.н. Ибрагимовой С.А.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы

В главе проанализированы и обобщены сведения о свойствах бактерии рода *Pseudomonas* и ее использовании для получения биопрепаратов, применяемых в растениеводстве. Рассмотрены наиболее активные штаммы и виды, используемые как агенты биологического контроля фитопатогенных грибов и стимуляторов роста растений в отечественной и зарубежной практике. Приведена характеристика веществ, обуславливающих фунгицидное и ростостимулирующее действия псевдомонад. Рассмотрены различные варианты предпосевной обработки семян растений с непосредственным нанесением активного компонента на поверхность посевного материала. Дана характеристика отхода пищевого производства – свеклосахарной мелассы как основного компонента питательной среды для культивирования бактерии.

2. Объекты и методы исследования

Объектом исследования служил штамм бактерии *Pseudomonas aureofaciens*, отселекционированный на кафедре биотехнологии Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва в 2006 году (идентифицирован и депонирован в ФГУП ГосНИИГенетика под номером ВКПМ В-11634). Изучение физиолого-биохимических особенностей штамма проводили методами глубинного и поверхностного культивирования на стандартных средах по общепринятым методикам (Нетрусов А. И., 2005). Для выявления амилолитических ферментов бактерию культивировали на модифицированной среде Кинга (King E. O. et al., 1954) с крахмалом, хитинолитических – с коллоидным хитином, протеолитических – на молочном агаре Эйкмана. Об их наличии судили по зоне гидролиза субстрата. Активацию культуры проводили на пептонно-дрожжевой среде в колбах Эрленмейера на шейкере при 150 мин^{-1} и $28 \pm 2^\circ \text{C}$ в течение 24 ч (Лукаткин А. А., 2010). При оптимизации условий получения биопрепарата мелассную среду засекали инокулятом в количестве 10 %, культивирование проводили при $28 \pm 2^\circ \text{C}$ в течение 19 – 21 часов. При масштабировании процесса культивирование осуществляли в полупромышленном биореакторе Biostat A plus фирмы Sartorius stedim biotech (Германия) при различных режимах работы мешалки. Определение уровня биомассы проводили весовым методом, титра активных клеток – методом Коха, внеклеточный белок по методу Бредфорд. Для исследования антагонистических свойств бактерии проводили совместное культивирование методами перпендикулярных штрихов и блоков (Нетрусов А. И., 2005) с фитопатогенами *Fusarium culmorum*, *Alternaria infectoria*, *A. alternate*, *A. tenuissima*, *A. solani*, *Pythium oligandrum* (предоставленные сотрудниками кафедры микологии и альгологии МГУ имени М. В. Ломоносова) и *Tilletia tritici*. Наличие микопаразитических свойств в КЖ определяли после ее центрифугирования при 8000 мин^{-1} . Супернатант в количестве 0,5 мл помещали в центральную часть чашки Петри на картофельно-глюкозный агар (КГА). Через 7-10 суток рассчитывали процент ингибирования роста грибов по формуле Эббота или замеряли зону отсутствия роста, наблюдали за изменением морфологии колонии фитопатогенов. Сравнительная оценка фунгицидного действия полученного биопрепарата и коммерческих микробиологических препаратов «Фосфатовит» и «Азотовит» проводилась на тест-объектах – *F. culmorum*, *A. infectoria* и *T. tritici* методом блоков на КГА. Оценку ростостимулирующего действия БС проводили по показателям энергии прорастания и всхожести семян пшеницы сорт «Тулайковская-10», овса сорт «Алльор», ячменя сорт «Заозерный 85» (коммерческие партии, урожай 2009 – 2011 гг.) в лабораторных и полевых условиях. При исследовании ростостимулирующих свойств биопрепарат разводили водой в соотношении 1 : 50; 1 : 100; 1 : 200; 1 : 500. Контроль - семена, обработанные водопроводной водой. Изучение ростовых параметров проводили по стандартным методикам определения всхожести семян сельскохозяйственных культур (ГОСТ 12038-84, 1986). Лабораторные испытания проводили в климатической/испытательной камере Sanyo MLR-352

(Япония) при константных параметрах температуры, влажности и освещения, полевые – на экспериментальных площадях (100 га) опытных хозяйств ОПХ «1 Мая» и ООО «Племенной завод Александровский» в 2010 - 2012 гг. Наличие антибиотических веществ в КЖ *P. aureofaciens* при ее хранении исследовали методом тонкослойной хроматографии (Власова Е. П, 2011), определение содержания индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) - колориметрическим методом (Gordon et al., 1951). Экспериментальные данные обрабатывали статистически с использованием пакета программ Microsoft Excel 2007. В таблицах и на рисунках приведены средние значения всех опытов со стандартными ошибками.

3. Изучение физиолого-биохимических характеристик бактерии *Pseudomonas aureofaciens*

Изучение физиолого-биохимических характеристик бактерии имеет огромное значение при разработке эффективного биопрепарата. Для нормального развития и жизнедеятельности всем микроорганизмам необходим азот (нитратные, аммонийные формы), т.к. он входит в состав аминокислот и участвует в образовании пептидных связей белка (Нетрусов А. И., 2005). Важными параметрами при получении биопрепаратов являются титр активных клеток и биологическая активность. Поэтому была проведена серия опытов по исследованию влияния различных источников азота: NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, β -аланин, пептон и дрожжевой экстракт на рост биомассы *P. aureofaciens*. Максимальный уровень биомассы наблюдался на среде с пептоном ($10,7 \pm 0,7$ г/л), на среде с дрожжевым экстрактом значение исследуемого показателя было ниже в среднем на 19 %. При культивировании на средах с неорганическими источниками азота, было показано, что штамм способен усваивать как аммонийный, так и нитратный азот, осуществляя ассимиляционную нитратредукцию. По наличию внеклеточного белка можно косвенно судить о ферментативной активности, поэтому при его исследовании, установлено, что максимальное накопление наблюдалось при использовании органической формы – пептона (255 ± 7 мкг/мл). Высокий уровень исследуемых показателей в варианте с пептоном, который представляет собой гидролизат белков, вероятно, обеспечивается его питательными свойствам и наличием высокой протеолитической активности исследуемой бактерии. Лучшим источником неорганической формы азотного питания для исследуемого штамма явился сульфат аммония (количество внеклеточного белка составило 146 ± 9 мкг/мл).

Так как углерод занимает ключевое место в биосинтетических процессах, то на следующем этапе исследовали влияние различных источников на развитие исследуемого штамма. Максимальное количество активных клеток выявлено на средах с глюкозой и сахарозой ($5 \cdot 10^{11}$ и $2,1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл соответственно). В варианте с фруктозой, рамнозой и лактозой титр клеток имел близкие значения $1,1 \cdot 10^8$; $1,8 \cdot 10^7$ и $7,6 \cdot 10^7$ КОЕ/мл соответственно (рисунок 1). Минимальные значения исследуемого показателя отмечены при использовании крахмала, при этом уровень жизнеспособных клеток был ниже максимального значения практически на 50 %.

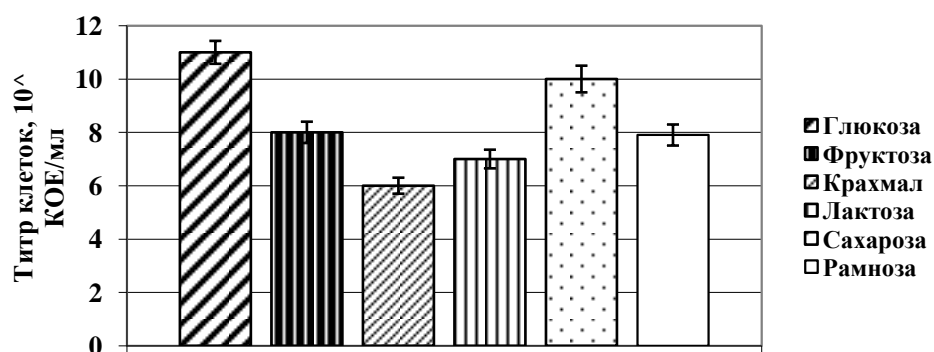


Рисунок 1.
Максимальные значения титра бактерии *Ps. aureofaciens* при культивировании с различными сахарами.

Максимальный уровень внеклеточного белка отмечен в стационарную фазу роста культуры (с 19 по 23 часы культивирования) и составил 255 ± 7 мкг/мл в варианте с глюкозой на 21 час

роста. В других вариантах опыта результаты были ниже: на средах с рамнозой и лактозой в среднем на 21 %, с сахарозой – на 28 %, с крахмалом - в среднем в 3,5 раза ниже максимального.

Для развития любого микроорганизма существуют определенные температурные и pH оптимумы, при которых обеспечивается его максимальный рост, выход целевого продукта и т.д. Температурные границы для большинства видов псевдомонад довольно широки (4 – 43 °С). Многие виды этого рода являются мезофилами и развиваются при 27 – 30 °С (Хоулт Д. с соавт., 1997). Для исследуемого штамма псевдомонад ранее данные параметры не были изучены, поэтому были рассмотрены температурные режимы: 20, 25 и 30 °С в условиях глубинного культивирования бактерии на минеральной среде с добавлением 10 г/л глюкозы. При температуре 25 °С уровень микробной массы превысил значения других вариантов практически в два раза и составил $10,9 \pm 1,1$ г/л. В условиях поверхностного культивирования были рассмотрены температурные режимы: 4, 20, 30 и 41 °С. При этом рост бактерий *P. aureofaciens* значительно различался. Наиболее обильный однородный рост бактерии по всему штриху отмечен при 30 °С. На вторые сутки культивирования наблюдалось появление пигмента темно-оранжевого цвета, колонии имели более плотную консистенцию с выраженным слизиобразованием. При температуре 4 и 41 °С развитие бактерии практически не наблюдалось. Оптимальным pH для бактерий рода *Pseudomonas* является интервал от 4,5 до 7,5 (Нетрусов А. И. с соавт., 2004; Yang G. et al., 2013). В опытах использовалась оптимизированная по источникам азота и углерода минеральная среда со значениями pH от 4,5 до 7,5 с интервалом 0,5. Во всех вариантах максимум данного значения зафиксирован на 19 и 21-е часы культивирования. Минимальный прирост биомассы отмечен при кислых значениях pH и составил в среднем $5,1 \pm 0,9$ г/л, что на 43 % меньше максимально полученного результата. При нейтральном значении pH уровень биомассы в 9 раз превысил начальный уровень и составил $10,8 \pm 0,4$ г/л. Полученный результат согласуется с литературными данными, т.к. нейтральное значение pH наиболее благоприятно для работы ферментных систем и развития бактерий (Клесов А. А., 1984; Березовская В. А. с соавт., 2006; Моргун В. В. с соавт., 2009).

Для более полной характеристики свойств исследуемого штамма оценивали следующие физиолого-биохимические свойства: способность к гидролизу желатины, использование в качестве единственного источника углерода и энергии крахмал, рост на среде при концентрации NaCl 1, 2 и 3 %, синтез желто-зеленого флуоресцирующего пигмента (Тахтаджян А. Л., 1974; Хоулт Д. с соавт., 1997; Нетрусов А. И., 2005). При исследовании способности гидролизовать желатину на поверхности среды наблюдался рост бактерий в виде слизи темно-желтого цвета. Отмечена граница зоны гидролиза около 6 мм, что свидетельствует о способности исследуемого штамма разжижать желатину. Амилолитические свойства *P. aureofaciens* обнаружены не были, т.к. на среде с крахмалом зона гидролиза практически не наблюдалась, что свидетельствует об отсутствии или слабой активности амилолитических ферментов. При исследовании роста бактерии на среде с NaCl во всех вариантах уже на первые сутки отмечено слизиобразование. Повышение концентрации соли в среде вызывало усиление пигментации. Культивирование бактерии *P. aureofaciens* на молочном агаре Эйкмана позволило установить, что исследуемый штамм способен секретировать в среду ферменты – протеазы, так как при росте микроорганизма визуально отмечена зона гидролиза субстрата. При культивировании бактерии на среде Кинг В был выявлен желто-коричневый пигмент, флуоресцирующий при действии ультрафиолетового света.

Таким образом, максимальное развитие исследуемого штамма происходит на среде, содержащей в качестве источников углерода – глюкозу и сахарозу, источников азота - пептон, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и дрожжевой экстракт. Оптимальной температурой для роста при жидкофазном культивировании является 25 °С, при поверхностном – 30 °С. При нейтральном начальном значении pH среды бактерия образует максимальное количество биомассы. Бактерия *P. aureofaciens* хорошо гидролизует желатину, не использует крахмал в качестве единственного источника углерода, может расти на среде при концентрации NaCl до 3 %, способна синтезировать флуоресцирующий пигмент. Все изученные особенности нового штамма бактерии *P. aureofaciens* соответствуют свойствам этого вида (Хоулт Д. с соавт., 1997; Zhang Z. et al., 2001; González A. G.

et al., 2010). В последующих экспериментах для активации культуры использовали модифицированную пептонно-дрожжевую среду, обеспечивающую максимальный уровень биомассы и титр активных клеток.

По результатам проведенного анализа секвенсов переменных участков генов, кодирующих 16S РНК, тестируемый штамм наиболее близок к виду *Pseudomonas chlororaphis* (97 %) (приложение 1). На основании исследованных свойств отселекционированный штамм бактерии депонирован как *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* и зарегистрирован под номером ВКПМ В-11634 (приложение 2).

4. Оптимизация условий культивирования *Pseudomonas aureofaciens* на среде с мелассой

Для культивирования микроорганизмов с целью получения высокого выхода биомассы и синтеза вторичных метаболитов необходимы богатые по составу питательные среды. Перспективным субстратом является отход свеклосахарного производства – меласса, содержащая до 50 % сахаров. Однако широкое использование такого подхода утилизации мелассы сдерживается отсутствием разработанных технологических режимов, обеспечивающих активный рост микроорганизмов. В работе подбирали оптимальные условия культивирования *P. aureofaciens* с целью получения высокой концентрации активных клеток продуцента. Для этого оптимизировали концентрацию мелассы в питательной среде. Полученные результаты показали прямую зависимость прироста биомассы от увеличения концентрации субстрата в среде. Максимальный уровень биомассы отмечен на 23 часа культивирования в вариантах с концентрацией мелассы 40, 50, 60 г/л и составил в среднем $10,1 \pm 0,3$ г/л, что более чем в 1,5 раза выше значений вариантов с 10 и 20 г/л (рисунок 2). Поэтому в дальнейших исследованиях с целью экономии использовали мелассу в концентрации 40 г/л.

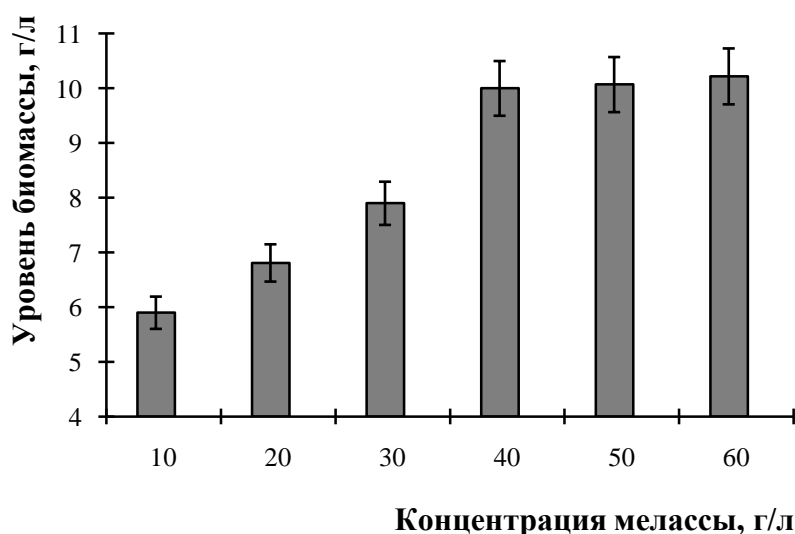


Рисунок 2.
Максимальный уровень биомассы *P. aureofaciens* при культивировании на среде с мелассой.

Наряду с углеродом для развития микроорганизмов основным компонентом среды является азот. В следующей серии опытов в среду вносили минеральные соли: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , NH_4NO_3 в концентрациях 1, 2 и 3 г/л. Показано, что добавление в мелассную среду каждой соли в концентрации 2 г/л интенсифицировало рост культуры (рисунок 3).

Повышение и понижение концентрации вносимых солей привело к уменьшению прироста биомассы во всех исследуемых вариантах опыта. Максимальный результат отмечен в варианте с нитратом натрия ($12,5 \pm 0,4$ г/л). Усвоение нитратной формы азота связано с работой нитратредуктазы, активность которой у разных бактерий проявляется в разной степени. Возможно, в данных условиях исследуемая культура проявляет высокую нитрогеназную активность (Свешникова Е.В., 2003). Титр активных клеток составил в среднем $10^9 - 10^{10}$ КОЕ/мл.

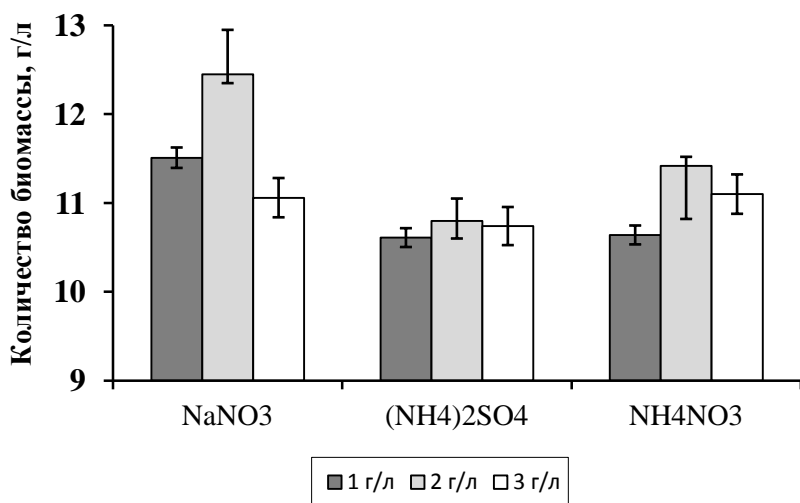


Рисунок 3.
Максимальный уровень
биомассы *P. aureofaciens*
на среде с разными
источниками азота.

Кроме азота в регуляции жизнедеятельности микроорганизмов важная роль отводится фосфору, как одному из ведущих участников конструктивного и энергетического обменов. В ранее оптимизированную мелассную среду добавляли K_2HPO_4 в концентрации: 1; 1,5; 2 и 2,5 г/л. При максимальном количестве вносимой соли на 19 час роста уровень биомассы составил $15,4 \pm 0,5$ г/л с титром $7,1 \cdot 10^{11}$ КОЕ/мл. При уменьшении концентрации соли до 1,5 г/л содержание биомассы снизилось на 17,7 % (рисунок 4).

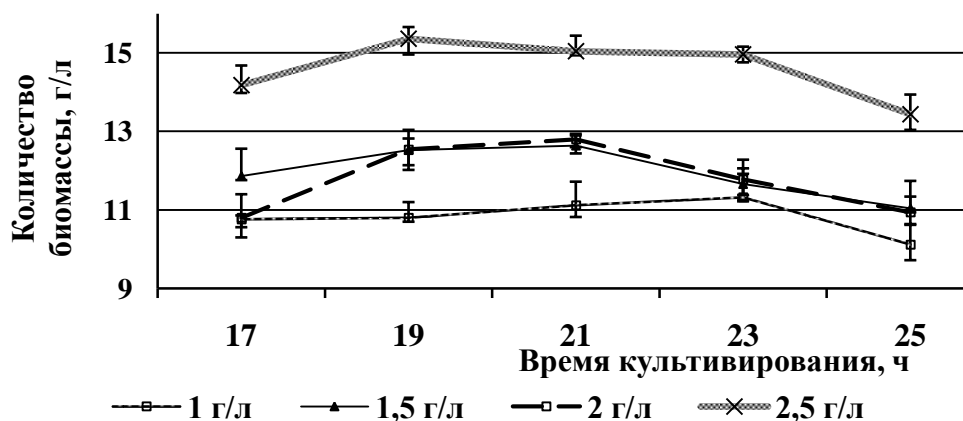


Рисунок 4. Динамика
содержания биомассы
P. aureofaciens
на мелассной среде с
 K_2HPO_4 .

Таким образом, опыты по оптимизации состава мелассной среды (40 г/л) показывают, что на фоне высокой концентрации сахаров необходимо дополнительное внесение 2 г/л NaNO_3 и 2,5 г/л K_2HPO_4 . Этот состав среды обеспечивает максимальный выход биомассы и титра активных клеток.

Для масштабирования процесса культивирования бактерии проводили в полупромышленных биореакторах на оптимизированной среде при различных режимах работы мешалки: 150, 180 и 200 мин^{-1} . Во всех вариантах опыта максимальное содержание микробной массы и высокий титр клеток наблюдался на 21 ч роста. При режиме 180 мин^{-1} уровень биомассы составил $15,36 \pm 1,4$ г/л, что на 8,0 и 14,6 % выше, чем в вариантах со 150 и 200 мин^{-1} соответственно. Контролирование динамики изменения pH среды позволили заключить, что развитие культуры происходит в слабо кислой области - pH 5,8.

5. Изучение фунгицидных свойств бактериальной суспензии

При исследовании микопаразитических свойств полученного биопрепарата показан положительный эффект в отношении фитопатогенов *F. culmorum*, *B. cinerea*, *A. alternata*, *A. infectoria*, *A. solani*, *A. tenuissima*, *P. oligandrum*, *T. tritici*. Фунгицидное действие проявлялось в угнетении роста грибных колоний и развития мицелия. Степень ингибирования различалась в

зависимости от вида тест-объекта. Максимальный эффект отмечен в отношении *F. culmorum* и *A. alternata* (рисунок 5).

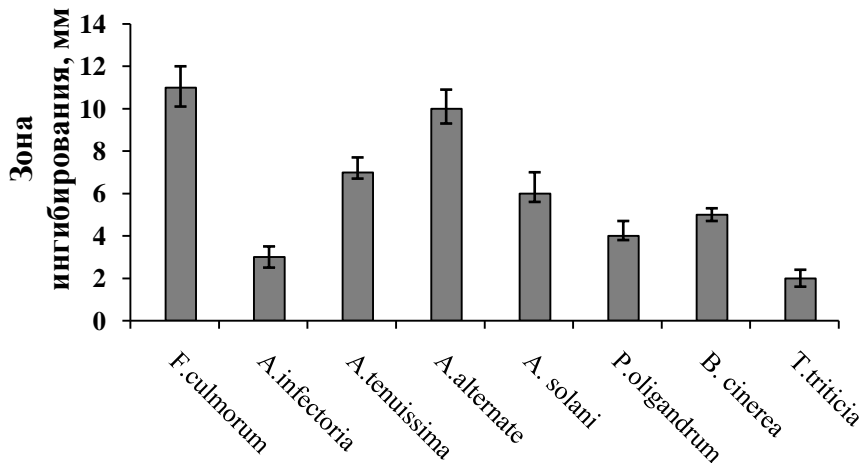


Рисунок 5. Зона ингибирования роста тест-культур.

Согласно литературным данным в проявлении фунгицидных свойств участвуют внеклеточные метаболиты такие, как антибиотики феназинового ряда, ферменты, сидерофоры, экзополисахариды (Zhang Z. et al., 2001; Nielsen T. H. et al., 2002; Morello J. E. et al., 2004; Parker D. et al., 2004; Price-Whelan A. et al., 2006; Validov S. Z. et al., 2010; González A.G. et al., 2010). При исследовании отцентрифугированной КЖ показано сохранение микопаразитических свойств, что свидетельствует о наличии внеклеточных метаболитов, вызывающих ингибирование роста исследуемых грибов: мицелий развивался слабо, гифы имели неразветвленную структуру. Максимальное фунгицидное действие КЖ проявлялось в отношении гриба *A. solani*, минимальное - *A. tenuissima* и *A. infectoria*. Для подтверждения данного свойства проводилось глубинное инкубирование *F. culmorum* в присутствии центрифугата КЖ. Результаты микроскопирования свидетельствовали о частичном разрушении мицелия гриба: гифы имели слабо окрашенную тонкую структуру с лизированными участками, присутствовали обрывки гиф, спорообразование по сравнению с контролем (без внесения бактериальной суспензии) не наблюдалось. Это можно объяснить действием экзоферментов, в частности хитиназ, на клеточную стенку гриба. Таким образом, установлено, что проявление микопаразитических свойств бактериальной суспензии происходит и при отделении клеток продуцента, что обусловлено действием внеклеточных метаболитов.

Также была проведена сравнительная оценка фунгицидного действия полученного биопрепарата с коммерческими партиями микробиологических препаратов «Фосфатовит» и «Азотовит». Минимальное действие в отношении всех фитопатогенов наблюдалось при использовании биопрепарата «Азотовит». В других вариантах опыта зона подавления роста грибов практически была одинаковой. Развитие *T. tritici* в присутствии псевдомонад было минимальным (процент ингибирования роста в среднем на 25 % выше, чем у «Фосфатовит»), а *F. culmorum* и *A. infectoria* более интенсивно (таблица 1).

Таблица 1.

Процент ингибирования роста грибов при культивировании с бактериальными суспензиями, %.

Тест-объект	Используемый препарат		
	КЖ <i>P. aureofaciens</i>	«Фосфатовит»	«Азотовит»
<i>F. culmorum</i>	87,5	89,0	13,1
<i>A. infectoria</i>	90,4	94,3	58,2
<i>T. tritici</i>	77,4	51,6	0

Таким образом, КЖ *P. aureofaciens* обладает высоким фунгицидным эффектом наряду с такими микроорганизмами как бациллы, широко используемые в сельскохозяйственной практике (Монастырский О. А. с соавт., 2009; Pérez-García A. et al., 2011; Максимов И. В. с соавт., 2011), и превосходит действие бактерией рода *Azotobacter*.

При исследовании КЖ *P. aureofaciens* на наличие веществ, обуславливающих фунгицидный эффект, на 3-е сутки ее хранения был обнаружен антибиотик феназинового ряда - 2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота (Rf 30). С увеличением срока хранения КЖ дополнительно обнаружена феназин-1-карбоновая кислота (5-е сутки). На 10-е сутки хранения выявлен только 2-гидроксифеназин, а на 14-е сутки - все три вида антибиотических веществ (таблица 2).

Таблица 2.

Хроматографическая подвижность феназиновых веществ.

Время хранения БС, сутки	Rf x 100	Структура
3	30	2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота
5	15	Феназин-1-карбоновая кислота
	30	2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота
10	51	2-гидроксифеназин
14	14	Феназин-1-карбоновая кислота
	28	2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота
	46	2-гидроксифеназин

Согласно литературным данным основное место в проявлении антагонизма псевдомонад отводится гидролитическим ферментам, в частности протеазам и хитиназам (Naas D. et al., 2005; Логинов О.Н., 2005; Dag Y.W. et al., 2007), поэтому в следующем эксперименте исследовали хитино- и протеолитические свойства отцентрифугированной КЖ. При поверхностном культивировании исследуемой суспензии на средах с хитином и казеином уже на ранних стадиях были отмечены зоны гидролиза, свидетельствующие о наличии гидролитических свойств внеклеточных ферментов, как на ранних, так и на более поздних сроках хранения КЖ.

Таким образом, КЖ *P. aureofaciens* проявляет выраженный фунгицидный эффект против широкого спектра фитопатогенных грибов. Данное свойство сохраняется в отцентрифугированной КЖ и проявляется в виде литического действия грибного мицелия. При сравнении антагонистических свойств КЖ *P. aureofaciens* с коммерческими препаратами «Фосфатовит» и «Азотовит» показан аналогичный по степени воздействия эффект, не уступающий первому и превышающий второй. Установлено, что фунгицидное действие культуральной жидкости обуславливается наличием в ней веществ антибиотической природы - 2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота, 2-гидроксифеназин, феназин-1-карбоновая кислота, а также протеолитическими и хитинолитическими свойствами бактерии.

6. Оценка ростостимулирующего действия бактериальной суспензии в лабораторных и полевых условиях

Из литературных данных известно, что бактерии рода *Pseudomonas* обладают как фунгицидным, так и ростостимулирующим эффектом. На синтез веществ, обладающих данными свойствами, огромное влияние оказывает состав питательных сред (Кравченко Л. В. с соавт., 2003). Важным условием нормального развития семян является оптимальная концентрация физиологически активных веществ в окружающей среде, которые могут оказывать положительное воздействие. При изучении оптимальной степени разведения КЖ показано, что при соотношении биопрепарат : вода - 1 : 100 значения энергии прорастания и всхожести были максимальны и

составили выше контрольных в среднем для пшеницы на 12 и 11 %, а для ячменя на 17 и 12 % соответственно (таблица 3). Снижение и увеличение концентрации клеток бактерии привело к понижению исследуемых значений, что может быть обусловлено в первом случае слабым, а во втором – токсичным действием микробных метаболитов.

Таблица 3.

Ростовые параметры семян при различных вариантах обработки, %.

Ростовые параметры	КЖ бактерии : вода				КЖ	вода
	1:50	1:100	1:200	1:500		
Пшеница						
Энергия прорастания	91	98	93	86	91	80
Всхожесть	90	97	94	89	89	75
Ячмень						
Энергия прорастания	93	99	90	88	89	81
Всхожесть	89	97	94	81	92	78

В фазу всхожести можно отметить, что в опытных вариантах растения обладали более развитой листовой пластиной, так у пшеницы длина листа превысила контроль на 40 ± 5 мм. На основании полученных данных для дальнейших исследований нами был выбран вариант разведения 1:100, вероятно, в таком соотношении достигается оптимальная концентрация физиологически активных веществ, положительно влияющих на развитие зародыша семени.

Для определения конкурентоспособности полученной БС проводилось сравнение ее ростостимулирующего эффекта с микробиологическими препаратами «Фосфатовит» и «Азотовит» на примере семян пшеницы сорта «Тулайковская 10». Использовали следующие варианты обработки:

- Контроль (вода);
- КЖ *P. aureofaciens* (титр $10^7 - 10^8$ КОЕ/мл);
- «Фосфатовит» (титр 10^6 КОЕ/мл);
- «Азотовит» (титр 10^7 КОЕ/мл);
- «Фосфатовит»: «Азотовит» - 1:1.

Все суспензии разбавляли водопроводной водой в соотношении 1 : 100. Действие КЖ псевдомонад было сопоставимо с влиянием исследуемых биопрепаратов (БП). Однако высота листовой пластины при обработке семян БС *P. aureofaciens* была в среднем на 31 ± 4 мм выше относительно других. Таким образом, показано, что полученный биопрепарат на основе исследуемого штамма *P. aureofaciens* по своему биологическому действию не уступает коммерческим микробиологическим препаратам.

Для лучшего закрепления бактерий на поверхности семян используют различные клеящие вещества, например, полисахариды, 2 - 2,5 % раствор натрия карбоксиметилцеллюлозы, микрокристаллической целлюлозы, 7 – 12 % раствор жидкого концентрата сульфатно-спиртовой барды, снятое молоко (обрат), которое применяют без разбавления, 1 - 1,5 % раствор патоки (Рубан И.Н. с соавт., 2005; Чекалова К.В., 2007; Патент РФ № 2277315, 2006). Наиболее перспективны полисахариды, т.к. обволакивая семена, они создают оптимальное микроокружение для развития микроорганизмов (Патент РФ 2421967, 2011). В следующей серии опытов оптимизировали условия обработки семян БС с использованием различных полисахаридов микробного и растительного происхождения (ксантан, декстран, крахмал), варьируя их концентрацию (0,05 и 0,1 %). Контролем служили семена, замоченные в водопроводной воде.

Использование полисахаридов оказало положительное влияние на развитие семян, возможно, за счет удержания дополнительной влаги и бактериальных клеток на поверхности зерна

образующейся полисахаридной оболочкой. Максимальная энергия прорастания была отмечена при использовании 0,1 % раствора декстрана или крахмала (94 и 91 % соответственно). Аналогичная тенденция отмечена и при исследовании всхожести семян (увеличение показателя в среднем на 12,5 % по сравнению с контролем).

Важным условием биообработки является сохранение жизнеспособности бактериальных клеток на поверхности посевного материала в процессе его хранения. Показано, что титр клеток на поверхности семян, обработанных раствором КЖ *P. aureofaciens* с использованием 0,1 % раствора крахмала в 1-е сутки хранения составил $1,6 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, на 7-е сутки - $4,1 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, на 14-е сутки - $1,5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, что свидетельствует о высокой жизнеспособности бактерии в данных условиях. Это обусловлено высокой степенью адгезии клеток и созданием оптимальных условий для их развития в присутствии полисахарида.

Глубинное культивирование *A. solani* и *F. culmorum* в присутствии биообработанных семян показало сохранение фунгицидного эффекта бактерии, проявляющееся в лизисе грибного мицелия на множественных участках гиф и в отсутствии спорообразования.

Таким образом, оптимальным вариантом для обработки семян пшеницы и ячменя явилось соотношение КЖ *P. aureofaciens* : вода – 1 : 100. Использование в качестве прилипателя 0,1 % раствора крахмала позволило повысить значения ростовых параметров семян и их устойчивость к заражению фитопатогенами за счет максимального удержания бактериальных клеток на поверхности посевного материала.

Для подтверждения результатов, полученных в лабораторных условиях, в следующей серии опытов проводили изучение влияния обработки БС *P. aureofaciens* на развитие злаковых культур: пшеницы яровой, ячменя, овса в условиях открытого грунта.

О ростостимулирующем действии БС судили по изменению интегральных процессов роста и продуктивности злаковых растений. На рисунке 6 представлены количественные показатели ростовых параметров корней растений в фазе выхода в трубку.

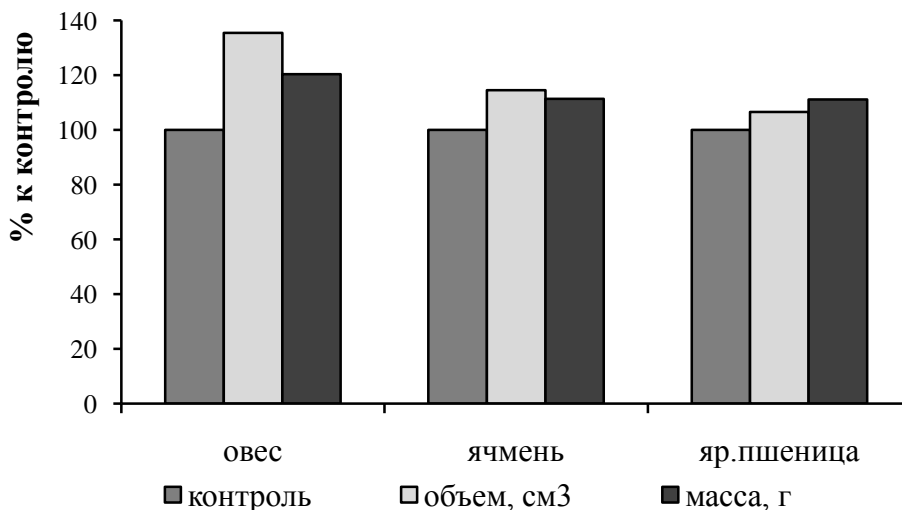


Рисунок 6. Ростовые показатели корневой системы растений после предпосевной обработки семян БС *P. aureofaciens*.

У всех изучаемых видов растений предпосевная обработка семян БС обеспечила увеличение объема корневой системы по сравнению с необработанными на 35 % у овса, на 14 % - ячменя и 7 % - яровой пшеницы. Масса корней увеличивалась по сравнению с контрольными вариантами на 20 % у растений овса и в равной степени – на 11 % - у ячменя и яровой пшеницы. Следует отметить, что во всех опытных вариантах отмечена более развитая корневая система с большим количеством придаточных корней, особенно у растений овса и яровой пшеницы. При исследовании микрофлоры корневой системы опытных партий злаков развитие грибного мицелия отсутствовало или происходило незначительно, наблюдалось преобладание грамотрицательных бактерий. Таким образом, предпосевная обработка семян злаков БС *P. aureofaciens* способствует оздоровлению микрофлоры ризосферной зоны растений и подавлению роста фитопатогенов.

На основании проведенного исследования в хозяйстве ОАО «Племенной завод «Александровский» был получен акт, подтверждающий эффективность действия БС *P. aureofaciens* на урожайность растений ячменя в условиях открытого грунта. Согласно которому урожайность опытного участка превосходила контроль на 3 ц/га (приложение 3).

Важным показателем роста злаковых культур является чистая продуктивность фотосинтеза (ЧПФ). Данный показатель определяли в фазы выхода в трубку, начало стеблевания и колошения. У опытных растений овса значения ЧПФ превысили контрольные в среднем на 19 % (таблица 4).

Таблица 4.

Показатели чистой продуктивности фотосинтеза у злаковых растений после предпосевной обработки семян культуральной жидкостью *P. aureofaciens*.

Фаза развития растения	Овес		Ячмень		Яр.пшеница	
	г·сутки/см ²	% к контролю	г·сутки/см ²	% к контролю	г·сутки/см ²	% к контролю
Ф. начало выхода в трубку	<u>1,97±0,10</u> 1,65±0,08	19,4	<u>4,81±0,24</u> 4,56±0,23	5,5	<u>4,31±0,22</u> 4,20±0,21	2,6
Ф. начало стеблевания	<u>3,01±0,15</u> 2,53±0,13	19,0	<u>4,96±0,25</u> 4,68±0,23	6,0	<u>5,62±0,28</u> 5,51±0,28	2,0
Ф. колошения	<u>3,31±0,17</u> 3,04±0,15	8,8	<u>5,73±0,29</u> 5,21±0,26	10,0	<u>6,10±0,31</u> 5,84±0,29	4,5

Примечание. Над чертой значения опытного варианта (обработка *P. aureofaciens*); под чертой – контрольного (без обработки).

По мере развития растений продуктивность фотосинтеза снижалась, но в процессе исследуемого периода была выше контроля на 9 %. Возможно, в этот период происходит перераспределение питательных веществ в связи с наступлением процессов гаметогенеза. У растений ячменя на более ранних этапах развития ЧПФ увеличивалась по сравнению с контрольным вариантом в среднем на 6 %, в фазе колошения фотосинтетическая продуктивность продолжала расти (прирост по сравнению с контролем составил 10 %). ЧПФ яровой пшеницы увеличивалась в меньшей степени, чем у выше описанных культур. По сравнению с контролем значения были выше на 2-3 % в период начала стеблевания и на 4,5 % в фазе колошения.

С каждой учетной делянки также определяли биологическую урожайность по массе 1000 семян (фаза восковой спелости). Предпосевная обработка семян КЖ *P. aureofaciens* способствовала увеличению показателя у всех изучаемых зерновых культур относительно контроля на: 9 % - у овса, 23 % - ячменя и 6 % - яровой пшеницы (рисунок 7).

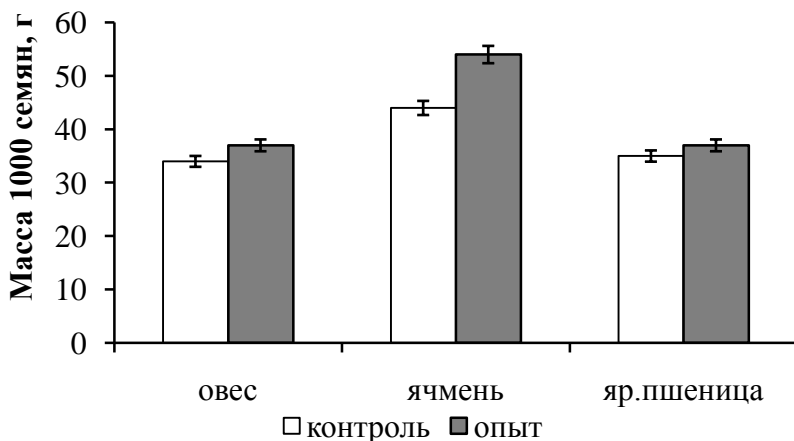


Рисунок 7. Биологическая урожайность растений после предпосевной обработки семян КЖ *P. aureofaciens*.

Несмотря на то, что самые высокие показатели прироста объема и массы корневой системы были зафиксированы у растений овса, максимальная биологическая урожайность отмечены у растений ячменя. Предположительно в этом случае существует определенная корреляция между массой семян и чистой продуктивностью фотосинтеза, которая продолжала увеличиваться у этого вида растений по мере их развития. Максимальный стимулирующий эффект КЖ был обнаружен в отношении прироста корневой системы, и особенно у растений овса. У этого же вида под влиянием изучаемой бактериальной суспензии отметили самую высокую фотосинтетическую продуктивность в более ранние периоды развития. У ячменя и яровой пшеницы по мере развития растений эффективность биопрепарата в отношении ЧПФ продолжала увеличиваться.

При исследовании биопрепаратов необходимо изучение механизмов их действия и выявление условий максимального синтеза активных веществ. Одними из важных метаболитов, обеспечивающих ростостимулирующее действие, являются фитогормоны, в частности, индолил-3-уксусная кислота (ИУК) (Мордухова Е. А. с соавт., 1991; 1998; Олюнина Л.Н., Шабает В.П., 1996; Pedraza R. et al., 2004; Joseph B. et al., 2007; Моргун В.В. с соавт., 2009). В работе исследовали наличие ИУК в процессе хранения КЖ *P. aureofaciens*. В течение 28 суток наблюдаются существенные изменения уровня ИУК (рисунок 8).

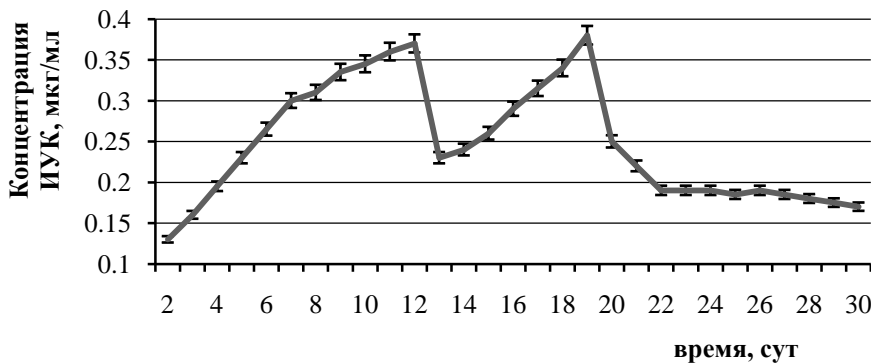


Рисунок 8. Динамика содержания ИУК в процессе хранения КЖ *P. aureofaciens*.

Кривая динамики накопления фитогормона характеризовалась наличием двух пиков. Первый максимум отмечен на 12-е сутки хранения КЖ, второй - на 19-е сутки ($0,38 \pm 0,09$ мкг/мл). Оба максимума имели равные значения и были непродолжительными во времени. Определение титра в культуральной жидкости на данный период показал наличие большого количества клеток (10^9 КОЕ/мл). При увеличении сроков хранения наблюдалось снижение концентрации ИУК в среднем на 54 %. С 22-х по 30-е сутки хранения КЖ уровень ИУК оставался на постоянном уровне. Образование двух пиков может быть связано с некоторым отмиранием культуры к 12-м суткам, разложению внутри- и внеклеточных белковых веществ до предшественника ИУК - триптофана и последующим его превращением в фитогормон.

Таким образом, показан выраженный ростостимулирующий эффект БС *P. aureofaciens* на семена злаковых культур в лабораторных и полевых условиях, действие которой увеличивается при использовании 0,1 % растворов декстрана или крахмала в качестве прилипателя. Положительное действие на развитие растений связано с синтезом фитогормона – ИУК, уровень которого в процессе хранения суспензии имеет два максимальных пика.

Предложение производству и практические рекомендации

На основании полученных данных оптимизированы условия получения биопрепарата в виде концентрата культуральной жидкости методом глубинного культивирования на оптимизированной меласной среде. С помощью дозаторов компоненты сред поступают в биореакторы для инокулята и БП. Полученные среды доводятся слабыми растворами кислоты или щелочи до значения рН $7,0 \pm 0,2$. Подготовленные для культивирования среды стерилизуют острым паром из парогенератора, затем в рубашку ферментеров подается холодная вода для охлаждения. Оба ферментера снабжены мешалкой и рубашкой для поддержания постоянной

температуры ферментации 28 ± 2 °С. В биореактор для инокулята стерильно вносится посевной материал, культивирование продолжается в течение 19 - 24 ч, режим работы мешалки 180 мин^{-1} . Полученный инокулят стерильно по трубопроводу передается в биореактор для БП из расчета 10 % от объема засеваемой среды. Все условия культивирования те же, что и для получения инокулята. После достижения стационарной фазы роста в лабораторных условиях определяют титр полученного препарата, который должен составлять не менее 10^8 КОЕ/мл. Если показатель соответствует требованию, то КЖ выводится из нижней части ферментера и поступает в емкость для ее сбора. Затем БП поступает на линию упаковки в емкости объемом 50 – 1000 мл. Упакованный препарат хранится в сухом темном помещении при температуре 4 ± 2 °С.

Расчет текущих затрат для получения готового биопрепарата позволяет установить, что его стоимость будет примерно в 2 - 3 раза ниже рыночной цены аналогов, так как для получения 1000 л биопрепарата потребуется около 43693,81 руб, то есть себестоимость 1 л концентрата составит около 44 руб.

С целью эффективной биозащиты растений и сохранения экологической обстановки окружающей среды полученный биопрепарат рекомендуется использовать для предпосевной обработки семян злаковых культур. Для этого необходимо приготовить рабочий раствор препарата, т.е. разбавить водопроводной водой с температурой 27 – 30 °С в соотношении 1 : 100. Рекомендуем в полученную суспензию дополнительно вносить крахмал в количестве 0,1 %. Норма расхода 100 мл рабочего раствора на 1 га.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что отселекционированный штамм бактерии *Pseudomonas aureofaciens* обладает свойствами, характерными для данного рода и вида. Максимальные выход биомассы ($10,7 \pm 0,7$ г/л) и титр активных клеток (10^{11} КОЕ/мл) и уровень внеклеточного белка (255 ± 7 мкг/мл) наблюдается на среде с пептоном и глюкозой. На среде Кинг В образует желто-коричневый пигмент, флуоресцирующий при облучении ультрафиолетовым светом. Оптимальной температурой роста является диапазон от 25 до 30 °С, значения pH 6,0 - 7,0. *Pseudomonas aureofaciens* способна гидролизовать желатину и молочный казеин, не использует в качестве единственного источника углерода и энергии крахмал. Растет на средах с 1; 2 и 3 % концентрациями NaCl.

2. Установлено, что исследуемая бактерия активно развивается на среде, основным компонентом которой является меласса. Оптимизированы состав меласной среды (меласса – 40 г/л; NaNO₃ – 2 г/л; KН₂PO₄ – 2,5 г/л) и условия культивирования (частота оборотов мешалки 180 мин⁻¹) исследуемой бактерии, обеспечивающие максимальный прирост микробной массы ($15,36 \pm 1,4$ г/л) и высокий титр ($2,5 \cdot 10^{11}$ КОЕ/мл) в лабораторных и полупромышленных условиях.

3. Выявлено фунгицидное действие бактерии, бактериальной суспензии и центрифугата КЖ на развитие фитопатогенов *Fusarium culmorum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Alternaria solani*, *Alternaria tenuissima*, *Pythium oligandrum* и *Tilletia tritici*. Выявлено наличие ингибирующего эффекта, степень которого зависит от вида гриба. Проявление антагонистического воздействия обусловлено наличием антибиотиков феназинового ряда (2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота, 2-гидроксифеназин, феназин-1-карбоновая кислота), а также хитино- и протеолитическими свойствами бактериальной суспензии, усиливающимися в процессе ее хранения. Состав антибиотических веществ при хранении культуральной жидкости подвержен изменению, что возможно обусловлено их взаимопревращением.

4. Показан ростостимулирующий эффект бактериальной суспензии *Pseudomonas aureofaciens* с использованием полисахаридов при обработке семян пшеницы и ячменя в лабораторных условиях. Оптимальным вариантом явилось использование в качестве прилипателя 0,1 % раствора декстрана или крахмала. При этом в течение 14 суток хранения посевного материала сохранялась высокая жизнеспособность бактерии на поверхности семян и их устойчивость к заражению фитопатогенами. Исследуемая бактериальная суспензия по фунгицидному и ростостимулирующему эффектам не уступала действию микробиологических препаратов «Фосфатовит» и «Азотовит».

5. Изучено влияние предпосевной обработки семян биопрепаратом на ростовые параметры ряда злаковых культур в условиях открытого грунта. Показано, что опытные растения имели более высокие показатели чистой продуктивности фотосинтеза ($1,97 - 6,10$ г/м² в зависимости от вида и фазы роста культуры), более развитую, мощную корневую систему и высокую биологическую урожайность (масса 1000 семян 37 - 54 г в зависимости от вида культуры). Ростостимулирующее действие культуральной жидкости обусловлено синтезом фитогормона – индолил-3-уксусной кислоты, максимальное содержание которой отмечено на 12-е и 19-е сутки хранения суспензии ($0,38 \pm 0,09$ мкг/мл).

6. Оптимизированы технологические режимы получения биопрепарата для защиты растений на основе нового штамма *Pseudomonas aureofaciens*. Использование мелассы в качестве основного субстрата для культивирования бактерии позволяет снизить себестоимость полученного концентрата в 2-3 раза по сравнению с коммерческими препаратами.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
(*В журналах рекомендованных ВАК)**

1*. **Бурова Ю. А.** Использование полисахаридов при обработке семян пшеницы биопрепаратом / **Ю. А. Бурова**, С. А. Ибрагимова, В. В. Ревин // Вестник Уральской академической науки. Тематический выпуск по микробиологии, иммунологии и биотехнологии. – Екатеринбург, 2011. – № 4/1 (38). – С. 93.

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

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

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

5. **Бурова Ю. А.** Изучение антифунгальных свойств *Pseudomonas aureofaciens* на среде с хитином / **Ю. А. Бурова**, М. А. Нешина, С. А. Ибрагимова // Международный научно-практический рецензируемый журнал «Имунопатология, аллергология, инфектология», №1. – Москва, 2010. – 217–218 с.

6. **Бурова Ю. А.** Использование бактерий *Pseudomonas aureofaciens* для защиты растений от возбудителей заболеваний / **Ю. А. Бурова**, С. А. Ибрагимова, В. В. Ревин // Московская международная научно-практическая конференция Биотехнология: экология крупных городов.– Москва, 2010. – С. 509.

7. Обработка томатов биопрепаратом на основе *Pseudomonas aureofaciens* / **Ю. А. Бурова**, А. А. Лукаткин, С. А. Ибрагимова [и др.] // Всеросс. конф. «Проблемы и перспективы изучения естественных и антропогенных экосистем Урала и прилегающих регионов». – Стерлитамак, 2010. – 191–193 с.

8. **Бурова Ю. А.** Обработка семян ячменя биопрепаратом с использованием полисахаридов / **Ю. А. Бурова**, А. С. Седойкина, С. А. Ибрагимова // Межд. научная конференция «Биотехнология начала III тысячелетия». – Саранск, 2010. – 61–62 с.

9. Подбор оптимальной концентрации ксантана при обработке семян пшеницы биопрепаратом / С. А. Ибрагимова, А. С. Седойкина, **Ю. А. Бурова** [и др.] // Межд. научная конференция «Биотехнология начала III тысячелетия». – Саранск, 2010. – 62–63 с.

10. Влияние концентрации биопрепарата на рост фитопатогенных грибов при совместном культивировании / А. А. Лукаткин, С. Н. Калинкина, **Ю. А. Бурова** [и др.] // Межд. научная конференция «Биотехнология начала III тысячелетия». – Саранск, 2010. – 63–64 с.

11. Исследование микопаразитических свойств *Pseudomonas aureofaciens* 2006 в процессе хранения / **Ю. А. Бурова**, М. А. Нешина, А. А. Лукаткин [и др.] // Материалы научной конференции “XXXVIII Огаревские чтения”: в 3 ч. Ч.2: Естественные науки. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2010. – С. 4–5.

12. Влияние условий хранения культуральной жидкости на жизнедеятельность бактерий *Pseudomonas aureofaciens* 2006 / И. Ю. Астахова, **Ю. А. Бурова**, А. А. Лукаткин [и др.] // Материалы научной конференции “XXXVIII Огаревские чтения”: в 3 ч. Ч.2: Естественные науки. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2010. – С. 6–7.

13. Лукаткин А. А. Получение биопрепарата на основе бактерий *Pseudomonas aureofaciens* 2006 / А. А. Лукаткин, **Ю. А. Бурова**, С. А. Ибрагимова [и др.] // Всеросс. конф. «Биологическая защита растений - основа стабилизации агроэкосистем». - Краснодар, 2010. – С. 415–417.

14. Лукаткин А. А. Влияние сроков хранения биопрепарата на количество живых клеток бактерий / А. А. Лукаткин, **Ю. А. Бурова**, С. А. Ибрагимова // 14-я Пушинская междунар. школа-

конф. молод. ученых «Биология – наука XXI века». Пушкино, 19-23 апреля, 2010 г. – Пушкино, 2010. – С. 267.

15. Влияние *Pseudomonas aureofaciens* на всхожесть семян культурных растений / **Ю. А. Бурова**, А. А. Лукаткин, А. С. Седойкина [и др.] // III Всерос. с междунар. участием конгресс студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010», Нижний Новгород, 2010. – С. 47.

16. Лукаткин А. А. Влияние бактерий *Pseudomonas aureofaciens* 2006 на энергию прорастания и всхожесть семян томата / А. А. Лукаткин, **Ю. А. Бурова**, С. А. Ибрагимова // Межрегион. науч. конф. «Третьи чтения памяти профессора О.А. Зауралова», Саранск, 13 мая 2011 г. – Саранск, 2011. – С. 58–60.

17. Использование крахмала при обработке семян пшеницы биопрепаратом / **Ю. А. Бурова**, Т. М. Бабакина, А. С. Захаркина [и др.] // Сборник трудов биологического факультета МГУ им. Н.П. Огарева – Саранск: Типография ООО «Мордовия-Экспо», 2011. – С. 22–24.

18. **Бурова Ю. А.** Влияние различных источников азотного и углеродного питания на динамику накопления внеклеточного белка бактериями *Pseudomonas aureofaciens* 2006 / **Ю. А. Бурова**, С. А. Ибрагимова, В. В. Ревин // Науч. конф. «XXXIX Огаревские чтения»: в 3 ч. Ч.2: Естественные науки. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2011. – С. 86–87.

19. **Бурова Ю. А.** Антифунгальные свойства бактерии *Pseudomonas aureofaciens* 2006 / **Ю. А. Бурова**, А. С. Захаркина, В. В. Ревин // Материалы междунар. молодежного науч. форума «Ломоносов-2012». [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс, 2012. – С. 167.

20. **Бурова Ю. А.** Влияние различных источников углерода на развитие бактерии *Pseudomonas aureofaciens* 2006 / **Ю. А. Бурова**, Т. М. Бабакина // Достижения и перспективы развития биотехнологии: Материалы междунар. науч. конф. (Саранск, МГУ им. Н.П. Огарева, 3–5 октября 2012 г.) – Саранск: Типография ООО «Мордовия – Экспо», 2012. – С. 45–46.

21. **Бурова Ю. А.** Влияние сроков хранения бактериальной суспензии *Pseudomonas aureofaciens* на ростостимулирующие свойства / **Ю. А. Бурова**, Т. М. Бабакина, С. А. Ибрагимова // Достижения и перспективы развития биотехнологии: Материалы междунар. науч. конф. (Саранск, МГУ им. Н.П. Огарева, 3–5 октября 2012 г.) – Саранск: Типография ООО «Мордовия – Экспо», 2012. – С.46–47.

22. Развитие фитопатогенных грибов при совместном культивировании с *Pseudomonas aureofaciens* 2006 / **Ю. А. Бурова**, А. С. Захаркина, Д. С. Королёв [и др.] // Материалы VIII Международной конференции «Проблемы лесной фитопатологии и микологии»/ Под редакцией В.Г.Стороженко, Б.П. Чуракова. – Ульяновск: УлГУ, 2012. – С. 120–124.

23. Развитие *Fusarium culmorum* и *Ustilago tritici* при культивировании с *Pseudomonas aureofaciens* / **Ю. А. Бурова**, А. С. Захаркина, Д. С. Королев [и др.] // Современная микология в России. Том 3. Материалы 3-го Съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии, 2012. – С. 271.

24. Колмыкова Т. С. Действие бактериальной суспензии *Pseudomonas aureofaciens* на рост злаковых культур в полевых условиях / Т. С. Колмыкова, С. А. Ибрагимова, **Ю. А. Бурова** // Материалы междунар. научн. конф. «Регионы в условиях неустойчивого развития»: в 2 т. – Т. 1. – Кострома: КГУ им. Н.А. Некрасова, 2012. – С. 163–167.