

Факультет физико-  
математических и естественных наук

Кафедра "Общая биология и  
биохимия"

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Физиология растений

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

**«КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА PGPR-БАКТЕРИЙ»**

Студент




Пыхтунова Ксения Юрьевна

Научный руководитель



Заплатин Б. П.

Нормоконтролёр



Солдатов С.А.

Рецензент



Карпова Л.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 3.06.17 № 13 )


Заведующий кафедрой



Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 21.06.17 № 3 )

Секретарь ГЭК



Солдатов С.А.

Пенза, 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	6
1.1 Культивирование микроорганизмов как важнейший метод исследований в микробиологии.....	6
1.2 Рост и развитие популяции микроорганизмов.....	14
1.3 Промышленное культивирование микроорганизмов.....	27
1.4 Особенности культивирования PGPR-бактерий.....	28
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	43
2.1 Характеристика материалов и объектов исследования .....	43
2.1.1 Оборудование .....	43
2.1.2 <i>Bacillus subtilis</i> .....	44
2.1.3 Картофельная палочка.....	51
2.1.4 Микровицеты р. <i>Fusarium</i> .....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	60
3.1 Изучение культурально-морфологических свойств <i>Bacillus subtilis</i> , штамм ИПМ 215 и штамм М-22 ВИЗР .....	60
3.2 Влияние факторов внешней среды на культивирование <i>Bacillus subtilis</i> .....	61
3.3 Изучение биологической активности штаммов <i>Bacillus subtilis</i> .....	64
ВЫВОДЫ .....	68
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	70

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В настоящее время в целях повышения продуктивности сельскохозяйственных растений большое внимание уделяется использованию биопрепаратов, изготовленных на основе ассоциативных азотфиксирующих штаммов бактерий. Применение их, как показывают многочисленные исследования позволяет усилить ростовые процессы, улучшить минеральное питание растений, особенно азотом, защитить их от патогенов и снизить химическую нагрузку на окружающую среду и уменьшить действие стрессовых условий.

Все изученные к настоящему времени механизмы положительного влияния псевдомонад на растения можно условно разделить на два типа:

1) прямая или непосредственная стимуляция роста растений за счет синтеза различных метаболитов, полезных для растений;

2) опосредованная стимуляция роста растений за счет вытеснения и подавления развития почвенных фитопатогенов или микроорганизмов, угнетающих рост растений. К первому типу, прежде всего, можно отнести способность PGPR *Pseudomonas* синтезировать регуляторы роста растений и улучшать фосфорное питание растений. Кроме того, некоторые штаммы псевдомонад способны к фиксации атмосферного азота и индукции у растений устойчивости к фитопатогенам.

Уже в настоящее время возможно эффективное использование штаммов PGPR *Pseudomonas*, правильно подобранных к конкретным условиям определенного хозяйства в качестве биологических средств защиты растений, являющихся дополнением, а иногда и альтернативой химическим средствам. Активно ведущиеся исследования в этом направлении и разрабатываемые новые технологии существенно повысят эффективность этих биопрепаратов.

Для роста бактерий, кроме состава питательной среды, имеют значение кислотность среды, аэрация, температура, свет и влажность. Большин-

ство бактерий растет при pH 6,8-8,0, т. е. в нейтральной среде. Поддержание нейтрального значения pH, особенно важно для кислотопродуцирующих бактерий. В процессе промышленного культивирования бактерий в больших объемах pH среды регулируется автоматически добавлением растворов бикарбоната натрия или щелочей. Газовый состав среды также важен для бактерий.

Значительная часть из них нуждается в постоянном притоке молекулярного кислорода. Такие микроорганизмы объединены в группу облигатных аэробов. Меньшая часть бактерий - облигатные анаэробы - способны развиваться только в отсутствии кислорода.

Использование в практике сельского хозяйства биологических препаратов, созданных на основе азотфиксирующих микроорганизмов и ризобактерий, стимулирующих рост растений (plant growth-promoting rhizobacteria — PGPR-бактерий), является одним из технологических приемов, способствующих повышению урожая культурных растений и накоплению в почве биологического азота. Перспективны также двух-, трех- и четырехкомпонентные микробные препараты, включающие клубеньковые бактерии, ризобактерии, микоризные грибы и биологически активные вещества.

PGPR-бактерии характеризуются рядом положительных (прямых и опосредованных) эффектов действия на растения, среди которых определяющими являются способность к фиксации молекулярного азота атмосферы, синтез веществ гормональной природы, а именно, ауксиновой, гиббереллиновой, цитокининовой, витаминов, веществ антибиотической и антифунгальной природы, способность к мобилизации труднорастворимых фосфатов почвы и разложению вредных химических соединений.

Многие микроорганизмы, ассоциированные с растениями, способны синтезировать вещества фитогормональной природы, необходимые им как для собственного развития, так и для установления связей с растениями и

другими почвенными микроорганизмами. Образование гормонов одно из важных свойств ризосферных, эпифитных и симбиотических бактерий, стимулирующих рост растений .

Таким образом, грамотное применение бактериальных препаратов на основе ростстимулирующих ризобактерий как элемента экологического земледелия в технологиях выращивания различных сельскохозяйственных культур позволяет существенно снизить химическую нагрузку на экосистемы вследствие уменьшения количеств применяемых минеральных удобрений и химических средств защиты растений, приводит к повышению урожайности и улучшению качества экологически чистой сельскохозяйственной продукции.

Объектом исследования являются - PGPR-бактерии.

Предметом исследования являются культуральные свойства и активность PGPR-бактерий.

Цель исследования – изучение влияния условий культивирования на активность PGPR бактерий.

Для достижения поставленной цели, необходимо решить следующие задачи:

- Изучить и проанализировать и литературные данные по теме;
- Определение культивационной активности бактерий в коммерческих препаратах
- Культивирование бактерий в различных условиях (температуры, среды, длительность культивирования);
- Подбор оптимальных условий культивирования.

Данная работа включает введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследования, изложение результатов экспериментов и их обсуждение, выводы и список упоминаемых в тексте литературных источников.

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 Культивирование микроорганизмов как важнейший метод исследований в микробиологии.**

#### **История метода**

Культивирование микроорганизмов - это один из основных приемов в микробиологии. Для роста и развития микроорганизмов в природе и в лабораторных условиях необходимо наличие питательных веществ для энергетических и конструктивных реакций. Требования разных групп микроорганизмов к источникам энергии и химическим элементам определяются их метаболическими возможностями. Выращивание и поддержание микробных культур в лаборатории основано на моделировании естественных условий обитания данного организма в лаборатории, а также на знании особенностей обмена веществ. Культивирование является основной стадией технологического процесса и во многом определяет количественные и качественные характеристики производства биопрепаратов. На стадии культивирования осуществляется накопление как самой биомассы, так и продуктов метаболизма (жизнедеятельности) микроорганизмов. Началом исследований по культивированию микроорганизмов является 1830 год, когда Каньяр де Латур, Кютцинг и Шван установили, что во многих бродительных процессах «повинны» рост и размножение дрожжей и других микроорганизмов. Либих и многие другие химики были противниками такого мнения, что затормозило эти исследования на 20 лет. В 1850 году Луи Пастер, исследуя физиологию дрожжей и бактерий, ввел асептические методы исследований и на минимальных питательных средах доказал, что спиртово-, молочно-, уксусно- и маслянокислые брожения вызываются различными микроорганизмами, обладающими различными потребностями в питательных веществах и кислороде. Первая наиболее полноценная среда была приготовлена учеником Л. Пастера Ролэном в 1869 году для

грибов рода *Aspergillus*. Хотя в распоряжении Л. Пастера не было метода чистых культур, но ему с учениками удалось, пользуясь элективными средами, доказать потребность микроорганизмов в главных и второстепенных компонентах среды и в источниках энергии. В 1870 году Р. Кох ввел в практическую микробиологию метод чистых культур, гарантировавших получение на предложенных им плотных питательных средах чистых культур только определенных видов бактерий роста дрожжей. На первых этапах микробиологических исследований культивирование микроорганизмов осуществляли в пробирках или колбах путем выращивания их на поверхности плотных или жидких сред [7].

### **Понятия культивирования используемые в современной микробиологии**

Популяция (от лат. *populatio* - население) - это совокупность организмов одного вида, длительное время обитающих на одной территории (занимающих определенный ареал) и частично или полностью изолированных от особей других таких же групп. Этот термин используется в разделах биологии, экологии, демографии, медицине и психометрике.

Чистая культура ( или аксеничная культура ) - совокупность микроорганизмов одного вида, имеющие одинаковые морфологические и биохимические свойства , а также одинаковые свойства их культур [1].

Элективной ( накопительной) культурой называют такую культуру в которой из большого числа форм, имеющих в посевном материале, растет преимущественно один вид.

Штамм- это чистая культура вирусов, бактерий и других микроорганизмов или культура клеток, изолированная в определённое время и в определенном месте. Поскольку многие микроорганизмы размножаются бинарным делением(простое деление клетки, свойственное бактериям) или митозом (эукариотические микроорганизмы, такие, как грибы и водоросли), без участия полового процесса, по существу, виды таких микроорга-

низмов состоят из клональных линий, генетически и морфологически идентичных исходной клетки. Штамм не является таксономической категорией, наинизшим таксоном у всех микроорганизмов является вид, один и тот же штамм не может быть выделен второй раз из того же источника в другое время [38].

Культуральный метод исследования.

Культуральный метод исследования представляет собой выделение из питательной среды бактерий определенного вида путем культивирования, с их последующей видовой идентификацией. Вид бактерий определяется с учетом их строения, культуральных и экологических данных, а также генетических, биохимических и биологических показателей. Выведенные из питательной среды новые виды бактерий, свойства которых еще не определены, называются чистой культурой. После окончательной идентификации их характеристик, бактерии, выведенные из определённого места и в определенное время, получают название штамм. При этом допускается незначительное различие в свойствах, месте или времени выделения штамма одного вида [16].

### **Цели выделения и использования чистых культур.**

Микроорганизмы (за исключением облигатных внутриклеточных паразитов- риккетсий, хламидий, вирусов и простейших) культивируют, как правило, на искусственных питательных средах. В зависимости от пищевых потребностей того или другого вида питательные среды должны содержать соответствующие исходные вещества, необходимые для пластического и энергетического метаболизма. Выделение микроорганизмов из различных материалов и получение их культур широко используется в лабораторной практике для микробиологической диагностики инфекционных заболеваний, в научно-исследовательской работе и в микробиологическом производстве вакцин, антибиотиков и других биологически активных продуктов микробной жизнедеятельности. Условия культи-



вирования также зависят от свойств соответствующих микроорганизмов. Для стимуляции процессов роста и размножения аэробных микробов, а также сокращения сроков их выращивания используют метод глубинного культивирования, который заключается в непрерывном аэрировании и перемешивании питательной среды. [25].

Глубинный метод нашел широкое применение в биотехнологии.

#### Этапы метода

Подготовительные мероприятия- эта стадия включает в себя забор, хранение и транспортировку материала. Также, при необходимости, может проводиться его обработка, в зависимости от свойств изучаемых бактерий. Например, при обследовании материала на туберкулез, для выявления кислото-устойчивых микробактерий используются растворы щелочи или кислоты. Обогащение - данная стадия не является обязательной и проводится в том случае, если количества бактерий в исследуемом материале недостаточно для проведения полноценного исследования. Микроскопия - мазок исследуемого материала окрашивается и изучается под микроскопом - исследуется микрофлора, ее свойства и количество. В дальнейшем из первичного мазка необходимо отдельно выделить все находящиеся в нем микроорганизмы. Создание отдельных колоний - на чашку, со специальной, селективной средой, наносится материал, для этого используют петлю или шпатель. Далее, устанавливают чашку вверх дном, для защиты колоний от конденсата, и хранят в термостате около 20 часов, поддерживая температуру 37°C. Затем изучаются морфологические свойства колоний в средах и их микроскопия. Исследуются чашки и отмечают свойства микроорганизмов, показатели их количества, темпы роста, а также отмечается наиболее подходящая питательная среда. Для изучения лучше всего выбрать колонии, располагающиеся ближе к центру, и если образуется несколько типов чистых культур, то изучить каждую в отдельности. Для изучения морфотипной чистоты культуры используют мазок колонии,

его окрашивают (обычно используется метод по Граму или же любой другой) и тщательно микроскопируют. Накопление чистой культуры- для этого колонии всех морфотипов рассаживают в отдельные пробирки с питательной средой и содержат в термостате при определённой температуре (для большинства микроорганизмов подходящей является температура 37°C, но в некоторых случаях может быть иной). Питательной средой обычно элективна. Она имеет «скошенный» вид в пробирках, где  $\frac{2}{3}$  её части в виде столбика, а  $\frac{1}{3}$ - скошенная поверхность[31]. Уровень роста и чистоты культуры- в общем порядке, выведенная чистая культура имеет однородный рост и при микроскопическом рассмотрении клетки имеют одинаковое морфологическое и тинкториальное строение. Но встречаются некоторые виды бактерий с ярко выраженным плеоморфизмом, при этом, встречаются клетки, имеющие различное морфологическое строение. Если в качестве питательной среды использовалась среда Клиглера, то по изменению цвета столбика и скошенной части определяются биохимические характеристики. Целями метода являются этиологический диагноз, то есть выделение и идентификация чистой культуры бактерий а также определение количества микроорганизмов и их особых характеристик. Например, специфическая реакция на антибиотики и выявление внутриродовых отличий микроорганизмов, на основе их эпидемиологической и генетической составляющей. Это необходимо для определения общности микроорганизмов выделенных в разных местах и разных условиях, что важно для эпидемиологических целей [12].

### **Методы выделения чистой культуры.**

Для того, чтобы выделить чистую культуру микроорганизмов, следует отделить многочисленные бактерии, которые находятся в материале, одна от другой. Это можно достичь с помощью методов, которые основаны на двух принципах - механическом и биологическом разобщении бактерий [19].

## **Методы выделения чистых культур, основанные на механическом принципе.**

Метод последовательных разведений, предложен Л. Пастером, был одним из самых первых, который применялся для механического разъединения микроорганизмов. Он заключается в проведении последовательных серийных разведений материала, который содержит микробов, в стерильной жидкой питательной среде. Этот прием достаточно кропотлив и несовершенный в работе, поскольку не позволяет контролировать количество микробных клеток, которые попадают в пробирки при разведениях.

Этого недостатка не имеет метод Коха (метод пластинчатых разведений). Р. Кох использовал плотные питательные среды на основе желатина или агар-агара. Материал с ассоциациями разных видов бактерий разводился в нескольких пробирках с растопленным и немного охлажденным желатином, содержание которого позже выливалось на стерильные стеклянные пластины. После застудневания среды оно культивировалось при оптимальной температуре. В его толще образовывались изолированные колонии микроорганизмов, которые легко могут быть перенесены на свежую питательную среду с помощью платиновой петли для получения чистой культуры бактерий [7]

Метод Дригальского является более совершенным методом, который широко распространен в повседневной микробиологической практике. Сначала на поверхность среды в чашке Петри пипеткой или петлей наносят исследуемый материал. С помощью металлического или стеклянного шпателя его тщательным образом втирают в среду. Чашку во время посева держат открытой и осторожно вращают, чтобы равномерно распределить материал. Не стерилизуя шпателя, проводят им занаял материалу в другой чашке Петри, при потребности – в третьей. Только после этого шпатель окунают в дезинфицирующий раствор или прожаривают в

пламени горелки. На поверхности среды в первой чашке наблюдаем, как правило, сплошной рост бактерий, во второй- густой рост, а в третьей - рост в виде изолированных колоний [30].

#### Колонии по методу Дригальского

Метод штриховых посевов сегодня используется в микробиологических лабораториях чаще всего. Материал, который содержит микроорганизмы, набирают бактериологической петлей и наносят на поверхность питательной среды возле края чашки. Снимают избыток материала и проводят за ней его параллельными штрихами от края к краю чашки. Спустя сутки инкубации посевов при оптимальной температуре на поверхности чашки вырастают изолированные колонии микробов [34 ].

#### Метод штрихов

Для получения изолированных колоний можно использовать за ней тампоном, которым проводили забор исследуемого материала. Несколько приоткрывают чашку Петри с питательной средой, вносят туда тампон и осторожными движениями втирают материал в поверхность чашки, возвращая постепенно тампон и чашку. Таким образом, существенное преимущество методов пластинчатых разведений Коха, Дригальского и штриховых посевов заключается в том, что они создают изолированные колонии микроорганизмов, которые при инокуляции на другую питательную среду превращаются в чистую культуру [28].

#### **Биологический принцип разъединения бактерий**

Этот метод предусматривает целеустремленный поиск методов, которые учитывают многочисленные особенности микробных клеток. Среди самых распространенных методов можно выделить следующие:

1. По типу дыхания. Все микроорганизмы по типу дыхания разделяются на две основных группы: аэробные (*Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholerae* и тому подобное) и анаэробные (*Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* и др.). Если материал,

из которого следует выделить анаэробные возбудители, предварительно прогреть, а затем культивировать в анаэробных условиях, то вырастут именно эти бактерии [20]

2. По спорообразованию. Известно, что некоторые микробы (бациллы и клостридии) способны к спорообразованию. Среди них *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*. Споры стойкие к действию факторов внешней среды. Следовательно, исследуемый материал может быть подданный действию термического фактора, а затем инокулятивно перенесен в питательную среду. Спустя некоторое время на нем вырастут именно те бактерии, которые способны к спорообразованию.

3. Стойкость микробов к действию кислот и щелочей. Некоторые микробы (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*) в результате особенностей их химического строения стойки к действию кислот. Вот почему материал, который их содержит, например, мокрота при туберкулезе предварительно обрабатывают равным объемом 10% раствора серной кислоты, а затем высевают на питательные среды. Посторонняя флора погибает, а микобактерии в результате их резистентности к кислотам, вырастают. Холерный вибрион (*Vibrio cholerae*), напротив, является галофильной бактерией, потому для создания оптимальных условий роста его высевают на среды, которые содержат щелочь (1% щелочная пептонная вода). Уже через 4-6 часов на поверхности среды появляются характерные признаки роста в виде нежной голубоватой пленки.

4. Подвижность бактерий. Некоторые микробы (*Proteus vulgaris*) имеют тенденцию к ползучему росту и способны быстро распространяться по поверхности кое-что влажной среды. Для выделения таких возбудителей их засевают в капельку конденсационной жидкости, которая образуется при охлаждении столбика скошенного агара. Через 16-18 год

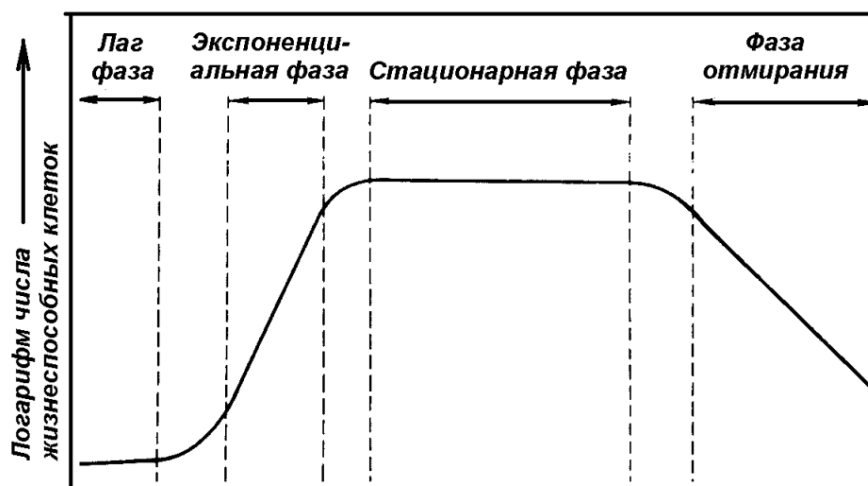
они распространяются на всю поверхность среды. Если взять материал из верхней части агара, будем иметь чистую культуру возбудителей.

5. Чувствительность микробов к действию химических веществ, антибиотиков и других противомикробных средств. В результате особенностей метаболизма бактерий они могут иметь разную чувствительность к некоторым химическим факторам. Известно, что стафилококки, аэробные бациллы, которые образуют споры, стойкие к действию 7,5-10 % хлорида натрия. Вот почему для выделения этих возбудителей используют элективные питательные среды (желточно-солевой агар, маннит-солевой агар), которые содержат именно это вещество. Другие бактерии при такой концентрации хлорида натрия практически не растут.

6. Введение некоторых антибиотиков (нистатин) используется для торможения роста грибов в материале, который сильно загрязнен ими. И, напротив, добавление антибиотика пеницилина к среде способствует росту бактериальной флоры, если нужно выделить грибы. Добавление фуразолидона в определенных концентрациях к питательной среде создает селективные условия для роста коринебактерий и микрококков. [8].

## **1.2 Рост и развитие популяции микроорганизмов.**

У одноклеточных форм понятия «рост» и «развитие» почти равнозначны. Различают сбалансированный рост, когда увеличение всех веществ и структур происходит пропорционально. Если в среде есть нехватка или избыток чего-нибудь, то рост становится несбалансированным, т.е. какие-то продукты метаболизма могут преобладать. Этим приемом пользуются для направленного синтеза необходимых соединений. Из-за малых размеров микроорганизмов их рост оценивают не для индивидуального организма, а для популяции. Графическое отражение процесса называется кривой роста. [13].



*Рис.1.1. Кривая роста бактериальной культуры*

Чтобы правильно оценить рост культуры обычно пользуются такими понятиями, как: а) концентрация клеток в 1 мл; б) время генерации - промежуток времени, за который число клеток удваивается; в) константа скорости деления - число удвоений в час; г) константа скорости роста. Для количественной оценки роста микроорганизмов требуется определение числа клеток в конкретный момент [2].

### **Кривая роста, особенности отдельных фаз.**

При внесении бактерий в питательную среду они обычно растут до тех пор, пока содержание какого-нибудь из необходимых им компонентов среды не достигнет минимума, после чего рост прекращается. Если на протяжении этого времени не добавлять питательных веществ и не удалять конечных продуктов обмена, то получим так называемую периодическую культуру (популяцию клеток в ограниченном жизненном пространстве). Кривая, описывающая зависимость логарифма числа живых клеток от времени, называется кривой роста. Типичная кривая роста имеет S-образную форму и позволяет различить несколько фаз роста, сменяющих друг друга в определенной последовательности и в большей или меньшей степени выраженных: начальную (или лаг-) фазу, экспоненциальную (или логарифмическую) фазу, стационарную фазу и фазу отмирания [5].

Начальная фаза. Эта фаза охватывает промежуток времени между инокуляцией и достижением максимальной скорости деления. Продолжительность этой фазы зависит главным образом от предшествовавших условий культивирования и возраста инокулята, а также от того, насколько пригодна для роста данная среда. Если инокулят взят из старой культуры (в стационарной фазе роста), то клеткам приходится сначала адаптироваться к новым условиям. Если источники энергии и углерода в новой среде отличаются от тех, какие были в предшествующей культуре, то приспособление (адаптация) к новым условиям может быть связано с синтезом новых ферментов, которые ранее не были нужны и поэтому не синтезировались. Образование новых ферментов индуцируется новым субстратом.

Экспоненциальная фаза. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза роста характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток. Эта скорость во время экспоненциальной фазы зависит от вида бактерий, а также от среды. Величина клеток и содержание в них белка у многих бактерий тоже остаются в экспоненциальной фазе постоянными. В известном смысле можно сказать, что бактериальная культура в этом случае состоит из «стандартных клеток». Если точно установлено, что число клеток, содержание в них белка и их сухая биомасса увеличиваются с одинаковой скоростью, то за ростом культуры можно следить, пользуясь каким-нибудь одним из этих показателей. Нередко, однако, и в экспоненциальной фазе роста клетки периодической культуры претерпевают изменения, так как постепенно изменяется среда: уменьшается концентрация субстрата, увеличивается плотность клеточной суспензии и накапливаются продукты обмена. В связи с тем что в экспоненциальной фазе скорость деления клеток относительно постоянна, эта фаза наиболее удобна для определения скорости деления (и скорости роста).



Стационарная фаза. Стационарная фаза наступает тогда, когда число клеток перестает увеличиваться. Скорость роста зависит от концентрации субстрата-при уменьшении этой концентрации, еще до полного использования субстрата, она начинает снижаться. Поэтому переход от экспоненциальной фазы к стационарной происходит постепенно. Скорость роста может снижаться не только из-за нехватки субстрата, но также из-за большой плотности бактериальной популяции, из-за низкого парциального давления или накопления токсичных продуктов обмена; все эти факторы вызывают переход к стационарной фазе. И в стационарной фазе могут еще происходить такие процессы, как использование запасных веществ, распад части рибосом и синтез ферментов. Наблюдаемая картина зависит от того, какой именно фактор лимитирует рост. Быстро гибнут лишь очень чувствительные клетки; другие еще долго сохраняют жизнеспособность- до тех пор, пока есть возможность получать необходимую для этого энергию в процессе окисления каких-либо запасных веществ или клеточных белков. Количество биомассы, достигнутое в стационарной фазе, называют выходом или урожаем. Урожай зависит от природы и количества используемых питательных веществ, а также от условий культивирования.

Фаза отмирания. Число живых клеток может снижаться экспоненциально. Иногда клетки лизируются под действием собственных ферментов (автолиз). [17].

### **Сбалансированный рост.**

Несколько подходов к определению роста совпадают лишь в одном случае - при сбалансированном росте. Асинхронная культура достигает сбалансированного роста лишь тогда, когда каждое «экстенсивное свойство» культуры экспоненциально растет во времени. Понятие «экстенсивное свойство» происходит из физической химии и относится к таким свойствам системы, которые увеличиваются тем значительнее, чем их больше в системе. Например, масса и количество клеток в определен-

ном объеме культуры являются ее экстенсивными свойствами, а температура или количество ДНК на клетку таковыми не являются. Приложимость этого физико-химического принципа к бактериологии связана с идеей о том, что если культура растет достаточно долго и при этом незначительно изменяет окружающую среду, то рано или поздно бактерии достигают одинакового сбалансированного со средой состояния независимо от начальных условий их роста. При достижении сбалансированного роста и при условии постоянства среды культура будет оставаться в этом состоянии бесконечно долго (если не изменится в результате мутаций или селекции). Однако это только теория. Практически невозможно измерить все параметры культуры, даже если она поддерживается в состоянии непрерывного разведения. Однако если использовать менее жесткие критерии, то культуры, находящиеся в состоянии сбалансированного роста, изучать довольно просто. Рассмотрим культуру в состоянии сбалансированного роста. Обозначим какое-нибудь экстенсивное свойство, например биомассу, ДНК, РНК или площадь поверхности клеток в пересчете на миллилитр культуры, буквой  $X$ . Скорость увеличения  $X$  пропорциональна количеству биомассы, и, следовательно, где  $X$  - коэффициент пропорциональности. После интегрирования и подстановки граничных условий ( $X=X_0$ , когда  $t = 0$ ) получаем. Иными словами, для каждого вещества увеличение  $X$  происходит экспоненциально во времени. Если соотношение между двумя веществами остается постоянным, тот же самый коэффициент пропорциональности следует использовать при любом выборе параметра  $X$ . Коэффициент  $K$  называют удельной скоростью роста. Экспоненциальное увеличение в соответствии с одной и той же удельной скоростью роста характерно не только для любого вещества, обозначенного  $X$ , но и для любой комбинации веществ или скорости обмена любого вещества. Это позволяет использовать в качестве показателя роста потребление кислорода или образование метаболита. Такие интенсивные свой-

ства, как % и отношение концентраций различных субстратов в условиях сбалансированного роста, остаются постоянными. Кроме того, остается постоянным распределение клеток по размерам. При этом в нормальной клетке все внутриклеточные процессы идут с постоянными скоростями, остается также постоянной способность каждой вновь образованной дочерней клетки к образованию колонии (т. е. не изменяется доля нежизнеспособных клеток). Поэтому в данных специфических условиях независимо от способа измерения роста (подсчет частиц, образование колоний или химическое определение клеточных компонентов) получают одинаковую удельную скорость роста, которая не меняется со временем. В принципе такие «идеальные» условия можно создать лишь при непрерывном культивировании в проточном режиме. Сбалансированный рост достигается за счет роста, ограниченного скоростью добавления питательных компонентов в условиях хемостата, а также за счет неограниченного роста в условиях турбидостата, где культура механически разбавляется для сохранения постоянного количества биомассы в единице объема среды. Сбалансированный рост бактерий получают также при повторяющемся разбавлении периодической культуры [6].

Изменения в клетках при различных скоростях роста. Организмы отвечают на изменения химических и физических условий среды изменением собственного состава. Эти изменения четко продемонстрированы для некоторых энтеробактерий, но они характерны вообще для всех прокариот. В принципе благоприятные условия способствуют быстрому росту, который требует более высоких концентраций рибосом и связанных с ними белков. В терминах состава клеток это означает более высокое содержание РНК. Кроме того, при благоприятных условиях роста клетки могут накапливать резервный материал, например гликоген и поли-р-оксимасляную кислоту, а также увеличиваться в размерах. Как предполагают, последнее связано с тем, что клетки в таких условиях не нуждаются в увеличении

относительной поверхности, облегчающем использование субстратов в разбавленных средах. Из-за изменений в составе клеток при измерении роста по содержанию клеточных компонентов возможны ошибки. Строго говоря, подобные измерения можно проводить лишь при росте в одной и той же среде и при условии, что сами бактерии не изменяют ее состав.

### **Несбалансированный рост.**

В ходе развития стационарных культур, в особенности при разведении таких культур свежей средой, происходят значительные изменения свойств микроорганизмов. Как уже упоминалось, это было продемонстрировано для некоторых энтеробактерий, но, вероятно, относится и ко всем прокариотам. В некотором смысле стадии развития стационарной культуры являются артефактом, зависящим от состава среды, а также возраста и состояния клеток инокулята; однако во всех случаях эти стадии существенны при измерениях роста. Феномены, проявляющиеся на различных стадиях развития стационарной культуры, важны в экологических исследованиях, где особую роль играют условия окружающей среды, которые в значительной степени неконтролируемы. Ответ культуры на колебания естественных условий включает в себя также изменения клеточных характеристик. Так, например, при разведении стационарной культуры, растущей в богатой среде, происходит ускорение макромолекулярного синтеза. Вначале синтезируются компоненты системы биосинтеза белка - рибосомные белки и рибосомная РНК, и только после завершения синтеза ряда макромолекул происходит клеточное деление. В этой фазе значительно возрастает средний размер клеток. Когда среда уже не способна поддерживать быстрый рост бактерий, интенсивность клеточных процессов замедляется, что приводит к образованию мелких клеток с недостаточным содержанием РНК. Наконец, часть бактерий гибнет, т. е. происходит уменьшение числа колониеобразующих единиц. Вероятно, большинство исследователей, предполагающих применять приведенные в

этом руководстве методы, будут вызывать изменения роста преднамеренно. Такие изменения можно вызвать колебаниями в содержании или недостатком питательных компонентов в среде, добавлением ингибиторов роста (особенно антибиотиков), ионизирующим излучением и другими экстремальными физическими факторами, например высокой или низкой температурой и осмотическим давлением. Поскольку влияние перечисленных факторов на рост может быть довольно сложным, при интерпретации результатов нужно быть очень осторожными. [9].

Источники ошибок. Существуют четыре вида источников ошибок. Первый и наиболее опасный из них заключается в том, что бактерии которые обычно делятся регулярно, в условиях слабой токсичности способны расти с образованием скоплений и нитей. Второй опасный момент связан с различной степенью жизнеспособности поврежденных бактерий при различных условиях культивирования. Восстановлению жизнеспособности бактерий способствуют процессы репарации, но они протекают лишь в определенных условиях. Третий источник ошибок связан с возможным образованием резистентных форм. Учет бактерий, способных к образованию спор, не составляет проблемы, поскольку известны методы контроля и измерения, позволяющие вносить соответствующие поправки. В том случае, когда споры в растущих спорообразующих культурах не появляются, возможны ошибки при измерении роста. Четвертый источник ошибок имеет отношение к процедурам, с помощью которых инокулят вводят в новую среду. Результаты зависят от того, как увеличивается при введении концентрация инокулята - постепенно или ступенчато, насколько долго инокулят присутствует в высокой концентрации и как она потом изменяется. Во время угрожающих популяциям изменений среды клеточная концентрация может быть критической. Для защиты от токсического действия факторов среды бактерии имеют индуцибельные или какие-либо другие, пока неизвестные системы. Эф-

фективность защиты зависит от численности микроорганизмов, осуществляющих детоксикацию в результате совместной деятельности. Защиту против медленно проникающих токсичных веществ способен обеспечивать сам по себе быстрый рост клеток. Все вышеперечисленные взаимоотношения можно проиллюстрировать на примере взаимодействия рифампина с клетками *E.coli*. В достаточной концентрации клетки способны инактивировать рифампин в определенных дозах; после их обработки антибиотиком в постепенно нарастающих концентрациях культуры становятся толерантными к повышенным дозам препарата. Независимо от этого быстро растущие бактерии более устойчивы к антибиотику, чем медленно растущие. Возможно, это объясняется тем, что препарат не успевает эффективно проникать в быстро растущие клетки. Например, если антибиотик добавляется в относительно высокой концентрации, а затем разводится до низкой, то происходит подавление роста в условиях, при которых обычно низкие концентрации не оказывают ингибирующего действия. После того как в результате кратковременной обработки культуры высокими дозами антибиотика рост замедляется, ингибирование остается постоянным, поскольку препарат успевает проникать в клетку и в этих условиях процесс ингибирования вызывается и низкими дозами антибиотика. [23].

### **Влияние на культуру микроорганизмов факторов внешней среды.**

Микроорганизмы находятся в тесной зависимости от условий окружающей среды. Благоприятные условия способствуют проявлению жизнедеятельности микроорганизмов, а неблагоприятные факторы могут привести к их гибели или изменчивости свойств. Факторы внешней среды принято делить на: физические, химические, биологические [29]

#### **Температура.**

Жизнь организмов определяется температурой больше, чем каким-либо фактором внешней среды, в связи с тем, что все организмы построе-

ны из химических компонентов и все процессы жизни происходят на основе химических реакций, подчиненных законам термодинамики. Температура действует не только на скорость химических реакций, но также является причиной структурной перестройки протеинов, фазовых перемещений жиров, изменения структуры воды. Температурная амплитуда биохимической активности относительно мала в связи со специфическими свойствами биомолекул. Витальная температурная зона, в пределах которой осуществляется активная жизнедеятельность микроорганизмов, за некоторым исключением, укладывается в рамки от 0° до 50-60°C. Нижняя граница активной жизнедеятельности микроорганизмов лимитируется, прежде всего, капельно-жидкой водой, постоянным потоком которой в клетке поддерживается трехмерность белковых молекул и других структурных носителей жизни и протекающие процессы ассимиляции и диссимиляции. Поэтому кристаллизация воды в омывающих жидкостях и клетках служит критическим порогом их жизни. Однако, если верхний порог витальной зоны, который определяется тепловой коагуляцией белков, довольно узок, то нижняя граница зоны жизнедеятельности более широка и «размыта», вследствие многих прямых и косвенных адаптаций к сохранению части воды в жидком состоянии, выработавшихся у организмов в процессе эволюции. По отношению к температурным условиям микроорганизмы разделяют на мезофильные, психрофильные и термофильные. Деление бактерий на указанные группы довольно условно, так как температурные диапазоны их роста значительно перекрываются. Большинство известных видов относится к мезофилам, у которых оптимальные температуры роста лежат между 3°C и 40°C, а температурный диапазон, в котором возможен рост находится между 10 и 45-50°C.

Группу термофилов делят на 4 подгруппы:

1. Термотолерантные виды растут в пределах от 10 до 55 – 60°, оптимальная область лежит при 35 - 40°.

2. Факультативные термофилы имеют максимальную температуру роста между 50 и 65°, но способны также к размножению при комнатной температуре (20°). К облигатным термофилам относят виды, обнаруживающие способность расти при температурах около 70° и не растущие ниже 40°.

3. Обнаружены прокариоты, выделенные в подгруппу экстремальных термофилов. Для них характерны следующие температурные параметры: оптимум в области 80 -105°, минимальная граница роста 60° и выше, максимальная - до 110°. К экстремальным термофилам относятся организмы из группы архебактерий, не имеющие аналогов среди мезофилов, например представители родов *Thermoproteus*, *Pyrococcus*, *Pyrodictium* и др.

Организмы, способные образовывать тепло внутри своего тела с помощью различных физиологических и биохимических механизмов, называют эндотермными (эндотермы), а организмы, температура тела которых полностью зависит от температуры окружающей среды, т.е. определяется внешними источниками тепла эктотермными (эктотермы). Поддержание постоянства метаболизма у эктотермных организмов при смене температуры обитания названо температурной компенсацией.

### **Влажность.**

Важнейшим фактором поддержания жизни в микробной клетке является вода, в растворах которой протекают все процессы, составляющие жизнь. При высушивании микроорганизмов часть клеток погибает. Клетки же, перенесшие высушивание, переходят в состояние анабиоза. Возможность сохранения бактериями жизнеспособности при высушивании определяется множеством факторов, в том числе зависит от температуры, pH, солевого состава среды и т.п. Обычно формы с мелкими клетками устойчивее, чем крупноклеточные формы; кокки устойчивее палочек. Клетки с толстой клеточной стенкой, в том числе большинство грамположительных бактерий, устойчивее к высушиванию, чем



грамотрицательные бактерии и тем более микоплазмы. Особенно высокой устойчивостью к высушиванию характеризуются микобактерии, клетки которых окружены массивными клеточными стенками, содержащими большое количество липидов. Бактериальные цисты и споры устойчивее к высушиванию, чем вегетативные клетки. При изготовлении биологических препаратов и сохранения чистых культур микроорганизмов пользуются методом лиофилизации (быстрое замораживание с последующим высушиванием под низким давлением).

### **Действие излучения.**

Солнечный свет может вызывать сильный антимикробный эффект. Так, более 99,9% клеток штамма *Escherichia coli* с нарушенными репарационными механизмами погибают после облучения солнечным светом в течение трех минут. При этом более 80% летальных повреждений связаны с действием света длиной волны менее 312 нм. Действие видимого света ответственно менее чем за 1% летальных повреждений. Видимый свет длиной волны 450 нм индуцирует замены пар оснований и мутации сдвига рамки у *E. coli*. Световые волны длиной 550 нм и особенно 410 нм вызывают фотолиз клеток *Mucosoccus xanthus*.

Ультрафиолетовые лучи и ионизирующее излучение. Ближний ультрафиолет (УФ)- излучение с длиной волн 400-320 нм- даже в невысоких дозах оказывает на бактерий определенное действие.

Резистентность организма к солнечной радиации, как правило, соответствует его устойчивости к неионизирующему излучению от искусственных источников. ДНК интенсивно поглощает УФ в области 240-300 нм, т.е. в области среднего и дальнего УФ, с пиком поглощения в области 254 нм. Этим объясняется высокая мутагенная и летальная эффективность облучения средним и дальним УФ. УФЛ широко применяются в производственной деятельности человека для обеззараживания воздуха помещений (родильные дома, операционные, животноводческие помещения, промыш-

ленные цеха производства антибиотиков, лабораторные боксы), воды, отходов производств. Ионизирующее излучение составляет определенный компонент естественной радиации, определяемый нестабильными изотопами, постоянно находящимися в почве, атмосферных осадках. В областях залегания радиоактивных минералов естественный фон радиации повышен. Изотопы могут попадать в живые организмы и тогда они подвергаются внутреннему облучению. Ионизирующее излучение используется для стерилизации биопрепаратов, перевязочного материала, инструментов. Действие лазера вызывает у микроорганизмов в зависимости от дозы облучения изменения морфологических и биохимических свойств, вплоть до утраты жизнеспособности. Гибнут бактерии при воздействии лазера длиной волны около 700 нм с энергией 200 Дж. При этом происходит денатурация белка и повреждение нуклеиновых кислот.

### **Ультразвук.**

Поскольку бактерии обладают относительно малой массой и жесткой оболочкой, низкочастотные колебания (зона звуковых колебаний 100-10000 Гц) действует на них в очень слабой степени. Если же бактерии погрузить в жидкость, в которой распространяются высокочастотные колебания (т.е. ультразвук), то бактерии разрушаются и погибают. Ультразвуковые колебания обычно создают в жидкостях при помощи вибрирующих никелевых или кварцевых дисков. В результате ультразвукового воздействия наблюдаются биохимические и функциональные изменения, не приводящие к гибели организма. Так, под воздействием УЗ могут высвобождаться в клетке биологически активные вещества (витамины, ферменты и пр.), а также появляться нехарактерные микроорганизму ферменты. Ультразвук используют для получения отдельных клеточных компонентов, для изучения их структуры и функций, для стерилизации субстратов, повреждающихся при тепловой обработке.

### **Концентрация ионов водорода.**

Кислотность среды является важным фактором, определяющим существование в ней прокариот. Для подавляющего большинства прокариот оптимальной является среда, близкая к нейтральной. Такие организмы называют нейтрофилами. Однако рост многих нейтрофилов возможен в средах, значение рН которых лежит в диапазоне от 4 до 9. Типичными нейтрофилами являются штаммы *Streptococcus faecalis* и многие патогенные бактерии. Многие нейтрофиллы способны расти или выживать при значениях рН, лежащих за пределами указанного диапазона. Такие прокариоты считаются кистоло- или щелочеустойчивыми- толерантными. К кислотоустойчивым относятся многие грибы, микобактерии.

Щелочетолерантны, то есть устойчивы к значениям рН близким к 9-10, многие из энтеробактерий. У некоторых видов бактерий адаптация к определенным значениям рН среды привела к тому, что оптимум рН для роста переместился в кислую ( рН 4 и ниже ) или щелочную ( рН от 9 и выше ) области. Такие прокариоты названы ацидо- или алкалофильными ( кислото- или щелочелюбивыми ) соответственно.

### **1.3 Промышленное культивирование микроорганизмов.**

Для более объемного промышленного культивирования микроорганизмов с целью получения из них различных биопрепаратов стали переходить на использование стеклянной посуды большой емкости (матрасы, бутылки). Причем, в такой посуде выращивали микроорганизмы главным образом на плотных агаровых средах. Новым этапом в культивировании микроорганизмов явился примененный в 1933 году Клейвером и Пергиным способ встряхивания колб с жидкой средой на качалках с принудительной подачей стерильного воздуха.

На этой основе был разработан так называемый глубинный метод выращивания микроорганизмов. Промышленный биотехнологический процесс, в котором для производства коммерческих продуктов используют

клеточные системы или микроорганизмы, обычно включает три ключевые стадии:

- подготовительную (обработка сырья, используемого в качестве источника питательных веществ, и приготовление , если это необходимо, питательных сред);
- биотехнологическую (рост микроорганизмов-мишеней в большом - обычно объемом более 100 л- биореакторе (ферментация) с последующим образованием нужного метаболита, например антибиотика, аминокислоты или белка (биотрансформация));
- получения готовой продукции (очистка целевого продукта от компонентов культуральной среды или от клеточной массы).

Ключевым направлением биотехнологии является интенсификация производственных процессов. Этого можно достичь как путем использования новых высокопродуктивных биообъектов, так и путем применения эффективных технологических режимов. Необходимо подобрать оптимальный субстрат, разработать конструкцию аппарата, оптимизировать условия культивирования биообъекта, обеспечить автоматический контроль за протеканием процесса, разработать способ выделения и очистки готового целевого продукта.

#### **1.4 Особенности культивирования PGPR-бактерий**

Род *Pseudomonas* многочисленная широко распространенная в природе группа микроорганизмов, большинство видов которой являются сапрофитами, обитателями почвы, водоемов, где им принадлежит большая роль в минерализации органического вещества. Наряду с сапрофитами, в состав рода включены и очень вредоносные фитопатогены. Представители рода являются аэробными палочками с полярно расположенными жгутиками, они способны к росту на самых простых средах. Характерным признаком *Pseudomonas* является способность к продукции пигментов, хотя данный признак не всегда является диагностическим. Также бактерии

этого рода также обладают способностью стимулировать рост и развитие растений, находясь в симбиозе с ними [10].

Устойчивость растений к заболеваниям, вызываемым почвенными фитопатогенами, во многом определяется результатами взаимодействия между корневой системой растений и разнообразными микроорганизмами. Некоторые штаммы бактерий *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. aureofaciens* (chlororaphis), *P. corrugata* и др. способствуют значительному улучшению роста и развития растений. Среди PGPR различных таксономических групп выделяются широким набором полезных для растений свойств ризосферные PGPR *Pseudomonas*, которые являются потенциальными объектами агробиотехнологии для разработки на их основе биологических средств защиты растений от фитопатогенов, а также биопрепаратов, стимулирующих рост и повышающих продуктивность растений [22].

Бактерии рода *Pseudomonas* способны развиваться в самых различных условиях, используя самые разные соединения углерода и азота в энергетическом и конструктивном обмене. Поэтому состав сред для культивирования разнообразен. Средой для развития водных и почвенных псевдомонад может служить дистиллированная вода с ничтожным количеством азота и углерода [26.]

Среди более чем 100 соединений различного химического строения, испытанного в качестве единственного источника углерода, наиболее универсальным субстратом для псевдомонад являлась пировиноградная кислота, далее по степени доступности располагаются  $\alpha$ -кетоглутаровая, янтарная и фумаровая кислоты. Из аминокислот наиболее доступны в качестве источников углерода пролин и  $\alpha$ -аланин.

Некоторые виды *Pseudomonas* усваивают одноуглеродные соединения: окись углерода, двуокись углерода, метанол, формальдегид, формиат, метилированные амины.

Известна способность *Pseudomonas chlororaphis* использовать полиуретан как единственный источник углерода и азота, а также использовать нефть и полициклические ароматические углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии.

У бактерий рода *Pseudomonas* широко распространена способность к ассимиляции этанола. Ряд штаммов *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* хорошо росли на синтетической среде с 1% этанола в качестве единственного источника углерода, а некоторые хорошо развивались на той же среде с 2,5% этанола, большинство из них принадлежали к видам флуоресцирующей группы. На среде с этанолом, в качестве единственного источника углерода, в условиях глубинного культивирования накапливали биомассу полноценную по аминокислотному и витаминному составу.

Известно, что бактерии рода *Pseudomonas* способны к ассимиляции индивидуальных легколетучих *n*-алканов от гексана до декана, а также к синтезу некоторых биологически активных веществ на средах, где смесь легких парафинов являлась единственным источником углеродного питания.

Многие виды *Pseudomonas* развиваются на богатых средах сложного состава: бульонах мясопептонных и рыбных, на кукурузном экстракте, картофельном соке. Для культивирования *Pseudomonas* целью получения антибиотических веществ, как правило, требуются богатые органическими формами азота и углевода среды. В 50-х годах прошлого века King et al. (1954) предложили среду для определения образования флуоресцирующих пигментов; в дальнейшем и до наших дней эта среда Кинг В, в состав которой входят глицерин, пептон,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ , является одной из основных для культивирования *Pseudomonas* - продуцентов веществ с фунгицидной активностью. В последнее время предпринимаются попытки по модификации этой среды, как, например, в работе корейских ученых Lee et

al. (2003), где проводится количественное изменение соотношения глицерин : пептон.

Реже используются также богатые среды - такие, как среда LB и питательные бульоны с добавлением 0,5-1,0% источника углевода (обычно глюкозы).

Автолизаты и гидролизаты пивных дрожжей обладают сильным биостимулирующим эффектом, поэтому чаще всего их применяют в качестве добавок к питательным средам для увеличения скорости роста при культивировании дрожжей и других микроорганизмов. Гидролизаты и автолизаты содержат продукты гидролиза белков, сахара, нуклеиновые и другие биологически активные соединения. Дрожжевые гидролизаты широко применяются в качестве источника витаминов (в первую очередь  $B_1$  и  $B_2$ . А также PP,  $B_3$ ,  $B_4$ ,  $B_6$ , H), незаменимых аминокислот и жирных кислот в медицине, в микробиологии при составлении питательных сред.

Как показано в работе Квасникова с соавт. (1975), штаммы *P. aurantiaca* способны к синтезу веществ с фунгицидной активностью не только на богатой среде Кинга, но и на синтетической среде Мюнца в атмосфере низкомолекулярных *n*-алканов ( $C_6$ - $C_{10}$ ). Также показано, что способность этих штаммов к образованию антибиотических веществ стабильна и сохраняется на протяжении 10 - 15 лет лабораторного культивирования.

Синтез пиоцианина *P. aeruginosa* начинается в стационарную фазу роста. На среде с глицерином в качестве источника углерода, лейцином и аланином в качестве источника азота и определенным уровнем содержания магния и фосфора выход пиоцианина достигает максимальной концентрации.

Лимитирование фосфатами вызывает синтез пиоцианина. Низкий уровень фосфатов в конце экспоненциальной фазы является триггером

синтеза пиоцианина. Повышение концентрации фосфатов останавливает синтез.

Псевдомонады обычно не требовательны к аминокислотному составу питательных сред, за исключением *P. maltophilia*, которые нуждаются в метионине.

Многие аминокислоты могут быть единственным источником углерода и азота. *P. putida* может расти на среде с любой из 18 аминокислот. *P. aëroginosa* может использовать как источник азота метионин, треонин и цистеин.

Изучение динамики синтеза ИУК и условий, оптимальных для накопления в среде максимума гормона, показало, что синтез фитогормона псевдомонадами стимулируется добавлением в среду триптофана или триптамина и подавляется ионами аммония.

Как правило, культивирование псевдомонад проводят в течение 48-72 ч при температуре 24-28°C в условиях аэрации. И как правило, максимальный рост фунгицидной активности наблюдается в стационарную фазу.

### **Математическое моделирование в оптимизации условий культивирования микроорганизмов**

При изучении роста и развития микробиологических культур всегда встает вопрос об оптимальности питательной среды, на которой культивируется данный микроорганизм, т.е. такого качественного и количественного соотношения элементов питания, при котором был бы наибольшим выход биомассы или целевых продуктов жизнедеятельности.

Чрезвычайно важны также физико-химические факторы: аэрация, температура, кислотность среды, время культивирования, интенсивность перемешивания, свет и другие. Развитие микроорганизмов возможно лишь в определенных пределах каждого фактора. Изменение того или иного фактора в границах, допускающих развитие микроорганизмов, может существенно влиять на скорость роста клеток, обмен веществ и стабильность



целевого продукта. Изменение количества и соотношения компонентов среды оказывает большое влияние на рост микроорганизмов [41].

Концентрации питательных веществ в среде, необходимые для проявления разных сторон жизнедеятельности микроорганизмов, могут заметно различаться. При подборе питательных сред и условий культивирования микроорганизмов с целью повышения выхода биомассы или накопления определённых продуктов обмена веществ микроорганизмов, таких как антибиотики, ферменты, ростстимулирующие вещества практически всегда основываются на проведении многочисленных экспериментов. Применение же методов математического планирования эксперимента позволяет не только одновременно изучить действие нескольких факторов на интересующий нас процесс и количественно оценить степень этого влияния, но и решить задачу с проведением относительно малого количества экспериментов. Также при сравнительной простоте планирования и небольшом объёме вычислений, обработка полученных результатов обеспечивает минимальную ошибку в оценке эффектов и даже при низком уровне теоретических знаний о механизме процесса, позволяет получить его математическую модель. Поэтому методы математического планирования эксперимента нашли широкое применение при оптимизации ферментационных сред и условий культивирования.

Начало математическому планированию эксперимента положено в 30-х годах работами Р.Фишера в области дисперсионного анализа. Более поздние фундаментальные работы Бокса с сотрудниками привели к тесному сочетанию дисперсионного и регрессионного анализов и к разработке на их основе высокоэффективных схем планирования, таких как метод крутого восхождения.

В биологии методы математического планирования (главным образом, факторный эксперимент и планы второго порядка) применялись в агробиологических работах. Так например, Хэдер и др. (Hader et al., 1957)

использовали план второго порядка для исследования совместного влияния меди, железа и молибдена на рост салата.

Методы математического планирования эксперимента (метод случайного баланса, факторный эксперимент, метод Бокса-Уилсона) были использованы при подборе состава оптимальных сред и условий культивирования (Богоров и др., 1965, Максимов, Фёдоров 1966). Например применение метода математического моделирования при оптимизации питательной среды для производства феназин-1-карбоксильной кислоты с помощью *Pseudomonas* sp. M-18Q и *Pseudomonas* sp. M-18G позволило увеличить выход продукта на 63,5% и 43,5% соответственно по сравнению с использованием первоначальной среды.

Оптимизация физических параметров, таких как pH, температура и время культивирования, при производстве липазы с помощью *Arthrobacter* привело к увеличению продукции липазы в 1,6 раз.

Таким образом, одним из путей повышения биосинтетической способности клетки без изменения генетического аппарата является направленное регулирование процессов биосинтеза путём изменения состава и концентрации компонентов питательной среды и других факторов, влияющих на процесс [36]

Оптимизация биологического процесса сводится к экспериментальному отысканию условий, при которых выход процесса достигает максимального значения. Под термином «выход процесса» подразумевается любая характеристика процесса, представляющая интерес для экспериментатора (биомасса, накопление какого-либо продукта жизнедеятельности, биологическая мобилизация вещества т. д.). Условия протекания процесса определяются комплексом факторов, от которых зависит его выход.

Оптимизация процесса включает два основных этапа. На первом этапе ставят опыты по плану полного факторного эксперимента (ПФЭ). Основная цель постановки опытов по плану ПФЭ - определить значимость

исследуемых факторов, направление и величину изменений каждого из них в последующих опытах собственно процесса оптимизации [35].

Второй этап - это собственно процесс оптимизации т.е. определение оптимального соотношения наиболее существенных (значимых) факторов на фоне постоянного уровня остальных. Для нахождения некоторой наилучшей комбинации отобранных существенных факторов в изучаемой системе оказывается эффективным метод крутого восхождения (метод Бокса-Уилсона), представляющий собой факторный эксперимент с последующим движением по градиенту.

Анализ литературных источников, представленных в данном обзоре, наглядно демонстрирует, что представители р. *Pseudomonas* выступают в качестве антагонистов широкого спектра фитопатогенных грибов и бактерий. Положительное влияние псевдомонад на растения обусловлено рядом механизмов, важнейшие из которых - выработка антибиотических веществ различной природы, сидерофоров и стимуляторов роста растений. Способность активно заселять ризосферу и филлосферу, присущая псевдомонадам, позволяет считать их перспективными агентами биоконтроля болезней растений. Ряд препаратов на основе псевдомонад, созданных и успешно используемых в России и за рубежом, подтверждает это положение.

Однако, при производстве биопрепаратов на основе бактерий р. *Pseudomonas* для практического использования в агроботсхнологии основной проблемой является высокая стоимость питательной среды. Известные питательные среды для культивирования псевдомонад такие как среда Кинга, среда LB. содержат в своем составе такие дорогостоящие компоненты как пептон, дрожжевой экстракт. Высокая стоимость питательной среды неизбежно приведет к удорожанию целевого продукта.

Выходом из сложившейся ситуации является использование питательной среды, где в качестве источника азота используется автолизат отработанных пивных дрожжей, которые в настоящее время не находят ква-

лифицированного применения и, в то же время содержат все незаменимые аминокислоты, а также в значительном количестве витамины первой группы В, РР и Е [43]

### **Фиксация молекулярного азота из атмосферы**

Азотное питание растений в природных экосистемах в основном происходит за счет симбиотических, ассоциативных и свободноживущих микроорганизмов, способных восстанавливать молекулярный азот воздуха. По данным ряда исследований [35], фиксировать атмосферный азот могут от 50 до 80% микроорганизмов. Обычно ризосферные популяции представляют собой смесь разных азотфиксирующих бактерий. Наиболее типичными представителями почвенного ризосферного сообщества аэробных азотфиксаторов являются бактерии из родов *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Enterobacter* и *Pseudomonas*. Показана их способность проявлять положительный хемотаксис к веществам, входящим в корневые выделения растений и прикрепляться к корням [13]. Согласно опубликованным данным [19], нефтяное загрязнение почвы создает условия для защиты микробной нитрогеназы от кислорода, активизируя, таким образом, процесс азотфиксации. На основании этого можно сделать вывод, что наличие деструктивного потенциала у азотфиксаторов может служить важным преимуществом перед другими микроорганизмами и позволяет рассматривать их в качестве перспективных интродуцентов для биоремедиации почв [4].

### **Повышение доступности фосфора для растений**

Фосфор присутствует в почве в виде органических (компоненты растительного, животного и микробного происхождения) и неорганических соединений. Из общего пула фосфорных соединений почвы только около 5% непосредственно доступны растениям. Некоторые микроорганизмы, в особенности микоризные грибы и некоторые ризобактерии, способны усиливать поступление фосфора в растения. Бактерии могут использовать две системы повышения концентрации экзогенного фосфата: 1) за счет гидро-

лиза органических фосфатов под действием фосфатаз; 2) путем растворения минеральных фосфатов за счет продукции кислот. Бактерии родов *Pseudomonas*, *Azospirillum* способны к эффективному растворению фосфорных соединений [11].

### ***Защита от фитопатогенов***

К настоящему времени выделено множество штаммов PGPR, подавляющих или замедляющих рост и развитие фитопатогенных грибов и бактерий. Бактерии рода *Pseudomonas* - одна из наиболее изученных групп бактерий антагонистов почвенных фитопатогенов. Механизмы антагонистических взаимодействий PGPR и фитопатогенов разнообразны по своей природе. Рассмотрим два из них, наиболее хорошо изученных и важных с точки зрения практического использования ризобактерий [14]

### **Продукция сидерофоров**

Хорошо известна способность псевдомонад продуцировать метаболиты, называемые сидерофорами, которые выполняют функцию связывания и транспорта железа в клетки бактерий [44] Сидерофоры флуоресцирующих псевдомонад имеют различную химическую природу и обладают, как правило, высоким сродством к трехвалентному железу, образуя с ним стабильные комплексы, недоступные для использования фитопатогенами. Фитопатогены продуцируют собственные сидерофоры, однако, в отличие от сидерофоров псевдомонад, они гораздо медленнее связываются с ионами железа, и псевдомонады выигрывают в конкурентной борьбе с фитопатогенами за такой жизненно важный элемент как железо. Таким образом, связывание железа сидерофорами приводит к ограничению роста фитопатогенов и улучшению роста растений. Важная роль сидерофоров в антагонистических взаимоотношениях ризосферных псевдомонад с почвенными фитопатогенами и в стимуляции роста растений неоднократно доказана при инокуляции растений штаммами, продуцирующими сидерофоры, и их мутантами, дефектными по синтезу сидерофоров. При этом отмечено не

только супрессирующее действие сидерофоров на фитопатогены, но и стимулирующее воздействие на растения. Это подтверждается также в экспериментах с очищенным сидерофором одного из штаммов *Pseudomonas putida* ВЮ - псевдобактерином, который оказывает стимулирующее действие на рост картофеля. Следует отметить, что антагонизм псевдомонад в отношении фитопатогенов, обусловленный конкуренцией за железо, эффективен только при низком содержании железа в почве. Резко снижается защитный эффект сидерофор- продуцирующих штаммов в кислых почвах, где растворимость железа и его доступность для всех микроорганизмов возрастают. Избыток железа приводит также к репрессии синтеза сидерофоров. [6].

### **Синтез антибиотиков**

PGPR *Pseudomonas* способны продуцировать широкий спектр вторичных метаболитов, в том числе антибиотиков [25]. Наиболее изученными антибиотиками, играющими важную роль в супрессии болезней растений, являются антибиотики группы феназинов, флороглюцинов, пиоллютеорин, пирролнитрин и оомицин А. Роль продукции антибиотиков в защите растений непосредственно в почве была показана в исследованиях Л. Томашова по бактеризации семян пшеницы штаммом *P. fluorescens* 2-79 и его дефектным по синтезу феназинового антибиотика (феназин-1 - карбоновой кислоты) мутантом. Защиту растений от одного из возбудителей корневой гнили обеспечивал только исходный штамм с нормальной продукцией антибиотика, тогда как мутантный штамм в значительной степени утрачивал эту способность. Следует отметить, что мутанты PGPR *Pseudomonas*, характеризующиеся повышенным синтезом антибиотика, не улучшали защиты растений от фитопатогенов. Недавно была охарактеризована генетическая система, контролирующая биосинтез феназин-1- карбоновой кислоты у штамма *P. fluorescens* 2-79. Предложена принципиальная схема пути биосинтеза этого антибиотика [24].

## **Механизмы положительного влияния PGPR на растения**

Все изученные к настоящему времени механизмы положительного влияния псевдомонад на растения можно условно разделить на два типа: 1) прямая или непосредственная стимуляция роста растений за счет синтеза различных метаболитов, полезных для растений; 2) опосредованная стимуляция роста растений за счет вытеснения и подавления развития почвенных фитопатогенов или микроорганизмов, угнетающих рост растений. К первому типу прежде всего можно отнести способность PGPR *Pseudomonas* синтезировать регуляторы роста растений и улучшать фосфорное питание растений. Кроме того, некоторые штаммы псевдомонад способны к фиксации атмосферного азота и индукции у растений устойчивости к фитопатогенам. [27].

Бактерии могут использовать две системы повышения концентрации экзогенного фосфата: 1) за счет гидролиза органических фосфатов под действием фосфатаз; 2) путем растворения минеральных фосфатов за счет продукции кислот. Бактерии рода *Pseudomonas* способны к эффективному растворению фосфорных соединений, что можно использовать для улучшения фосфорного питания растений. Обработка растений авирулентными или несовместимыми формами фитопатогенов может индуцировать резистентность растений к заболеваниям. Аналогичный эффект достигается при инокуляции корней растений некоторыми штаммами PGPR *Pseudomonas*. Например, обработка корней бобов и гвоздики определенными штаммами PGPR *P. putida* повышает устойчивость растений к фитопатогенному грибу *Fusarium solani*. При этом отмечают усиление лигнификации корневой ткани и повышение содержания фитоалексинов в стеблях растений. PGPR *Pseudomonas* способны продуцировать широкий спектр вторичных метаболитов, в том числе антибиотиков [18]. Наиболее хорошо изученными антибиотиками, играющими важную роль в

супрессии болезней растений, являются антибиотики группы феназинов, флороглюцинов, пиолитеорин, пирролнитрин и оомицин [13].

### **Факторы влияющие на колонизацию PGPR *Pseudomonas* ризосферы растений**

Для выживания в ризосфере бактерии должны адаптироваться к специфическим условиям этой экологической ниши. В частности, бактерии должны быть резистентны к губительным для них ферментам (пероксидазы, протеазы) или токсичным соединениям (фенольные соединения растений), а также обладать в некоторых случаях осмо- или холодоустойчивостью. Биотическими факторами, влияющими на выживаемость ризобактерий, является наличие в ризосфере конкурентов или других организмов, оказывающих негативный эффект на PGPR *Pseudomonas*, таких, как простейшие (амебы и инфузории), хищные бактерии и бактериофаги. Эти факторы плохо изучены и имеются только отдельные сведения о такого рода взаимодействиях.

### **PGPR *Pseudomonas* как агенты защиты растений от фитопатогенов и перспективы их практического использования.**

Возможность применения биологических, и в частности микробиологических, объектов для защиты растений от фитопатогенов исследуется около 70 лет. Специалисты, занимающиеся этой проблемой, часто называют биологическую защиту растений с помощью других организмов биологическим контролем фитопатогенов. Очень часто биологический контроль фитопатогенов ризосферными псевдомонадами представляет собой результат комплексного действия различных механизмов, включающих помимо синтеза антибиотиков и другие менее изученные пока способы воздействия ризобактерий *Pseudomonas* на почвенных патогенов. При этом возможно одновременное супрессирующее влияние псевдомонад на фитопатогены как за счет синтеза антибиотиков и других вторичных метаболитов, так и за счет простой конкуренции PGPR *Pseudomonas* и фи-



топатогенов за источники азотного и углеродного питания. Обработка посевного материала, а также корней и проростков растений некоторыми штаммами PGPR *Pseudomonas* может существенно снижать пораженность растений фитопатогенами и увеличивать урожайность сельскохозяйственных культур. В некоторых случаях возможно использование смешанных препаратов совместимых бактерий, в том числе и бактерий различных таксономических групп с обязательным включением бактерий рода *Pseudomonas*. Использование таких препаратов может преследовать различные цели: защиту растений и урожая от фитопатогенов, стимуляцию прорастания семян и роста растений, улучшение фосфорного питания растений, стимуляцию образования клубеньков у бобовых, получение компостов, супрессирующих возбудителей корневых гнилей растений и т.д. . В настоящее время ведутся разработки технологий получения биопрепаратов различного назначения на основе ризосферных псевдомонад. Исследуются различные способы консервации этих биопрепаратов и улучшения их прикрепления к поверхности семян и корней растений с использованием различных клеящих средств типа метилцеллюлозы, альгинатов, ксантанов и др. Кроме того, успешно развиваются исследования антагонистических взаимоотношений ризосферных псевдомонад с фитопатогенными нематодами, вызывающими значительные потери урожая. Проводятся эксперименты по переносу в ризосферные псевдомонады бактериальных генов других таксономических групп (например, *Bacillus thuringiensis*), контролирующих необычные для псевдомонад свойства, как, например, способность к синтезу токсинов, вызывающих гибель некоторых насекомых - вредителей растений. Таким образом, уже в настоящее время возможно эффективное использование штаммов PGPR *Pseudomonas*, правильно подобранных к конкретным условиям определенного хозяйства в качестве биологических средств защиты растений, являющихся дополнением, а иногда и альтернативой химическим

средствам. Активно ведущиеся исследования в этом направлении и разрабатываемые новые технологии существенно повысят эффективность этих биопрепаратов [37].

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1 Характеристика материалов и объектов исследования

#### 2.1.1 Оборудование

Для выращивания культур микроорганизмов мы использовали: Термостат, который нужен для поддержания постоянно температуры, что было необходимо для выращивания микроорганизмов. (Рис.2.1)

Автоклав или паровой стерилизатор использовался для стерилизации сред паром под давлением (Рис.2.2)

Микробиологический стерильный бокс (ламинарный бокс) лабораторный прибор для работы с биологическими объектами в стерильных условиях. Представляет собой шкаф, оборудованный осветителями, ультрафиолетовыми лампами и системой подачи стерильного воздуха. Используется при микробиологических, молекулярно-биологических работах, работах с культурой клеток, тканей и органов. Стерильный воздух подаётся в бокс ламинарным потоком (равномерное движение воздуха без завихрений). (Рис. 2.3)



Рис. 2.1. Термостат



Рис. 2.2 Автоклав (или паровой стерилизатор)



Рис. 2.3 Микробиологический стерильный бокс (ламинарный бокс)



Рис. 2.4 Микроскоп-биологический-МИКМЕД-5

Микроскоп использовался для изучения микропрепаратов. (Рис.4)

Цифровая насадка на микроскоп использовалась для фотографирования объектов исследования.

Также использовалось микробиологическое оборудование лаборатории кафедры «Общая биология и биохимия», такие как чашки Петри, шпатель, пробирки, колбы, спиртовки и т.д.

### 2.1.2 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* или сенная палочка один из представителей, положительных по Граму аэробных, спорообразующих почвенных микробов. В связи с тем, что используют сенный экстракт, для получения накопительных культур этого микроорганизма, второе название бациллюса - сенная палочка. На сегодняшний день этот представитель рода бацилл один из наиболее известных и тщательно изученных. [19]. Сенная палочка - довольно крупный, прямой, бесцветный бацилл, имеющий около 0,7 мкм. в толщину и 2-8 мкм. в длину (в живом состоянии), с тупо закругленными концами. Иногда отдельные бациллы, после поперечного деления, остаются соединенными в нити. Сенная палочка, кроме деления, размножается и спорами. Спора лежит обычно в середине его клетки, но иногда и несколько

ко ближе к одному из концов. Спора имеет или круглую, или слегка эллиптическую форму. Она очень устойчива по отношению к различным внешним факторам. Особенно хорошо выдерживают споры сенного бацилла высокую температуру. Молодая палочка неподвижна и вскоре начинает повторно делиться. Первые продукты деления также неподвижны, но затем дальнейшие особи становятся подвижными и разбегаются. Состояние подвижности продолжается обычно недолго. Подвижность молодых палочек обуславливается присутствием у них 6-8 жгутиков, разбросанно отходящих от клетки в различных местах ее поверхности. Сенная палочка встречается в природе на различных разлагающихся органических остатках, как обычная сапрофильная форма; часто попадает она как в сильно загрязненной, так и в питьевой колодезной воде. [17].

Бациллы, содержащиеся в почве, отличаются меньшими размерами клеток, чем в лабораторной культуре. Наряду с обычными палочковидными клетками встречаются клетки в виде кокков, которые жизнеспособны и при определенных условиях приобретают форму палочки, свойственную данному виду. Экология и содержание бацилл в почвах зависят от состава почвы, ее адсорбционных свойств, температуры, уровня почвенных вод, растительного покрова и др. Бациллы довольно часто встречаются в воде озер, морей и океанов. Аэробные бациллы в значительных количествах содержатся и в микрофлоре воздуха. Таким образом, аэробные спорообразующие бактерии широко распространены в природе благодаря тому, что обладают высокими адаптивными свойствами и могут существовать в экстремальных условиях. Для получения культуры сенной палочки необходимо взять немного сена, положить его в колбу с водой, отверстие колбы закрыть ватным тампоном и прокипятить в течение 30 минут. Полученный раствор отфильтровать и поставить в теплое место (оптимальной является температура в 25-26 °C). Через 3-4 дня на поверхности жидкости появится бактериальная пленка. Это культура сенной палочки. [22].

### **Культурально-морфологические свойства штамма *Bacillus subtilis***

Для изучения культурально-морфологических свойств штамма *Bacillus subtilis* культуру выращивают при  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  в течении 3-5 суток на твердых питательных средах следующего состава :

Картофельный агар: Очищенный картофель 200 г, вода 1 л /после 20 мин кипения отвар процеживают, объем доводят до 1 л, добавляют агар 20г стерилизуют при 1 атм. 20 мин.

Агаризованная кукурузно-мелассовая среда: кукурузный экстракт 30г, меласса 15 г, агар 20 г, вода водопроводная до 1 л, рН 7,2,стерилизуют при 1 атм. 20 мин.

Мясопептонный агар с глюкозой: мясопептонный бульон 1 л, глюкоза 10 г, агар 20 г, стерилизуют при 0,5 атм. 20 мин.

На всех твердых питательных средах вначале роста наблюдаются мелкие колонии неправильной формы белесоватого цвета. К 48 ч роста на картофельном агаре вырастают крупные матовые плоские колонии с неровными краями белесоватого цвета, которые в дальнейшем становятся блестящими, слегка утолщаются и приобретают бежевый цвет. На агаризованной кукурузно-мелассовой среде наблюдаются разрастающиеся колонии с неровными краями, плоские, середина колонии с мелкими складками, цвет бежевый. Через неделю края колонии становятся блестящими, цвет немного темнеет. На мясопептонном агаре с глюкозой разрастающиеся плоские белесоватые колонии с неровными краями, матовой поверхностью, середина колонии блестящая, почти прозрачная. Через неделю колонии становятся блестящими, приобретают бежевый цвет, слегка утолщаются.

Как и большинство бактерий хорошо растет на искусственных питательных средах. МПБ, Сабуро, МПА, средах с различными источниками азота: пептоном, казеином, аминокислотами, белками и их гидролизатами, гидролизатами дрожжей и тд. Утилизируют глюкозу, сахарозу, арабинозу,

декстрозу, ксилозу, маннит, крахмал. Показано, что при культивировании *Bacillus subtilis* на изучаемых средах различного состава бактерии проявляли различную ростовую активность.

### **Штаммы бактерий**

Мы изучали бактерии, выделенные из коммерческих продуктов «Бактофит» и «Гамаир»

#### *Бактофит*

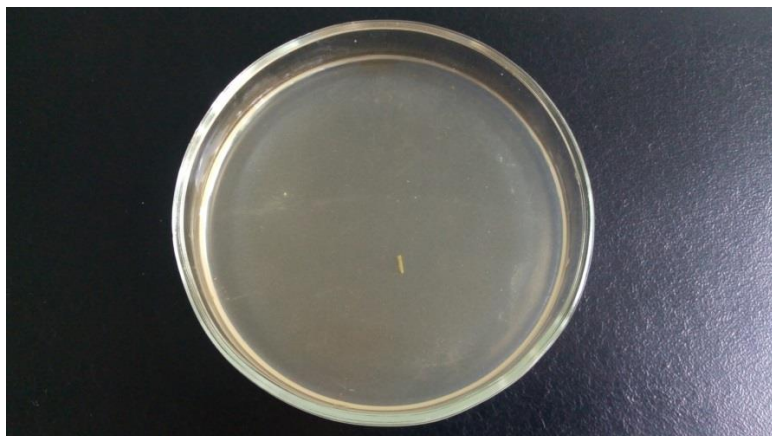
Бактофит - биологический препарат для защиты растений от болезней, помогает защитить растения от мучнистой росы: особенно гвоздики, розы, дельфиниум, плодово-ягодные кустарники - крыжовник и смородину, когда нет возможности использовать химикаты. Особенно эффективен препарат в прохладную погоду в период регулярных осадков, но опрыскивание и полив нужно произвести за сутки до дождя, в крайнем случае, за 6 часов до дождя, а повторить через 4-5 дней. Препарат можно использовать для предпосадочной обработки черенков, семян и закладке клубней на хранение. Бактофит на основе *Bacillus subtilis*, штамм ИПМ 215 проявил высокую эффективность на розах в условиях защищенного грунта. Бактофит при трехкратной обработке (интервал 7-8 дней) показал эффективность против мучнистой росы не менее 65-70%, при этом, развитие болезни сдерживалось на 15-20 дней. Отмечено мягкое и пролонгированное действие средства на фитопатоген - последний постепенно исчезает с растений, в связи с чем, следует проводить не менее трех обработок. [33].

Бактериальные культуры микроорганизмов выращивали течение 1-2 суток на среде МПА, посев произведен «газоном», выращивали культуры при температуре 22°C (Рис. 2.5) и 30°C (Рис. 2.6).

Посев «газоном» - 1 мл жидкой культуры (если культура с плотной среды, ее эмульгируют в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия или бульоне) наносят на поверхность агара и тщательно распределяют жидкость по поверхности среды, слегка вращая чашку. Затем чашку

немного наклоняют и пипеткой отсасывают избыток культуры, выливая ее в дезинфицирующий раствор. Туда помещают пипетку, предварительно отсоединив от нее грушу.

Техника посева. Шпатель прокаливают над пламенем горелки, берут в правую руку, а в левую руку берем колбу с суспензией. Изымаем пробку правой рукой, а точнее мизинцем и удерживаем ее, так чтобы пробка не касалась других поверхностей. Шпатель вводим в колбу, берем материал вращательным движением. При пересеве шпатель следует охлаждать в стерильной воде и уже после этого касаться культуры, по окончании посева шпатель ставят в штатив, Чашки Петри с засеянной культурой надписывают и помещают в термостат.



*Рис. 2.5 Культура выделенная из препарата «Бактофит», среда МПА,  $t = 22^{\circ}\text{C}$ .*



*Рис. 2.6 Культура выделенная из препарата «Бактофит», среда МПА,  $t = 30^{\circ}\text{C}$ .*



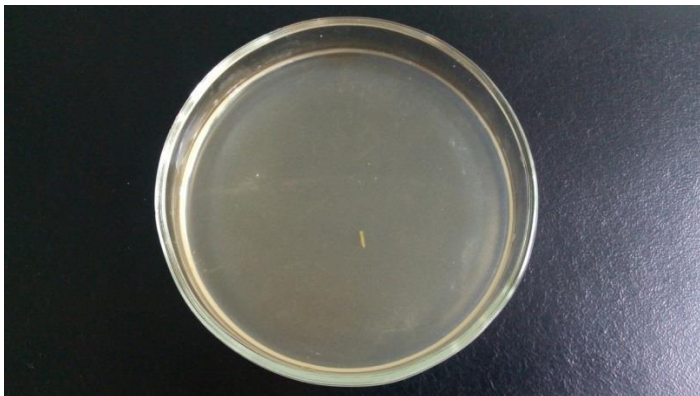
Гамаир - *Bacillus subtilis*, штамм М-22 ВИЗР разрешены к применению в сельском и личном подсобных хозяйствах против болезней томата открытого грунта (корневые гнили, фитофтороз, альтернариоз), томата защищенного грунта (бактериальный рак, фитофтороз, белая гниль, серая гниль), цветочных культур открытого грунта (септориозная пятнистость, корневые гнили, трахеомикозное увядание), горшечных цветочных культур защищенного грунта (корневые гнили, увядание, пятнистости), яблони (парша, монилиоз), капусты белокочанной (черная ножка, слизистый и сосудистый бактериозы), огурца открытого грунта (корневые гнили, пероноспороз), огурца защищенного грунта (корневые гнили, серая гниль) и др. Биопрепарат на основе описываемого штамма подавляет развитие грибной и бактериальной микрофлоры на растительных остатках и поверхности корнеплодов. Он сдерживает распространение кагатных гнилей, предотвращает разрушение корнеплодов. Проявляет активность в отношении многих фитопатогенных грибов (*Ascohyta fabae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Whetzelinia sclerotiorum* и др.) [28].

Было проведено исследование эффективности препарата при закладке корнеплодов свеклы в кагаты. Гамаир способствовал их защите от распространения и развития кагатной гнили. Потери веса корнеплодов, обработанных препаратом, снизились в 15,9 раз, а потери сахаристости в 1,6 раза.

Механизм действия: отмечено стимулирующее действие на развитие защищаемых культур: увеличение высоты стебля, количества завязей и листьев, ускорение сроков созревания. Прибавка урожая при применении Гамаира составляет 25-35%.

Изучались бактерии, выделенные из коммерческого продукта Гамаир. Бактериальные культуры микроорганизмов выращивали аналогично

При комнатной температуре 22°C (Рис. 2.7) и в термостате 30°C (Рис. 2.8).



*Рис. 2.7 Культура выделенная из препарата «Гамаир», среда МПА,  $t=22^{\circ}\text{C}$ .*



*Рис. 2.8 Культура выделенная из препарата «Гамаир», среда МПА,  $t=30^{\circ}\text{C}$*

### **Среды культивирования**

Выращивание микроорганизмов осуществляли на плотных питательных средах следующего состава:

КСА (картофельно - сахарозный агар): картофель - 200 г.; сахароза - 20 г; агар-агар - 20 г; вода дистиллированная - 1000 мл

Среду готовили следующим образом: 200 гр. очищенного мелконарезанного картофеля заливали 1000мл. дистиллированной воды и кипятили в течении 40 минут, затем жидкость фильтровали через несколько слоев марли. Довели объем воды до 1000мл., поставили на кипящую водяную баню и растворили в полученном картофельном отваре 20гр. агара, разогревали до полного растворения. После чего профильтровали жидкость в горячем состоянии через несколько слоев марли и добавили 20 гр. сахаро-

зы, прокипятили до растворения, далее простерилизовали в автоклаве в течение 30 минут.

МПА (мясо – пептонный агар):

Состав: мясо крупно рогатого скота 1 кг. (или 2 бульонных кубика на говядине); Пептон - 10 гр.; NaCl - 5 гр.;

Для приготовления МПА (мясо-пептонного агара) мы сварили МПБ (мясо-пептонный бульон), Первым этапом было получение мясной воды. Мясо, очищенное от жира и от сухожилий, мы пропустили через мясорубку, залили двойным количеством холодной водопроводной воды и настояли в течение суток в прохладном месте. Затем мясной настой вместе с мясом прокипятили в течение 1 часа, после чего остудили, профильтровали, долили воды до первоначального объема также можно взять бульонный кубик на мясной основе прокипятить до полного растворения и профильтровать через несколько слоев марли. К 1 литру мясной воды прибавили 10 грамм пептона и 5 грамм NaCl, профильтровали через бумажный фильтр, разлили в чистые пробирки и, закрыли ватными пробками, затем простерилизовали в автоклаве 20 мин при температуре 120 °С.

### **2.1.3 Картофельная палочка**

Картофельная палочка развивается на картофеле. Для ее получения мы брали неочищенный картофель, нарезали небольшими кубиками, помещали в небольшую посуду, заливали водой. Для заражения приготовленной питательной среды спорами картофельной палочки, опустили в нее небольшой комочек почвы и присыпали мелом, после этого поставили в термостат при температуре 30°С на 3 дня. За это время картофельная палочка размножается в большом количестве, ее размеры достигают 15 мкм.

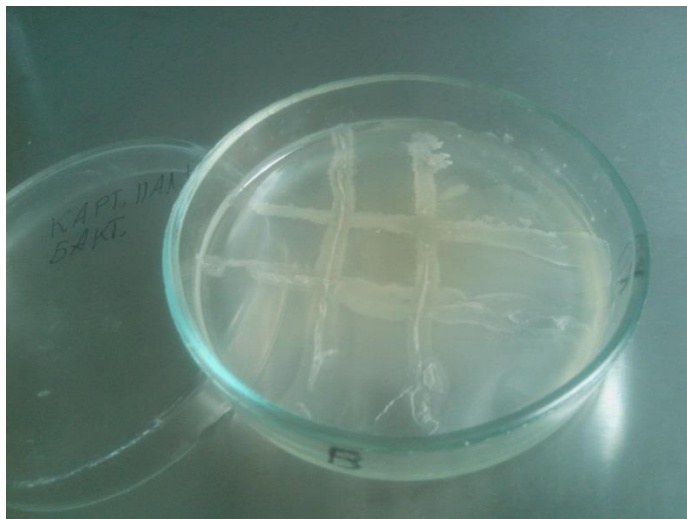


Рис.2.9. Картофельная палочка

#### 2.1.4 Микромицеты р. *Fusarium*

Культуры микромицетов использовали для оценки фунгицидной активности микроорганизмов возбудители болезней растений.

Культуры грибов я высаживала на КГА( картофельно – глюкозный агар) см п.2.1.4, затем на середину предметного стекла наносила петлей капельку исследуемого материала, осторожно накрывали покровным стеклом, Капля должна заполнить все пространство между стеклами и не выступать за края покровного стекла.

*Fusarium* - род нитевидных грибов, часто называемой гифомицетами, широко распространенная в почве и связанная с растениями. Большинство видов являются безвредными сапробами и являются относительно большим видом почвенного микробного сообщества. Основными токсинами, продуцируемыми этими видами *Fusarium*, являются фумонизины и трихотецены. Род включает ряд экономически важных растительных патогенных видов:

*Fusarium graminearum* обычно заражает ячмень, если есть дождь в конце сезона.

*Fusarium oxysporum* f.sp. *Cubense* - грибковый патоген растений, который вызывает болезнь Панамы банана ( *Musa spp.*), Также известную как фузариозный укус банана.

*Fusarium oxysporum* f. зр. Нарцисси вызывает гниение луковиц (базальная гниль) и пожелтение листьев нарциссов ( Нарцисси ).

#### Значение:

*F. oxysporum* играет роль молчаливого убийцы - патогенные штаммы этого гриба могут быть бездействующими в течение 30 лет, прежде чем заразить растение. Кроме того, *F. Oxysporum* могут вызывать заболевание почти на всех сельскохозяйственных предприятиях. *F. oxysporum* оказывается невероятно жестким для искоренения. Наиболее эффективным решением является стерилизация почвы. Споры *F. oxysporum* могут сохраняться в воздухе в течение длительных периодов времени, поэтому обработка фунгицидами не является полезным методом контроля.

#### Структура клеток, метаболизм и жизненный цикл

Поскольку *F. oxysporum* является грибом, он представляет собой химико-гетеротроф, что означает, что он получает свою энергию из химических веществ (химиотроф), используя органические субстраты, такие как лактат и ацетат, как доноры электронов (органотроф) и получает его от органических источников (гетеротроф). *F. oxysporum* способен продуцировать микотоксины. *F. oxysporum* также характеризуется тремя типами бесполовых спор:

Микроконидии. Конидии меньшего размера, 1-2 клетки, более распространенные и часто продуцируемые грибы при любых условиях.

Макроконидии. Большие конидии, которые содержат от 3 до 5 клеток, постепенно заострены и изогнуты к концам.

Хламидоспоры. Имеют одну или две клетки, круглые, толстостенные споры, продуцируемые либо терминально, либо интеркалярные на более древнем мицелии или в макроконидиях

#### Цикл болезней

Здоровые растения заражаются *F. oxysporum*, когда почва, в которой они растут, заражена грибом. Грибок продолжает вторгаться в растение

либо с помощью спирангиальной зародышевой трубкой, либо с помощью мицелия. Корни могут быть инфицированы непосредственно через кончики корней, через раны в корнях или в точке образования боковых корней

*Aspergillus* имеет многоядерный . ветвистый мицелий. Клетки мицелия многоядерные, иногда встречается воздушный мицелий. У большинства аспергиллов плесневый налет состоит из конидиеносцев с конидиями. Конидиеносцы отходят вверх от особых клеток мицелия - опорных клеток. У разных видов конидиеносцы имеют различные размеры, могут представлять собой одну клетку или, реже, иметь перегородки, у немногих ветвятся. У большинства аспергиллов конидиеносцы бесцветны, как и гифы мицелия, а у некоторых (например, у представителей групп *A. nidulans*, *A. ochraceus*) они коричневатые или желтоватые. Оболочки их у большинства гладкие, у немногих (группа *A. ochraceus*, *A. effusus* из группы *A. nidulans*) шиповатые. Верхняя часть конидиеносца вздувается, образуя пузырь, у большинства округлый, у отдельных видов в различной степени вытянутый. (Рис. 2.10;2.11)



Рис. 2.10 Объект микромицета под микроскопом с яблока (годовой давности)



Рис. 2.11 Объект микромицета под микроскопом с листьев (годовой давности)

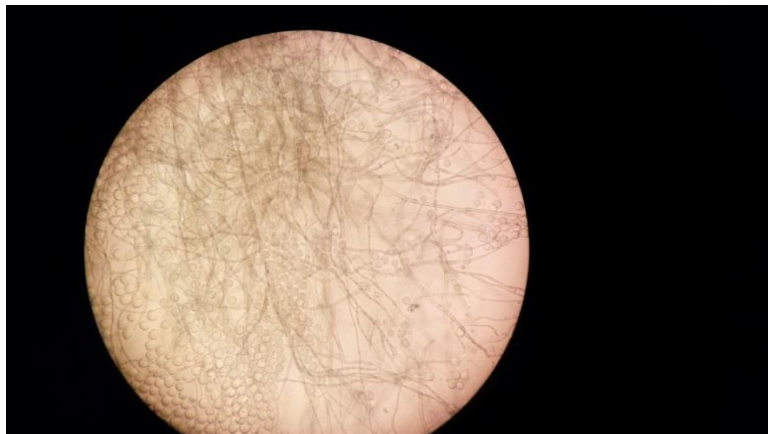
Грибы рода *Fusarium* имеют конидиальное спороношение, у них два типа конидий: макроконидии и микроконидии.

Макроконидии образуются в воздушном мицелии на простых или ветвящихся конидиеносцах, или представляют собой скопления массы конидиеносцев в виде спородохийев, или образуют пионоты. У основания конидий имеется четко или слабо выраженная ножка, или конидии вовсе лишены ее.

Микроконидии образуются обычно в воздушном мицелии на простых или сложных конидиеносцах в цепочках или собраны в головки. А также в виде скопления гифов. Конидии одноклеточные, обычно овальные, яйцевидные или эллипсовидные, реже шаровидные, грушевидные, веретеновидные. (Рис 2.12; 2.13)

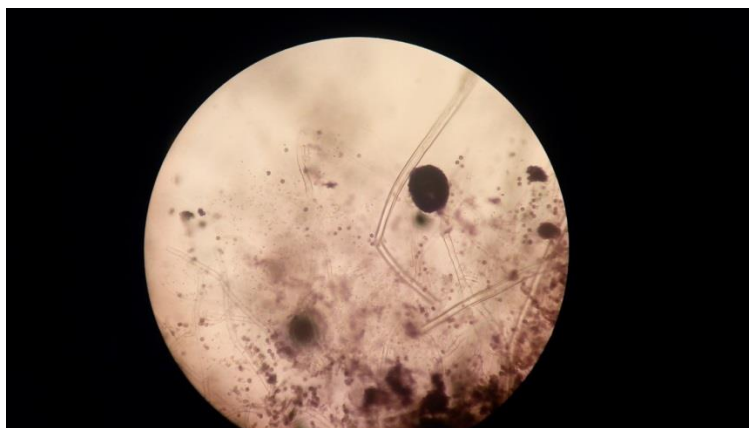


*Рис.2.12 Объект микромицета под микроскопом с капустного листа (годовой давности)*



*Рис.2.13 Объект Fusarium под микроскопом с лука (годовой давности)*

Объект гриба мучнистой росы. Конидии расположены в длинных цепях, от эллиптических до бочковидных,  $22-45 \times 14-26$  мкм. Образующиеся осенью клейстотеции разбросанные, шаровидные, неправильные,  $80-135$  мкм в диаметре, чёрно-коричневого цвета. Придатки базальные, хорошо развитые, извилистые, переплетающиеся с мицелием, иногда разветвлённые, в 1-4 раза превышающие по длине клейстотеции. Яйцевидные, редко почти шаровидные,  $40-90 \times 25-50$  мкм. Споры по 2, очень редко по 3, эллиптические до удлинённо-яйцевидных,  $18-30 \times 12-18$  мкм. (Рис.2.14)



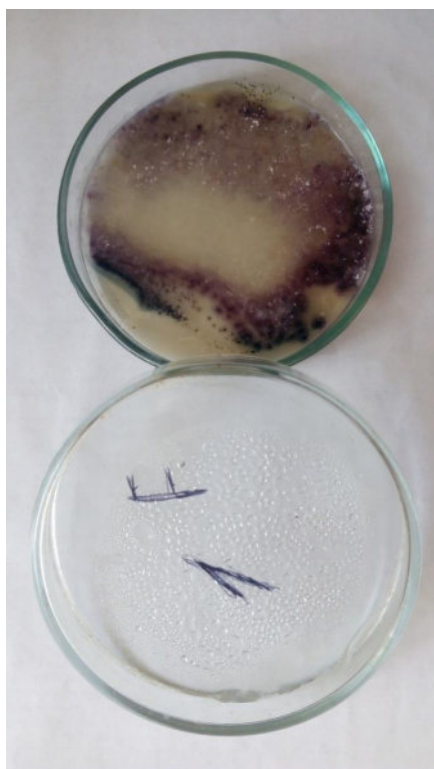
*Рис.2.14 Объект микромицета под микроскопом мучнистая роса (годовой давности)*



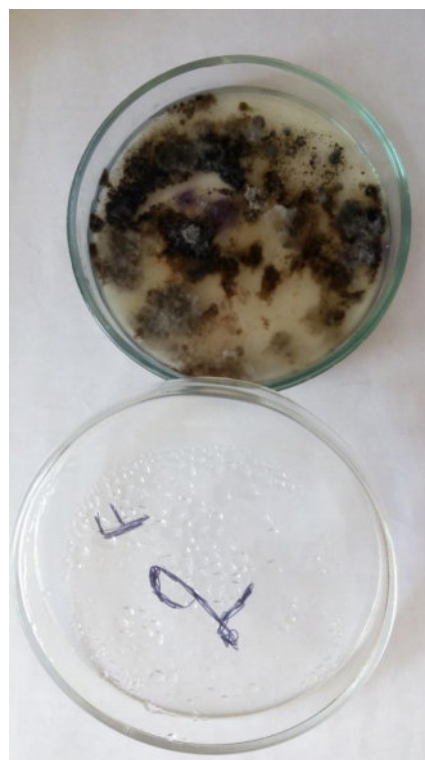
Выделены из природной среды микроорганизмы – остатки растений годичной давности (яблоко, листья деревьев, капустный лист, лук, мучнистая роса)

Грибные патогены выращивали 5-7 суток на картофельно-глюкозном агаре (КГА), - 400 г картофеля, глюкоза 20 г, агар 20 г, вода дистиллированная 1 л. см п. 2.1.2. (Среды культивирования)

На первом этапе скрининга мы культивировали разнообразные микромицеты, выделенные из природных источников, так как известно, что природным резервуаром возбудителей фитопатогенов очень часто являются и почва и растительные остатки. Отобранные образцы суспендировали в стерильной дистиллированной воде в соотношении 1:100



*Рис. 2.15. Микромицеты выделенные с яблока, КГА,  $t=30^{\circ}\text{C}$*



*Рис.2.16 Микромицеты выделенные с листьев деревьев, КГА,  $t=30^{\circ}\text{C}$*

Из каждой пробы на отдельную чашку Петри с питательной средой КСА высевали тощим газонм фитопатогенные грибы. В контрольном варианте все грибы имели плотную структуру мицелия с хорошо разветвлен-

ными гифами по всей поверхности питательной среды. Чашки подсушивали при комнатной температуре 2 часа. Чашки Петри с посевами инкубировали при комнатной температуре в течение 10 суток. После окончания инкубирования отбирали колонии микромицетов, которые доводили до состояния чистой культуры. [14]

Для определения микромицетов использовали определитель Литвинова М.А. [17]

В результате и всего разнообразия грибов были отобраны представители рода *Fusarium*, учитывая, что грибы этого рода являются одними из наиболее опасных фитопатогенов из-за их способности продуцировать микотоксины, в т.ч. и фитотоксины. Идентификацию до вида мы не проводили ввиду огромного разнообразия видов и патоваров гриба.

Из отобранного образца мы готовили суспензию и проводили высев разведений суспензии  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  на питательную среду для роста накопительной культуры гриба.

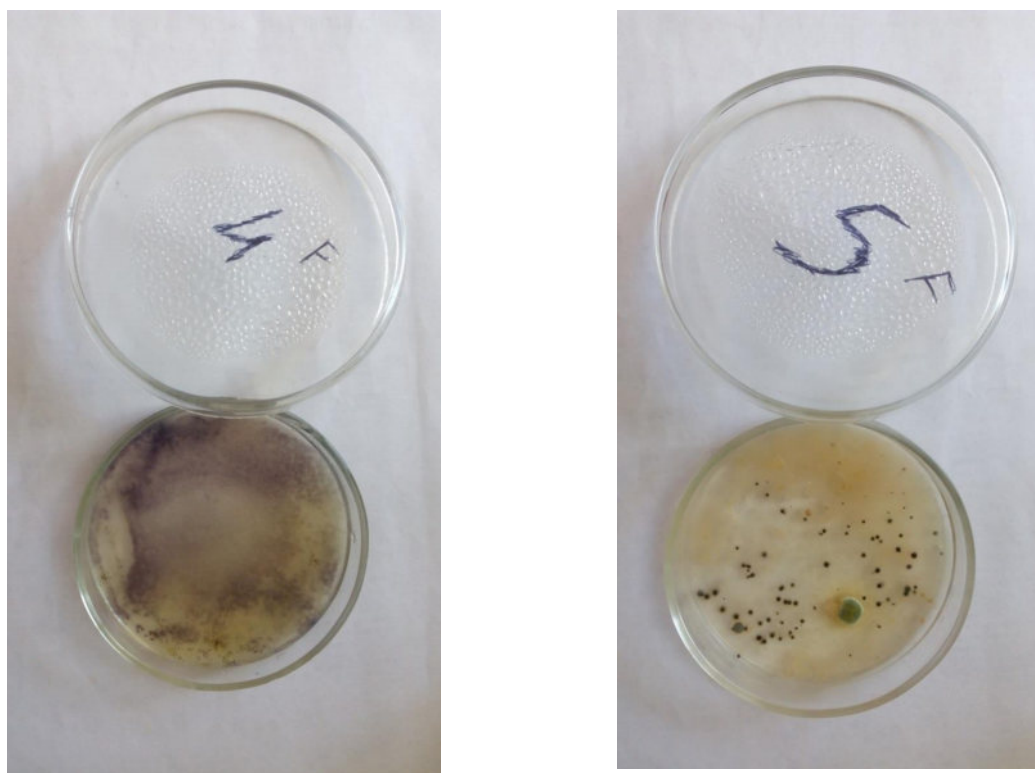


Рис. 2.18 Микромицеты выделенные

*Рис.2.17 Микромицеты выделенные с как мучнистая роса, КГА,  $t=30^{\circ}\text{C}$   
лука, КГА,  $t=30^{\circ}\text{C}$*



*Рис. 2.19 Микромицеты выделенные с капустного листа, КГА,  $t=30^{\circ}\text{C}$*

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно на рост и развитие микроорганизмов, в том числе, и фунгицидных веществ, оказывают влияние не только компоненты питательной среды, но и условия культивирования: величина рН питательной среды, температура, аэрация, количество и возраст посевного материала. Изучение влияния этих факторов позволяет определить оптимальные условия культивирования и максимальный фунгицидную активность.

#### 3.1 Изучение культурально-морфологических свойств *Bacillus subtilis*, штамм ИПМ 215 и штамм М-22 ВИЗР

Культурально морфологические свойства *Bacillus subtilis* мы изучали с помощью общепринятых микробиологических методов - фиксировали цвет, размер, консистенцию колоний на плотной среде, гладкость краёв, прозрачность, провели окрашивание мазков по Граму, оценили подвижность клеток в препарате «раздавленная капля». На Рис. 2.15 мы видим прямые палочки с закругленными концами которые находятся в цепочках, ширина примерно 0,7-1 мкм., ширина 1,7-3 мкм., опираясь на литературные данные можно сделать вывод, что это *Bacillus subtilis*.



Рис. 3.1 *Bacillus subtilis*»

### 3.2 Влияние факторов внешней среды на культивирование *Bacillus subtilis*

#### *Влияние температурного режима*

Существенное значение для роста микроорганизмов имеет такой фактор внешней среды, как температура. Исследуемые штаммы *Bacillus subtilis* (штамм ИПМ 215 и штамм М-22 ВИЗР) микроорганизмов культивировали на плотных питательных средах в течение 2 суток при температурах от 37°C до 10°C. При 10 °C *B.subtilis* переходили в покоящуюся форму образуя споры. Оценку скорости роста колоний бактерий определяли по изменению диаметра отдельных колоний. В результате проделанной работы установлен температурный оптимум для культивирования штаммов: *B. subtilis* штамм ИПМ 215 - 29°C, *B. subtilis* М-22 ВИЗР – 34°C.

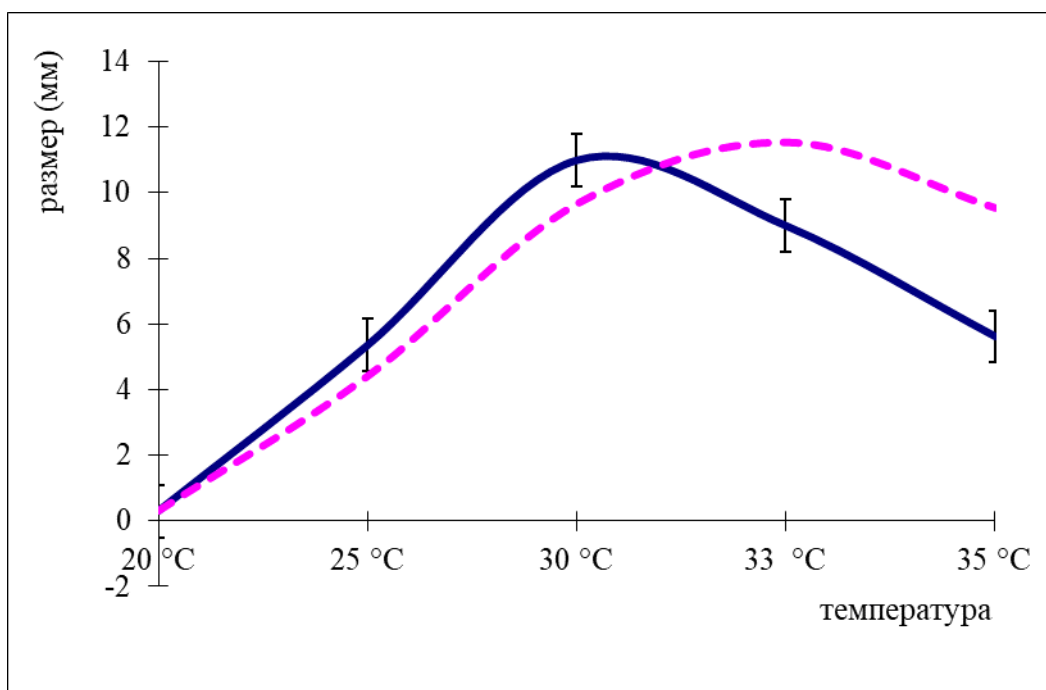


Рис.3.2 Влияние температуры на рост *Bacillus subtilis*, штамм ИПМ 215 (сплошная линия) и штамм М-22 ВИЗР (пунктирная линия)

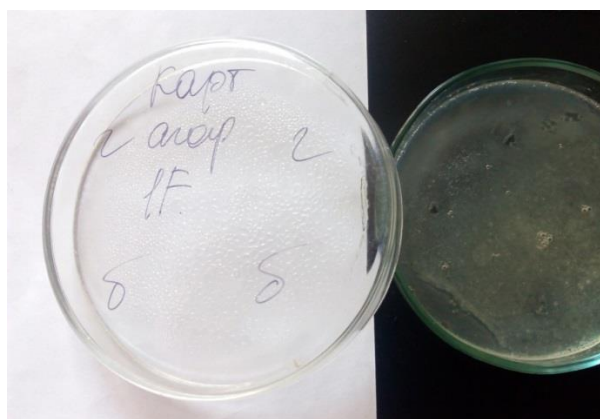
При оптимальных температурах штаммы *B.subtilis* имеет типичные морфологические и культуральные признаки: палочки обладают шириной 0,7-1,0 мкм, длиной 1,7-3,0 мкм, споры шириной 0,7-0,9 мкм, длиной 1,1-



1,9 мкм. Форма спор эллиптическая, преобладающее положение спор центральное, раздутия спорангия нет.

На всех твердых питательных средах вначале формируются мелкие колонии белесоватые неправильной формы. На вторые сутки роста на КСА вырастают белесые крупные плоские колонии с неровными краями и с шероховатой поверхностью, которые позже становятся бежевого цвета с блеском.

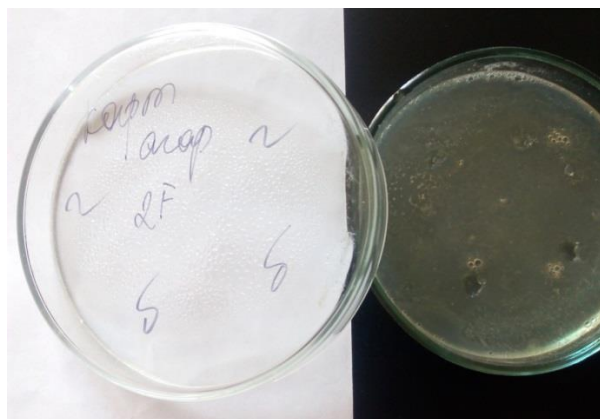
На мясопептонном агаре образуются плоские беловатые колонии с фестончатым краем, матовой поверхностью, середина колонии блестящая, почти прозрачная. Через неделю колонии становятся блестящими, приобретают бежевый цвет.



*Рис. 3.3 Объект с яблока + бактофит и гамаир, среда МПА,  $t=30^{\circ}\text{C}$*



*Рис.3.4 Объект с капустного листа + бактофит и гамаир, среда МПА,  $t=30^{\circ}\text{C}$*



*Рис. 3.5 Объект с листьев + бактофит и гамаир, среда МПА,  $t=30^{\circ}\text{C}$*



*Рис.3.6 Объект с яблока,  $t=30^{\circ}\text{C}$*

### *Влияние времени культивирования*

В ходе исследований кинетики роста штаммов установлено, что оптимальным сроком культивирования для штамма *B. subtilis* М-22 ВИЗР является 36-48 ч., для штамма *B. subtilis* ИПМ 215 – 24-36 ч. Именно в указанных диапазонах отмечен максимальный рост колоний.

### *Влияние pH среды*

Одним из важных факторов, определяющих нормальный рост бактерий, является реакция pH среды. При изменении ее в неблагоприятную сторону микроорганизм перестает расти даже в тех случаях, если все остальные условия окружающей среды будут оптимальными.

Определен оптимальный pH для выращивания бактериальных культур: *B. subtilis* штамм М-22 ВИЗР 6,4 и для штамма ИПМ 215 - 8,1. Лимитирующим оказалось значение реакции среды 4,0, при котором выживали лишь единичные клетки.

Таким образом, для роста колоний штамма *Bacillus subtilis* оптимальными оказались следующие условия роста:

<i>Bacillus subtilis</i>	Температура (°C)	реакция pH среды	срок культивирования (ч)
штамм ИПМ 215	29 ± 0,5 °C	8,1 ± 0,4	24-36 ч
штамм М-22 ВИЗР	34 ± 1,2 °C	6,4 ± 0,2	36-48 ч



Рис.3.7 Среда МПА, Ph=5

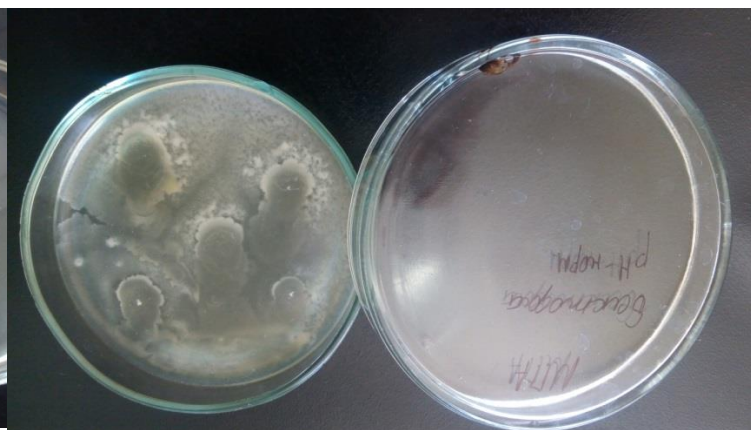


Рис.3.8 Среда МПА,  
Ph=8(бактофит)



Рис. 3.9 Среда МПА, Ph=7(гаммаур)



Рис.3.10 Среда МПА, Ph=8

### 3.3 Изучение биологической активности штаммов *Bacillus subtilis*

#### Определение фитотоксичности штаммов *Bacillus subtilis*

Фитотоксичность штаммов оценивали по морфометрическим показателям проростков семян огурца сорта «Конкурент» и пшеницы сорта «Безенчукская 380». Семена растений предварительно стерилизовали 70 % -ным раствором этилового спирта в течение 1,5-2 мин, затем промывали дистиллированной водой и высушивали в ламинарном шкафу. После чего их помещали в стерильные чашки Петри и заливали стерильной дистиллированной водой для набухания. Через 24 ч семена помещали между слоями фильтровальной бумаги и инокулировали замачивали в течение 2 час в суспензиях суточной культуры клеток исследуемого штамма разведенной



до титра 107 КОЕ/мл. В контрольном варианте семена выдерживали в дистиллированной воде. В каждом варианте использовали по 20 семян. После обработки семена раскладывали на увлажненную дистиллированной водой фильтровальную бумагу, выдерживали в термостате при температуре 28 °С, постоянно увлажняя. Через сутки оценивали всхожесть семян, а через 4 суток проростки морфометрировали, измеряя длину корней и ростков.

В ходе исследования установлено, что инокуляция семян *B. subtilis* вызывала стимуляцию формирования проростков. При обработке семян штаммами происходило увеличение длины проростков в 1,4 раза по сравнению с контролем.

- Энергию прорастания и всхожести семян определяли посредством подсчета количества проросших семян в опытных образцах и контроле (ГОСТ 12038-84, 1984). Оценку ростостимулирующего действия изучаемых штаммов производили путем измерения длины корней и зеленых проростков семян, обработанных бактериальной суспензией, и соответствующих показателей в контроле. При определении морфометрических параметров массу и длину корня и проростка в контрольной группе принимали за 100%. Анализ данных показал, что, штаммы антагонистов ИПМ 215 и штамм М-22 ВИЗР не оказывают негативного влияния на всхожесть семян огурца, пшеницы и не вызывают увядания проростков. (табл. 1).

Таблица 1. Результаты всхожести семян огурца и пшеницы после инокуляции штаммами *Bacillus subtilis*, штамм ИПМ 215 и штамм М-22 ВИЗР

Инокулянты	Всхожесть семян огурца, %	Всхожесть семян пшеницы, %
<i>B. subtilis</i> , штамм ИПМ 215	100	98
<i>B. subtilis</i> , штамм штамм	98	97

М-22 ВИЗР		
Контроль	97	99

### *Определение бактерицидной активности штаммов *Bacillus subtilis**

В природе не исключен антагонизм PGPR не только к фитопатогенам, но и к хозяйственно полезным видам бактерий, например, ассоциативным и симбиотическим. В своей работе мы использовали культуру картофельной палочки, которая очень часто служит эталоном для определения взаимоотношений микроорганизмов. Нами было обнаружено, что штаммы *Bacillus subtilis* не ингибировали рост тестовых бактерий. Однако, для окончательных выводов необходимо протестировать все группы PGPR бактерий.

### *Время культивирования *Bacillus subtilis*, штамм ИПМ 215 и штамм М-22 ВИЗР*

Фунгицидную активность штамма *B. subtilis* (штамм М-22 ВИЗР) в зависимости от сроков культивирования, определяли по площади зарастания питательной среды патогенным грибом. Посев грибов рода *Fusarium* проводили уколом в центр чашки со средой КСА, посев PGPR - внесением бактериальной суспензии в объеме 25 мкл в предварительно подготовленные отверстия диаметром 8 мм. Микроорганизмы наносили на разные стороны чашки Петри, причем и бактерии и микромицеты были разного срока культивирования. Далее в процентах оценивали площадь зарастания питательной среды (КСА). Полученные результаты представлены на диаграмме (Рис.3.11 )

Установлено, что максимальная фунгицидная активность штамма *Bacillus subtilis* проявляется через 72–96 часов культивирования, а устойчивость грибов рода *Fusarium* возрастает со временем культивирования.

Интересно отметить, максимальная фунгицидная активность *Bacillus subtilis* не совпадает по срокам с оптимумом культивирования.

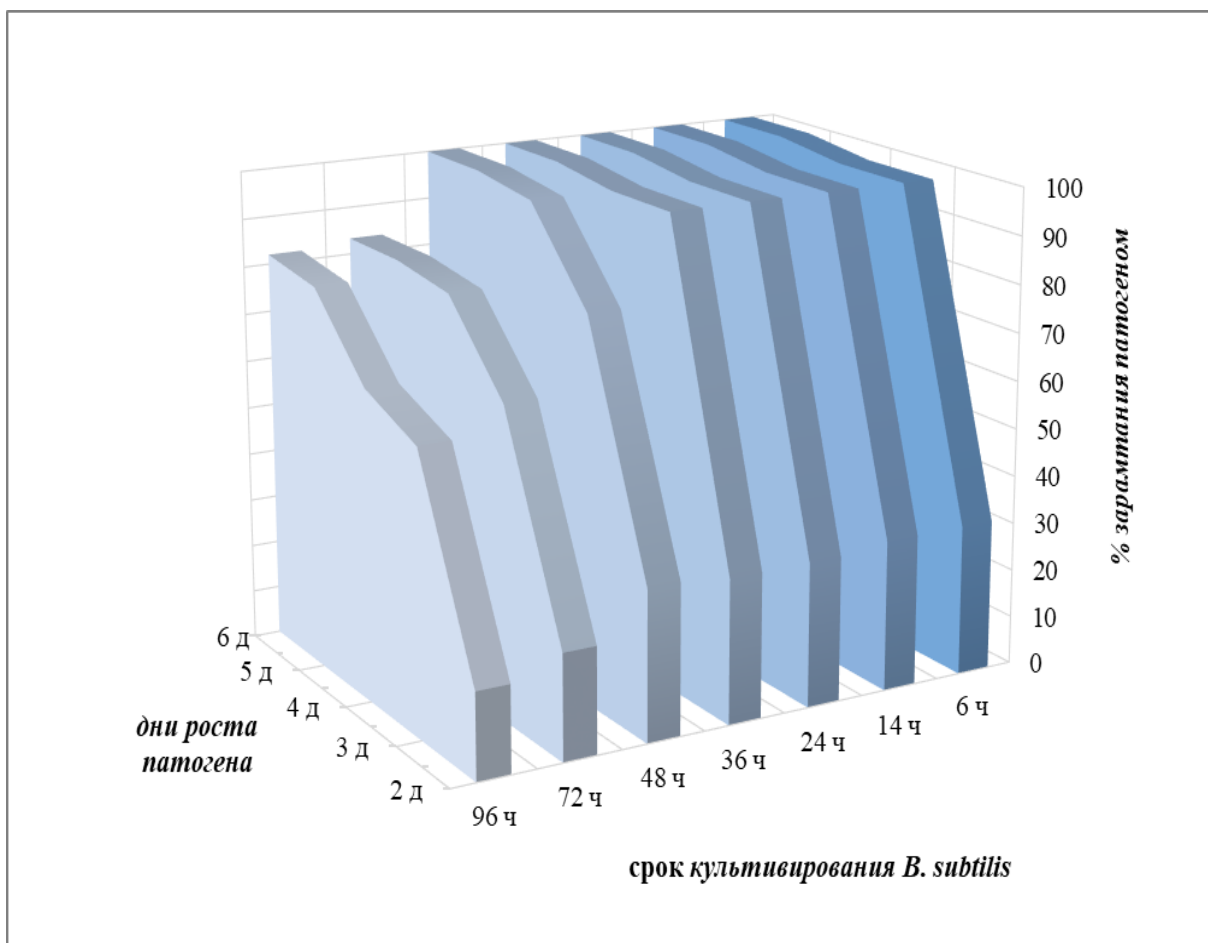


Рис. 3.11 Фунгицидная активность штамма *B. subtilis* в зависимости от сроков культивирования микроорганизмов

## ВЫВОДЫ

1. Для роста колоний штамма *Bacillus subtilis* оптимальными оказались следующие условия роста:

<i>Bacillus subtilis</i>	Температура (°C)	реакция pH среды	срок культиви- рования (ч)
штамм ИПМ 215	$29 \pm 0,5$ °C	$8,1 \pm 0,4$	24-36 ч
штамм М-22 ВИЗР	$34 \pm 1,2$ °C	$6,4 \pm 0,2$	36-48 ч

2. Инокуляция семян *B. Subtilis* не только не оказывают фитотоксичного эффекта на семена, но и вызывает стимуляцию формирования проростков до 40 % сравнению с контролем.
3. Фунгицидная активность *B. subtilis* меняется в зависимости от сроков культивирования бактерий и возраста грибов рода *Fusarium*. Максимальная фунгицидная активность штамма *Bacillus subtilis* проявляется через 72–96 часов культивирования.

Неоднозначная реакция разных видов грибов р. *Fusarium* на действие микробов-антагонистов отмечена в ряде исследований. Возможно это можно объяснить неодинаковыми значениями факторов внешней среды, что в свою очередь меняет физиологические свойства как микромицетов, так и бактерий.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авраменко И. Ф. Микробиология. М.: Колос, 1970.
2. Акимова Е.Е. Исследование влияния бактерий *Pseudomonas* sp. На фитопатогенные грибы и высшие растения: дис. ...канд.биол.наук. Томск, 2007.
3. Аникиев В.В., Лукомская К.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: «Просвещение», 1977.
4. Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas* способствующие росту и развитию растений Соросовский образовательный журнал.-1998-№10.
5. Бурова Ю.А., Ибрагимова С.А., Ревин В.В. Действие культуральной жидкости бактерии *Pseudomonas aureofaciens* на развитие семян пшеницы и фитопатогенных грибов, Известие ТулГУ.-2012 - Естественные науки №3.
6. Возняковская Ю.М. Использование метода идентификации бактерий в исследованиях ризосферной микрофлоры и ее роли в жизни растений. Труды ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии.-1980.-№49.
7. Воробьев А.В., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М. Микробиология. 2003 г.
8. Гажеева Т.П., Гордеева Т.Х., Масленникова С.Н. Динамика численности и состава микроорганизмов ризосферы некоторых злаковых растений в процессе их роста и развития. Вестник ОГУ.- 2011.-№12.
9. Глушанова Н.А., Блинов А.И., Бахаев В.В. Об антагонизме пробиотических лактобацилл // Эпидемиология и инфекционные болезни, №6, 2004. – С.37-39.
10. Горбунов О.П. Бактерии рода *Pseudomonas* - углеродный цикл, защита и стимуляция растений Вестник Института биотехнологии и физико-химической технологии им. Ю.Л. Овчинникова 2008 т.4 №1

11. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология: Учебник для студентов биологических специальных ВУЗов. - "Академия, 2003.
12. Дикий И.Л. и соавт. Микробиология. Харьков, 1999.
13. Долгих Я.В., Несчисляев В.А., Белова И.В. Сравнительная характеристика поликомпонентных пробиотиков // Вестнику Уральской Медицинской Академической науки. – 2011. - №4/1. -С.97.
14. Иванова Е.Ю. Микробиология: Учебно-методическое пособие. - Воронеж: Изд-во ВГУ, 2004.
15. Инструкция по предупреждению картофельной болезни хлеба. Разработана ГосНИИХП РАСХН. Введена в действие с 15.10.98 г.
16. Котова И.Б., Нетрусов А.И. Общая микробиология: Учебник для вузов. - Академия, 2007.
17. Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения // Н.А. Красильников.- М.: Изд-во АН СССР, 1958.
18. Лабораторный практикум по микробиологии / Авт.-сост.: М.П. Сардаева. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2000.
19. Леонов Н. Р. Практикум по микробиологии. М.: Агропромиздат, 1988.
- 20.. Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. М.: Наука, 1967,- С. 140-185.
21. Мавроди Д.В., Ксензенко В.Н., Чатуев Б.М. и др. Структурно-функциональная организация генов *Pseudomonas fluorescens*, кодирующих ферменты биосинтеза феназин-1-карбоновой кислоты // Молекуляр. биология. 1997.
22. Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов/Под. ред. Д. Г. Звягинцева. М.: Изд. МГУ, 1966.
- 23.. Методы выделения, исследования и определения антибиотической активности микроорганизмов, обладающих антибиотическими свойствами : методические указания к практическим работам по дисци-

- плине «Антибиотики» для студентов специальности «Микробиология» / И. С. Держинская. - Астрахань : Издательство АГТУ, 2005. - 76 с.]
24. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Под ред. А.А. Воробьева. М., 2004.
  25. Мишустин Е.М., Емцев Е.Т Микробиология: Изд-во АГПИ, 1987.
  26. Мордухова Е.А., Кочетков В.В., Поликарпова Ф.Я., Боронин А.М. Синтез индолил-3-уксусной кислоты ризосферными псевдомонадами : Влияние плазмид биodeградации нафталина // Прикл. биохимия и микробиология. 1998.
  27. Моргун В.В. Ростостимулирующие ризобактерии и их практическое применение / В.В. Моргун, С.Я. Коць, Е.В. Кириченко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т41 №3.
  28. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наук. думка, 1990.
  29. Пиневиц, А.В. Микробиология прокариот / А.В. Пиневиц. – Спб.: Изд-во Спб ГУ, 2009.
  30. Пошон Ж., Бержак де Г. Почвенная микробиология. М., 1960.
  31. Соколов М.С., Литвишко Е.В. Биологическая защита растений в США // Защита растений. 1993.
  32. Стейниер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Д. Мир микробов в 3-х томах. М. Мир . 1979.
  33. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии./ Пер. с венг. И.Ф. Куренного. Под ред. Г.С. Муромцева. М.: Колос. 1983
  34. Теппер Е. З. и др. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г. И. Переверзева. М.: Колос, 1979.
  35. Тульчинская, В.П., Юргелайтис, Н.Г. Растения против микробов. - Киев, 1987.



36. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация / М.М. Умаров.- М.: МГУ. – 1986.
37. Франк Р.И., Кищенко В.И. Биопрепараты в современном земледелии // Защита и карантин растений , 2008.
38. Фрейман В.Б., Глушакова А.И., Соломатина П.С. и др. Прогрессивные методы производства энтомопатогенных препаратов М., 1981.
39. Холод Н.А. Болезни земляники на юге России // Защита и карантин растений , 2013. №10.
40. Холодная Ж.В. Разработка технологии получения протеолитического ферментного комплекса из бактерий рода *Bacillus* . Дис... канд .биол. наук Уфа, 1999.
41. Цветкова В.П., Штерншис М.В. Сортоустойчивость картофеля к колорадскому жуку / Инф.Бюлл. ВПРС МОББ №39, 2009.
42. Чеботарь В.К., Петров В.Б., Шапошников А.И., Кравченко Л.В. Биохимические критерии оценки агрономически значимых свойств, бактерий, используемых при создании микробиологических препаратов // С-х биология , 2011. №3.
43. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений СПб.: СПбГУ, 2002.
44. Чиликин В.М., Рудиков С.Н., Алибеков К.Б., Румянцев В.А. Интенсификация технологии получения энтомопатогенных препаратов// Проблемы создания и применения микробиологических средств защиты растений М., 1989.


**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ**  
**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение**  
**высшего образования**

**ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

Факультет  
физико-математических  
и естественных наук

Кафедра  
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки  
06.04.01 Биология  
Магистерская программа  
«Физиология растений»

Утверждаю:  
Зав. кафедрой  
 Г.А. Карпова  
« 10 » 11 2015 г.

**Задание**

По ВКР студента Пыхтуновой Ксении Юрьевны

Тема работы «Культуральные свойства PGPR-бактерий»

Утверждена приказом по Университету от « 30 » 10 2015 г. № 1168/0

Срок сдачи студентом законченной работы « 22 » 05 2017 г.

# КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Выбор темы и обоснование ее актуальности. Определение объектов изучения	ноябрь 2015	выполнено
2.	Сбор и анализ литературных данных. Написание обзора литературы.	декабрь 2016 - март 2017	выполнено
3.	Изучение методик выделения почвенных и ризосферных микроорганизмов и выбор соответствующих сред культивирования	март 2016	выполнено
4.	Изучение культурально-морфологических свойств микроорганизмов	апрель 2016	выполнено
5.	Изучение влияния факторов внешней среды на культивирование микроорганизмов	октябрь 2016	выполнено
6.	Изучение биологической активности штаммов <i>Bacillus subtilis</i>	декабрь 2016	выполнено
7.	Анализ экспериментального материала. Написание экспериментальной главы	февраль 2017	выполнено
8.	Подготовка доклада для защиты ВКР	май 2017	выполнено
9.	Проверка ВКР в системе «Антиплагиат»	май 2017	выполнено
10.	Сдача оформленных и переплетенных экземпляров ВКР	май 2017	выполнено

Дата выдачи задания: 10.11.2015

Руководитель:  Заплптин Б.П.

Задание принял к исполнению: 