

На правах рукописи

ЧЕТВЕРИКОВ СЕРГЕЙ ПАВЛОВИЧ

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ НЕКОТОРЫХ
ШТАММОВ *Pseudomonas* spp. И ТЕХНОЛОГИЯ БИОПРЕПАРАТОВ
НА ИХ ОСНОВЕ**

**03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии),
03.01.04 - биохимия**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Уфа 2012

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институт биологии Уфимского научного центра РАН

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Логинов Олег Николаевич
доктор биологических наук, профессор
Мелентьев Александр Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Кудоярова Гюзель Радомесовна
доктор биологических наук, профессор
Хайруллин Рамиль Магзинурович
доктор биологических наук, профессор
Чернова Ольга Александровна

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

Защита состоится 30 марта 2012 г. в 14⁰⁰ часов на заседании Объединенного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций ДМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г.Уфа, Проспект Октября, 69. Тел/факс: 8(347) 235-62-47, e-mail: ib@anrb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 69, с авторефератом – в сети Интернет по адресу <http://www.anrb.ru/inbio/dissovet/index.htm> и на сайте ВАК Минобрнауки РФ.

Автореферат разослан _____ 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



Р.В. Уразгильдин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Бактерии рода *Pseudomonas* – одна из наиболее изученных групп микроорганизмов с точки зрения объектов биологического контроля почвенных фитопатогенов и обладающих совокупностью полезных для растений свойств (Рубан, 1986; Смирнов, Киприанова, 1990; Боронин, 1998; Логинов и др., 2001; Weller, 1988; Dowling & O’Gara, 1994; Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Whipps, 2001).

Устойчивость растений к заболеваниям, вызываемым почвенными фитопатогенами, во многом определяется результатами взаимодействия между корневой системой растений и разнообразными микроорганизмами. Активная секреция клетками корня различных веществ обеспечивает питательными субстратами микроорганизмы, образующие с ними прочные ассоциации. В свою очередь, ризосферные бактерии обладают целым рядом механизмов, определяющих их способность ингибировать развитие почвенных фитопатогенов: это, в первую очередь, синтез антифунгальных метаболитов, конкуренция за питательные субстраты и поверхность корней, а также индукция защитных систем растений.

Одним из факторов, позволяющих воздействовать на фитопатогенные микроорганизмы, заселяющие ризосферу растений, является продукция бактериями различных низкомолекулярных веществ, таких как сидерофоры и антибиотики. За последнее десятилетие учеными обнаружены и выделены новые метаболиты бактерий рода *Pseudomonas*, обладающие фунгицидной активностью, такие как фураноны, аеругин, меркапто-4-формилкарбостирил и др. (Shoji et al., 1990; Sokol et al., 1992; Lee et al., 1994; Jiao et al., 1996; Moon et al., 1996; Gamard et al., 1997; Suzumura et al., 1997; Thrane et al., 1999; Nielsen et al., 1999; Nielsen et al., 2000; Paulitz et al., 2000; Kim et al., 2000; Fakhouri et al., 2001; Sorensen et al., 2001; Quail et al., 2002; Lee et al., 2003), что в какой-то мере можно связать с привлечением новых физико-химических методов анализа. Эти антигрибные метаболиты имеют различную химическую структуру и некоторые из них обладают способностью к комплексообразованию с экзометаболитами растений, образуя с ними стабильные комплексы, недоступные для использования фитопатогенами, что приводит к ограничению их роста. Однако эта способность для метаболитов бактерий рода *Pseudomonas* практически не изучена. В тоже время, установление механизмов действия метаболитов бактерий рода *Pseudomonas* на фитопатогены необходимо для разработки эффективных способов защиты растений.

С другой стороны широкомасштабное использование в сельском хозяйстве биопрепаратов на основе ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* сдерживается отсутствием стандартных технологий их производства. Нужно отметить, что при производстве биопрепаратов на основе бактерий рода *Pseudomonas* для практического использования в агробиотехнологии одной из главных проблем является высокая стоимость питательной среды.

Использование для оптимизации параметров технологии производства биопрепаратов в качестве методического аппарата методов математического планирования эксперимента позволяет не только одновременно изучить действие нескольких факторов на интересующий исследователей процесс, но и количественно оценить степень этого влияния. Что в итоге позволит производить высокоэффективные биопрепараты с высокой антигрибной и ростстимулирующей активностями даже с использованием в качестве компонентов сред вторичного сырья, например, автолизатов отработанных пивных дрожжей.

Учитывая, что потребность сельского хозяйства в средствах защиты растений увеличивается с каждым годом, проблема совершенствования технологии биологической защиты растений также представляется актуальной.

Цель исследования. Целью работы явилось определение биологической роли экзометаболитов бактерий рода *Pseudomonas* в их взаимодействии с фитопатогенными грибами, установление их химической природы, а также разработка технологии промышленного культивирования псевдомонад для производства сельскохозяйственных биопрепаратов на их основе.

Задачи исследования:

1. Выделить биологически активные метаболиты исследуемых штаммов *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 51, *P. chlororaphis* ИБ 6 и *P. putida* ИБ 17, исследовать их физико-химические свойства, определить состав и структуру.

2. Изучить способность комплексообразования метаболитов штаммов *Pseudomonas* с различными углеводами, органическими кислотами и аминокислотами, входящими в комплекс экссудатных выделений корней растений, а также с катионами тяжелых металлов: меди, цинка, кадмия, свинца.

3. Установить стехиометрические составы комплексов метаболит : экссудат, метаболит : катион. Оценить комплексообразующую способность триглицеридпептидов бактерий рода *Pseudomonas* как одного из механизмов их ингибирующего воздействия на фитопатогены.

4. Выявить условия максимальной продукции цитокининов штаммом бактерий *P. chlororaphis* ИБ 6 в зависимости от состава питательной среды, определить их химическую структуру.

5. Изучить влияние условий культивирования и отдельных компонентов питательной среды на накопление биомассы и продукцию метаболитов штаммами *Pseudomonas*. Определить оптимальный состав ферментационных сред для культивирования штаммов с максимальной антигрибной активностью и высоким титром клеток.

6. Оптимизировать условия периодического и непрерывного промышленного культивирования штаммов *Pseudomonas*.

Научная новизна.

Впервые показана способность триглицеридпептидов псевдомонад образовывать межмолекулярные комплексы с компонентами, входящими в корневые экссудаты растений: углеводами, органическими кислотами, аминокислотами, тем самым, лимитируя по субстрату фитопатогены. Установлено, что процесс комплексообразования триглицеридпептидов и компонентов экссудатов растений является одним из механизмов, ограничивающих развитие фитопатогенов в ризосфере сельскохозяйственных растений.

Впервые показано, что метаболиты псевдомонад способны к образованию ассоциатов различного стехиометрического состава с ионами тяжелых металлов: меди, цинка, кадмия и свинца.

Разработаны новые питательные среды (Патент РФ № 2303061, 2007) и технологии промышленного культивирования бактерий рода *Pseudomonas* для производства биопрепаратов сельскохозяйственного назначения с высокой антигрибной и ростстимулирующей активностью.

Практическая значимость.

Определены условия максимальной продукции и активности метаболитов фунгицидной природы *Pseudomonas*, что может быть использовано при производстве биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных растений.

Разработаны новые экономичные питательные среды и подобраны оптимальные условия для промышленной наработки биопрепаратов на основе бактерий рода *Pseudomonas*, предназначенных для защиты сельскохозяйственных растений.

Установленная комплексообразующая способность метаболитов бактерий *Pseudomonas* с ионами металлов позволяет рекомендовать применение препаратов на их основе для снижения загрязнения почв.

Основные положения, выносимые на защиту:

- исследуемые штаммы *Pseudomonas* spp. синтезируют новые экзометаболиты, обладающие фунгицидной и фитогормональной активностью;
- комплексообразование триглицеридпептидов с компонентами экссудатов растений является одним из механизмов, ограничивающих развитие фитопатогенов в ризосфере сельскохозяйственных растений;
- триглицеридпептиды способны к образованию ассоциатов различного стехиометрического состава с ионами тяжелых металлов: меди, цинка, кадмия и свинца;
- новые экономичные ферментационные среды на основе автолизатов отработанных пивных дрожжей для промышленной наработки биопрепаратов сельскохозяйственного назначения на основе бактерий рода *Pseudomonas* с максимальной антигрибной активностью и высоким титром клеток;

- технология промышленного культивирования бактерий рода *Pseudomonas* для производства биопрепаратов сельскохозяйственного назначения с высокой антигрибной и ростстимулирующей активностью.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на XV, XIX и XX Международных научно-технических конференциях «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии» (Уфа, 2002, 2006, 2008), I и II Международных конгрессах «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2002, 2003), II Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов» (Москва, 2003), семинаре-презентации инновационных научно-технических проектов «Биотехнология – 2003» (Пушино, 2003), IV Всероссийской научной INTERNET-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био-и органической химии и биотехнологии» (Уфа, 2005), . IV Всероссийской научной internet-конференции (Уфа, 2006), I Всероссийской научно-практической конференции «Питательные среды и методы культивирования клеток для биологии, медицины и биоиндустрии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Пушино, 2007), II съезде микологов России «Современная микология в России» (Санкт-Петербург, 2008), 5-м Всероссийском научно-практическом совещании-семинаре, (Анапа, 2008), Международной научно-технической конференции «Китайско-российское научно-техническое сотрудничество. Наука-образование-инновации» (КНР, Харбин – Санья, 2008).

Публикации. По материалам работы опубликовано 34 научных работы, в том числе 16 работ в журналах, рекомендованных ВАК.

Личный вклад автора. Все результаты, представленные в работе, получены при непосредственном участии автора в период с 1999 по 2011 г. Планирование и проведение экспериментов, обработка и анализ полученных результатов, подготовка публикаций.

Структура и объем работы. Диссертация включает введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследований, экспериментальную часть (три главы), заключение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 335 ссылок. Работа изложена на ____ страницах машинописного текста и содержит ____ рисунков и ____ таблиц.

Благодарности. Автор выражает огромную признательность всем сотрудникам лаборатории биологически активных веществ Института биологии Уфимского научного центра РАН за постоянную поддержку при выполнении данной работы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами изучения являлись штаммы бактерий *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 51 (Патент РФ № 2203945, 2003), *P. chlororaphis* ИБ 6 (Патент РФ № 2260951, 2005) и *P. putida* ИБ 17 (Патент РФ № 2213774, 2003) из Коллекции микроорганизмов Института биологии Уфимского научного центра РАН, проявляющие антагонистические свойства в отношении ряда грибов – возбудителей болезней растений.

В качестве тест-объектов для анализа фунгицидной активности в работе использовали следующие фитопатогенные грибы: *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker (= *Helminthosporium sativum* Pam., King et Bakke), *Fusarium culmorum* ВКМ 844, *F. gibbosum* ВКМ 848, *F. graminearum* ВКМ 1668, *F. nivale* ВКМ 3106, *F. oxysporum* ВКМ 137, *F. semitectum* ВКМ 1938, *F. solani* ВКМ 142, *F. avenaceum* ВКМ 132, а также *Alternaria alternata* и *Penicillium funiculosum* из Коллекции микроорганизмов Института биологии Уфимского научного центра РАН.

Культуры *Pseudomonas* поддерживали на агаризованной среде Кинг В (King et al., 1954). Для поддержания и культивирования микроскопических грибов использовали жидкую и агаризованную среды Чапека (Теппер и др., 1972).

Оптимизацию состава ферментационной питательной среды проводили с применением метода математического планирования эксперимента (Максимов, Федоров, 1969) в два этапа:

- построение адекватной математической модели процесса путем связывания выходного параметра системы (антигрибная активность, титр клеток) с входными - концентрациями компонентов (факторов) питательной среды в полных факторных экспериментах (ПФЭ) по плану 2^4 с их варьированием на двух количественных уровнях (верхнем "+" и нижнем "-");
- нахождение собственно оптимального состава среды по схеме "крутого восхождения".

В качестве 4 факторов варьирования были взяты концентрации в питательной среде глицерина (X_1), дрожжевого автолизата (X_2), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (X_3), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (X_4). Уровни варьирования представлены в табл. 1, содержание остальных компонентов ферментационной среды было зафиксировано на постоянном уровне. Культуры выращивали при 28°C и $n=180 \text{ мин}^{-1}$ на воздушно-термостатируемой качалке УВМТ-12-250 в течение трех суток.

Таблица 1

Компоненты питательной среды и их уровни варьирования в ПФЭ 2^4

Компонент среды	Фактор	Средний уровень «0»	Нижний уровень «-»	Верхний уровень «+»	Единица варьирования
Глицерин, г/л	X_1	11,00	2,00	20,00	9,00
Дрожжевой автолизат, л/л	X_2	0,13	0,01	0,25	0,12
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, г/л	X_3	5,50	1,00	10,00	4,50
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, г/л	X_4	1,50	0,50	2,50	1,00
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, г/л	Постоянный уровень – 1,50				
FeCl_3 , г/л	Постоянный уровень – 0,01				

Оптимизацию условий культивирования проводили в ферментерах АК-210 (СКБ БП, Пушкино) с рабочим объемом 6 л, количество посевного материала 2% по объему, аэрация - 0,5 объема воздуха в 1 мин на 1 объем

среды также с применением метода математического планирования эксперимента на вновь разработанных средах. Для изучаемых штаммов были проведены полные факторные эксперименты по плану 2^3 .

В качестве 3 факторов варьирования были взяты аэрация (X_1^1), температура (X_2^1) и продолжительность культивирования (X_3^1), уровни варьирования представлены в табл. 2.

Таблица 2

Условия культивирования и их уровни варьирования в ПФЭ 2^3

Условия культивирования	Фактор	Средний уровень «0»	Нижний уровень «-»	Верхний уровень «+»	Единица варьирования
Перемешивание, об/мин	X_1^1	160	140	180	20
Температура, °С	X_2^1	28	26	30	2
Продолжительность культивирования	X_3^1	72	48	96	24

Титр жизнеспособных клеток определяли методом предельных разведений на агаризованной среде Кинг В (King et al., 1954).

Для получения автолизата отработанные пивные дрожжи подвергали термической обработке при 100 °С в течение 1 часа. Затем дрожжевой автолизат фильтровали и доводили рН до 6,8-7,2.

В качестве модельных компонентов корневых экссудатов растений использовали вещества квалификации ч.д.а. (Sigma, США), представленные в табл. 3.

Таблица 3

Типичные представители корневых экссудатов растений
(Dakora., Phillips, 2002; Haas, Keel., 2003)

Углеводы	Органические кислоты	Аминокислоты
Арабиноза	Яблочная кислота	Аланин
Ксилоза	Фумаровая кислота	Метионин
Фруктоза	Янтарная кислота	Валин
Глюкоза	Лимонная кислота	Аргинин
Галактоза	Пировиноградная кислота	Тирозин
Сахароза	Молочная кислота	Цистеин
Лактоза	Пропионовая кислота	Аспарагин
Рафиноза	Кетоглутаровая кислота	Лизин
Рамноза	Щавелевая кислота	Пролин
Маннит		Триптофан

Выделение метаболитов с антигрибной активностью *Pseudomonas* проводили следующим образом. После удаления биомассы на центрифуге “K23 D” (3000 g, 20 мин) супернатант подвергали ультрафильтрации на модулях волоконного типа “Amicon 3P-10” (США), отбирая фильтрат, содержащий фракцию (≤ 3 кДа) внеклеточных метаболитов исследуемых штаммов. Фильтрат упаривали на вакуумном роторном испарителе при 35°C, примеси осаждали метанолом и отделяли центрифугированием в тех же условиях. После отгонки метанола из супернатанта, изучаемые вещества осаждали ацетоном.

Чистоту и гомогенность выделенных метаболитов проверяли при помощи ВЭЖХ в системе, состоящей из насоса высокого давления модели 572P (“Gasukuro Kogyo”, Япония), УФ - детектора (“Du Pont”, США). Для разделения использовали колонку из нержавеющей стали с сорбентом (размер зерна 5 мкм) Zorbax-ODS (250x4,6 мм, “Shimadzu”, Япония). Образцы вводили с помощью дозатора модели 7125 (“Rheodyne”, США) с петлей объемом 20 мкл. В качестве элюента использовали воду, подвергнутую дополнительной очистке, при скорости элюции 1,0 мл/мин. Регистрировали поглощение при длине волны 254 нм.

Молекулярную массу выделенных метаболитов оценивали при помощи эксклюзионной хроматографии в системе, описанной выше, на колонке TSK G2000SW (300x7,8 мм, “Toyo Soda”, Япония) при элюировании смесью 0,1 М фосфата натрия и 0,3 М хлорида натрия (рН 7,0) с расходом 1 мл/мин с УФ - детектированием при 254 нм. В качестве маркеров молекулярной массы использовали инсулин (Mr 5,8 кДа, “Lilly”, Франция) и витамин B₁₂ (Mr 1355 Да, ЗАО “Верофарм”, Россия).

Аминокислотный анализ кислотных гидролизатов (6н. HCl, 24 ч, при 105°C) метаболитов был выполнен на анализаторе T339M (Чехословакия).

Элементный состав метаболитов определяли на C, H, N – анализаторе HP Model 185 B (США) и по общепринятым методикам (Климова, 1967).

УФ – спектры регистрировали на спектрофотометре Specord M40 (“Carl Zeise”, Германия) в области 200-330 нм (в воде), ИК – спектры – на спектрофотометре Specord M80 (“Carl Zeise”, Германия) в области 400-4000 см⁻¹ (в вазелиновом масле или в тонком слое).

Масс-спектры химической ионизации были получены электрораспылением (электроспрей) на квадрупольном жидкостном хромато-масс-спектрометре LCMS-2010 EV (“Shimadzu”, Япония) (шприцевой ввод, раствор образца в ацетонитриле или в воде при расходе 60 мкл/мин, элюент – ацетонитрил/вода в соотношении 50/50).

Спектры ЯМР ¹³C регистрировали на спектрометре Bruker AMX-III-300 (Германия) (рабочая частота 300,13 МГц), внутренний стандарт – тетраметилсилан (ТМС), растворитель - CD₃OD. Расшифровку спектров проводили при помощи программы ChemNMR Pro.

Фитогормональную активность определяли при помощи иммуноферментного анализа (Кудоярова и др., 1986, 1990).

Способность штаммов *Pseudomonas* к росту и наличие антагонизма в отношении фитопатогенных грибов изначально определяли методом совместного выращивания антагонистов и фитопатогенов в чашках Петри на среде Чапека с различными источниками углерода. Суспензию спор тест-гриба высевали на агаризованную среду, а исследуемую культуру вносили, делая посев уколом поверх газона гриба. Чашки инкубировали в термостате в течение трех суток, при температуре 28 °С. Антагонизм выявляли по наличию вокруг колонии бактерии зоны подавления роста тест-гриба.

Антигрибную активность низкомолекулярных (НМ) фракций метаболитов (≤ 3 кДа) и очищенных образцов метаболитов определяли методом разведений (Широков и др., 2002). В пробирки вносили 0,25-3,0 мл препарата фракции метаболитов, либо препарата метаболита с концентрацией 1,2 мг/мл, добавляли 1 мл суспензии спор тест-гриба, 1 мл шестикратно концентрированной среды Чапека и дистиллированную воду до общего объема 6 мл. Засеянные пробы инкубировали при 28°С. Подавление роста гриба оценивали микроскопически относительно контроля, представляющего собой вышеописанную систему, но без внесения метаболитов. В качестве единицы активности принимали такое количество фракции метаболитов, при котором гриб не развивался в течение 4 суток. Антигрибную активность метаболитов в зависимости от химической природы экссудатных компонентов оценивали, как описано выше методом разведений, используя в качестве тест-объекта, возбудитель корневой гнили зерновых культур *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (= *Helminthosporium sativum* Pam., King et Bakke).

Морфологические изменения, происходящие с микромицетами под воздействием метаболитов псевдомонад, изучали с помощью светового микроскопа "Amplival" 30 - G048a (Carl Zeiss Jena, Германия).

Комплексообразование исследовали спектрометрически в УФ – области по методу Бента – Френча (Бек, Надьпал, 1989), методом изомолярных серий (Булатов, Калинин, 1976) и поляриметрически (Будников и др., 2003).

Для исследования методом Бента-Френча готовили водные растворы, содержащие постоянное количество метаболита ($0,001$ моль/дм³) и возрастающее количество модельного экссудатного компонента (далее экссудата), соответствующее мольным соотношениям метаболит : экссудат = 1:1, 1:10, 1:20, 1:50. Спектры поглощения полученных растворов записывали на спектрофотометре SPECORD M 40 (Carl Zeiss, Германия) при длине волны 265 нм в кварцевых кюветах толщиной 1 см. Измерения осуществляли через 15 минут после смешивания реагентов в условиях равновесной реакции. В канале сравнения находился раствор метаболита. После измерения оптической плотности растворов строили графики логарифмической зависимости оптической плотности от концентрации экссудата. Угловой коэффициент этой прямой $\text{tg } \alpha$ соответствовал стехиометрическому соотношению в комплексе метаболит : экссудат.

Для исследования вторым методом готовили изомолярную серию с соотношениями метаболит : экссудат от 1:9 до 9:1 (сохраняя неизменным общий объем) и начальными концентрациями веществ $5 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³. После измерения оптической плотности растворов строили графики зависимости оптической плотности от соотношения концентраций компонентов изомолярной серии:

$$A = f (C_M / (C_э + C_M)),$$

где A - оптическая плотность раствора метаболит : экссудат;

$C_э$ – концентрация экссудата в растворе метаболит : экссудат;

C_M – концентрация метаболита в растворе метаболит : экссудат.

При выявлении точки излома на полученном графике констатировали наличие межмолекулярного взаимодействия в системе, а по расположению точки излома на графике определяли стехиометрический состав образующегося комплекса метаболит : экссудат.

Методом поляриметрии по изменению угла вращения $[\alpha]$ в зависимости от мольного соотношения метаболит:экссудат $c_э/c_M$ на поляриметре Perkin Elmer 341 (США) подтверждали стехиометрию комплексообразования. Углы вращения снимались для водных растворов метаболитов ($0,01$ моль/дм³) и экссудатов ($0,01$ моль/дм³) в соотношениях, определенных УФ-спектрометрическими методами, вблизи образования комплекса. Отклонение угла вращения смеси этих растворов от монотонного изменения угла вращения находится в зависимости от мольного соотношения компонентов в смеси и указывает на образование комплекса метаболит : экссудат и его стехиометрию.

Образование межмолекулярных комплексов с катионами металлов и их стехиометрический состав определяли при помощи инверсионной вольтамперометрии на полярографе АВС-1.1 (НТФ «Вольта», Россия) методом изомолярных серий. Изомолярную серию готовили с соотношениями ион металла:метаболит от 1:9 до 9:1 и начальными концентрациями веществ 10^{-3} моль/дм³.

Вольтамперограммы снимались при температуре 25°C с водных растворов на фоне $0,1$ моль/дм³ калия хлорида.

При выявлении точки излома на полученном графике установили наличие межмолекулярного взаимодействия в системе, а по расположению точки излома на графике определяли стехиометрический состав образующегося комплекса метаболит : катион.

Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики с вычислением средней арифметической (M), ошибки средней арифметической (m) и уравнения статистической значимости (P) по Стьюденту для нормального типа распределения признаков. Зависимость одной переменной от другой считалась статистически значимой при $p < 0,05$. Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерных программ Microsoft Office Excel, STATISTICA V 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ *Pseudomonas*,
ОБЛАДАЮЩИХ ФУНГИЦИДНОЙ И ФИТОГОРМОНАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТЬЮ

Способность штаммов *Pseudomonas* к росту и их антигрибная активность в средах с различными источниками углерода. Исследуемые штаммы бактерий рода *Pseudomonas* были способны к росту и секреции антигрибных метаболитов в средах с источниками углерода, представленными в таблице 3, что может положительно сказываться на их интеграции с растением и совместном функционировании в системе бактерии – растение – фитопатогены.

Таблица 4

Размеры зон ингибирования роста фитопатогена штаммами бактерий рода *Pseudomonas* в зависимости от источника углерода

Источник углерода	Диаметр зоны ингибирования роста гриба, мм		
	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 6	<i>P. putida</i> ИБ 17
Арабиноза	21,20±1,16	23,60±1,02	23,20±0,98
Ксилоза	13,40±1,02	13,20±0,75	13,60±1,20
Фруктоза	19,20±1,16	14,00±0,89	16,80±1,33
Глюкоза	12,60±0,81	21,40±1,02	16,40±0,80
Галактоза	13,80±1,16	13,20±1,67	11,20±1,33
Сахароза	13,20±0,97	14,40±0,80	10,80±0,98
Рафиноза	14,60±0,49	11,20±0,75	12,20±0,75
Рамноза	13,40±1,01	13,80±1,17	10,80±0,75
Маннит	13,80±0,74	21,40±1,02	16,60±0,50
Щавелевая кислота	19,60±0,81	13,80±1,17	16,40±0,80
Пропионовая кислота	12,60±0,80	21,40±1,02	16,40±0,50
Молочная кислота	14,20±0,74	13,20±1,17	10,40±0,80
Яблочная кислота	14,60±0,48	13,80±0,98	10,40±0,50
Пировиноградная	13,80±0,74	10,60±1,02	12,40±0,80
Фумаровая кислота	13,40±1,01	11,80±0,75	12,80±1,33
Янтарная кислота	20,00±1,41	15,20±1,33	16,40±1,20
Кетоглутаровая кислота	13,40±1,02	21,80±1,47	16,60±1,02
Лимонная кислота	19,80±1,17	14,80±1,33	16,20±1,17
Аланин	14,40±1,20	13,20±1,17	11,20±1,33
Валин	14,80±0,98	13,60±1,02	10,40±0,75
Пролин	15,20±0,75	10,20±1,16	14,20±0,98
Метионин	19,20±0,98	14,20±1,47	16,60±1,47
Триптофан	13,20±0,98	20,60±1,36	15,80±1,17
Тирозин	14,40±1,20	11,80±0,98	10,20±0,75
Аспарагин	12,20±1,17	12,40±0,49	13,80±0,98
Цистеин	19,40±1,02	14,20±0,98	16,40±1,41
Лизин	13,80±1,47	21,40±1,02	17,20±0,98
Аргинин	19,40±1,02	14,20±1,47	16,40±0,80
Глицерин	24,18±1,45	24,67±1,19	23,90±1,40

При совместном культивировании с микромицетом *Bipolaris sorokiniana* было выявлено, что изучаемые штаммы псевдомонад проявляли фунгистатическое действие специфично, т.е. диаметры зон ингибирования роста фитопатогена сильно варьировали в зависимости от источника углерода (табл. 4).

В условиях непосредственного взаимодействия со штаммами псевдомонад формирование мицелия всех тест-грибов значительно замедлялось по сравнению с контролем (наблюдалась задержка прорастания спор), а формирующийся мицелий грибов отличался ярко выраженными морфологическими изменениями.

Так, под воздействием штаммов-антагонистов происходило ограничение развития ростковых трубок с формированием на кончиках растущих гиф сферопластоподобных структур. Нарушения в развитии гиф приводили в свою очередь к формированию излишне разветвленного, часто септированного мицелия, напоминающего нитку бусин (рис. 1).

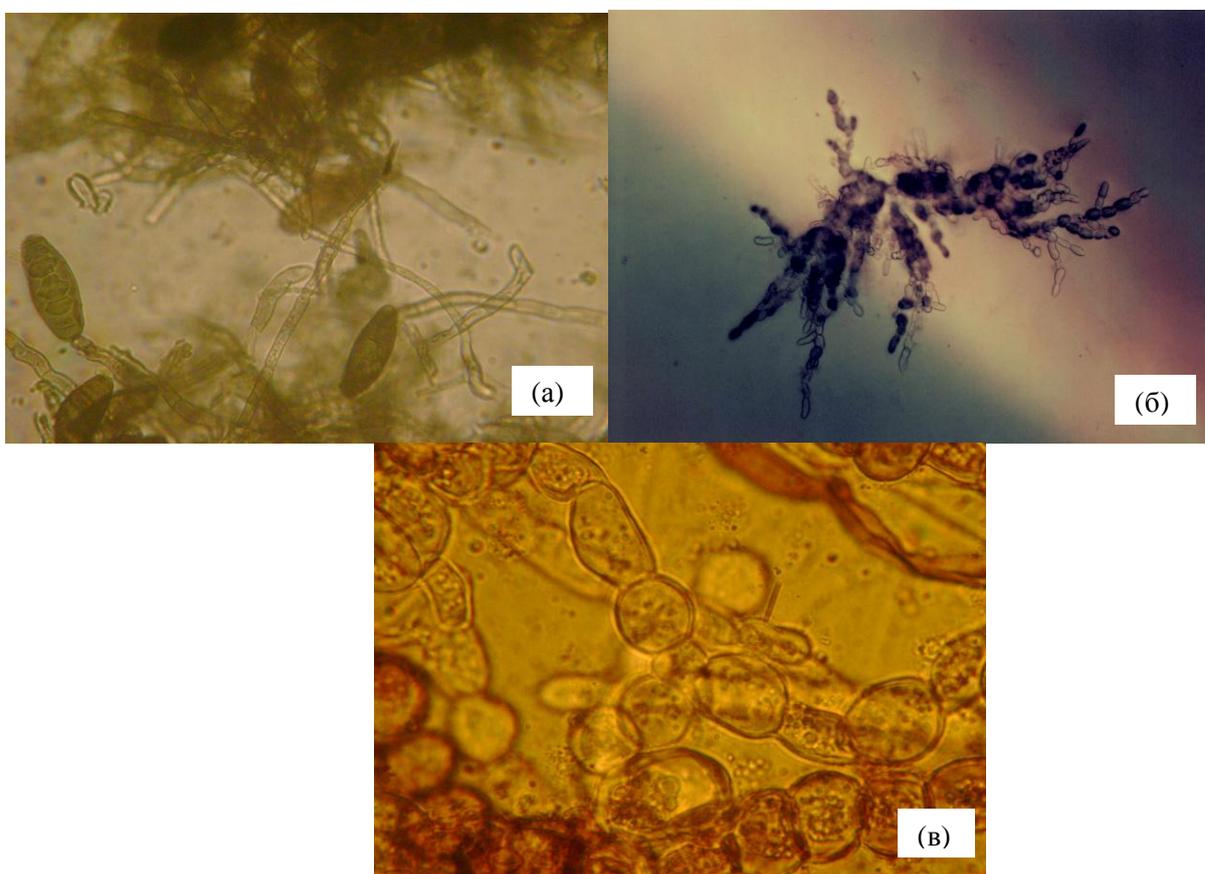


Рис. 1. Прорастание конидий и формирование мицелия *Bipolaris sorokiniana*: а – контроль; б, в – под воздействием метаболитов *Pseudomonas*; Увеличение в 400 раз (а, б); в 1600 раз (в).

В нашем эксперименте образование сферопластоподобных структур, связанное очевидно с нарушением формирования стенки гифы под воздействием метаболитов псевдомонад, стимулировало преждевременное

ветвление. В числе других особенностей воздействия псевдомонад на морфогенез грибов следует упомянуть, например, то, что некоторые микромицеты не формировали воздушный мицелий; отсутствовало спорообразование. При этом необходимо подчеркнуть, что степень воздействия на гриб определялась радиальным градиентом концентрации метаболитов бактерий-антагонистов: вне зоны действия веществ формировался обычный мицелий гриба, а чем ближе к колонии бактерии, тем ярче были выражены аномалии в строении мицелия.

Подбор оптимальных условий культивирования и биосинтез метаболитов штаммами бактерий р. *Pseudomonas*. Сравнительный анализ полученных данных подбора оптимальных условий культивирования показал, что использование в качестве источника углерода различных органических веществ существенно влияет на образование антибиотических веществ культурами *Pseudomonas*. Было установлено, что максимальное количество низкомолекулярных антибиотических веществ образуется в средах, где в качестве источника углерода фигурирует глицерин. Вторым существенным фактором для накопления в среде наибольшего количества метаболитов с антигрибной активностью является природа источника органического азота. Оптимальным в нашем случае оказалось одинаковое соотношение дрожжевого экстракта и пептона по 0,5 %, что может быть связано со сбалансированностью факторов роста, витаминов и микроэлементов, входящих в их состав.

Оптимальными для секреции метаболитов с антигрибной активностью являлись температуры в диапазоне от 22 до 30 °С. Установлено, что в подобранных оптимальных условиях культивирование при температуре 22°С позволяло штаммам интенсивно накапливать метаболиты с антигрибной активностью на завершающей стадии экспоненциального роста к 28-30 ч, в дальнейшем активность практически не изменялась до окончания культивирования (рис. 2). Причем следовые количества антибиотических веществ обнаруживались в среде уже через 8 ч культивирования.

Повышение температуры культивирования до 30°С отрицательно сказывалось на накоплении метаболитов с фунгицидной активностью. Их секреция в среду начиналась через 30 ч, антигрибная активность была невысокой и не увеличивалась до окончания культивирования.

Снижение температуры культивирования до 15°С также приводило к уменьшению образования метаболитов с фунгицидной активностью и задержке их секреции в среду (через 40 ч), что может быть связано с замедлением роста культур.

При этом, максимальный титр клеток оставался высоким вне зависимости от температуры выращивания и составлял $(6,5-7,0) \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл КЖ при 22°С и $(2,5-3,0) \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл КЖ при 15 и 30°С.

В фазе стационарного роста и при переходе в стадию отмирания культуры секретировали во внешнюю среду ростстимулирующие вещества, что, в принципе, не является новым свойством для псевдомонад. Данные

иммуноферментного анализа по секреции ростстимулирующих веществ представлены в табл. 5.

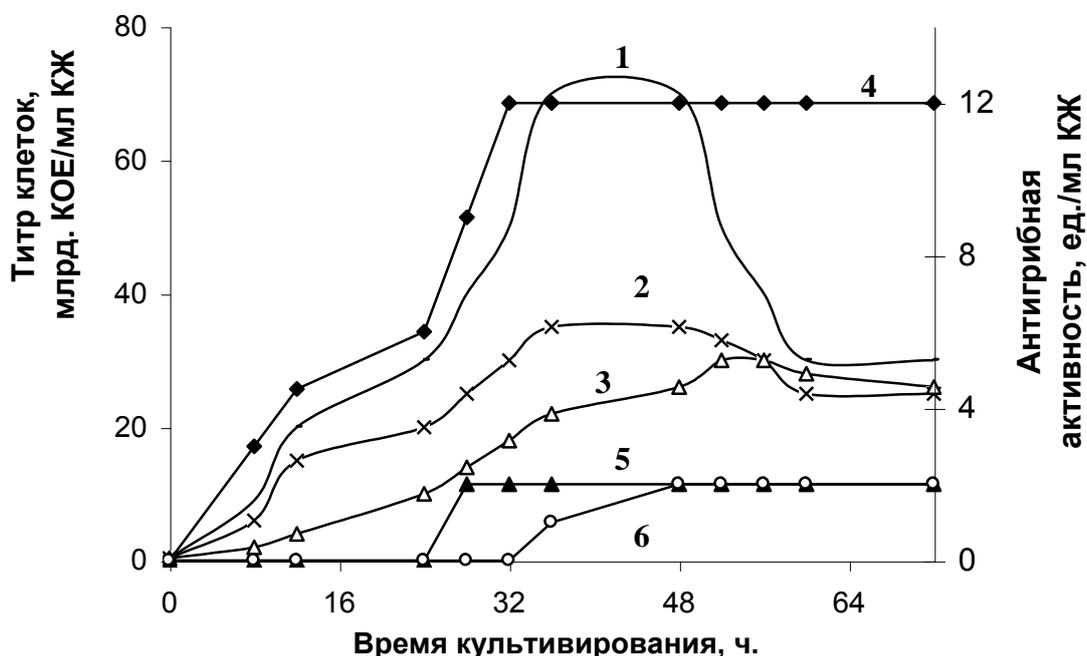


Рис. 2. Динамика периодического роста и накопления антибиотических веществ штаммом *P. chlororaphis* ИБ 51: 1-3 – титр клеток, млрд. КОЕ/мл КЖ, при температуре 22°C (1), 30°C (2) и 15°C (3); 4-6 – антигрибная активность, ед./мл КЖ, при температуре 22°C (4), 30°C (5) и 15°C (6).

Таблица 5

Ростстимулирующие вещества штаммов *Pseudomonas*

Штамм	Концентрация фитогормона, нг/мл КЖ	
	Цитокининподобные вещества	ИУК
<i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	205	878
<i>P. putida</i> ИБ 17	255	-
<i>P. chlororaphis</i> ИБ 6	680	511

Определение состава низкомолекулярных (НМ) фракций метаболитов штаммов *Pseudomonas*. Хроматографические профили НМ фракций метаболитов *Pseudomonas* представлены на рис. 3, а-в. При помощи препаративной ВЭЖХ из НМ фракций метаболитов были выделены 6 компонентов у штамма *P. chlororaphis* ИБ 51, 10 компонентов у штамма *P. chlororaphis* ИБ 6 и 11 – у *P. putida* ИБ 17 (табл. 6). Покомпонентный анализ показал, что фунгицидной активностью обладает лишь один компонент из НМ фракции метаболитов каждого изучаемого штамма *Pseudomonas*. При хроматографическом разделении эти компоненты первыми выходят с колонки,

они также не имеют ярко выраженного максимума поглощения в УФ - области. Остальные компоненты фракций за некоторым исключением имеют максимумы УФ - поглощения в интервале от 265 до 280 нм, характерные для регуляторов роста растений.

Таблица 6

Характеристики компонентов НМ фракций метаболитов штаммов
Pseudomonas

Штамм	№ компонента	λ_{\max} в УФ, нм	Фунгицидная активность	Фитогормональная активность
<i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	1	—	+	-
	2	275	-	+
	3	267	-	+
	4	267	-	+
	5	252; 257,5; 263,5	-	-
	6	267; 280	-	+
<i>P. chlororaphis</i> ИБ 6	1	—	+	-
	2	274	-	+
	3	267	-	+
	4	—	-	-
	5	—	-	-
	6	267	-	+
	7	267	-	+
	8	252; 257,5; 263,5	-	-
	9	267	-	+
	10	272	-	+
<i>P. putida</i> ИБ 17	1	—	+	-
	2	263	-	+
	3	—	-	-
	4	267	-	+
	5	272,5	-	+
	6	270	-	+
	7	268	-	+
	8	279,5	-	+
	9	—	-	-
	10	276	-	+
	11	—	-	-

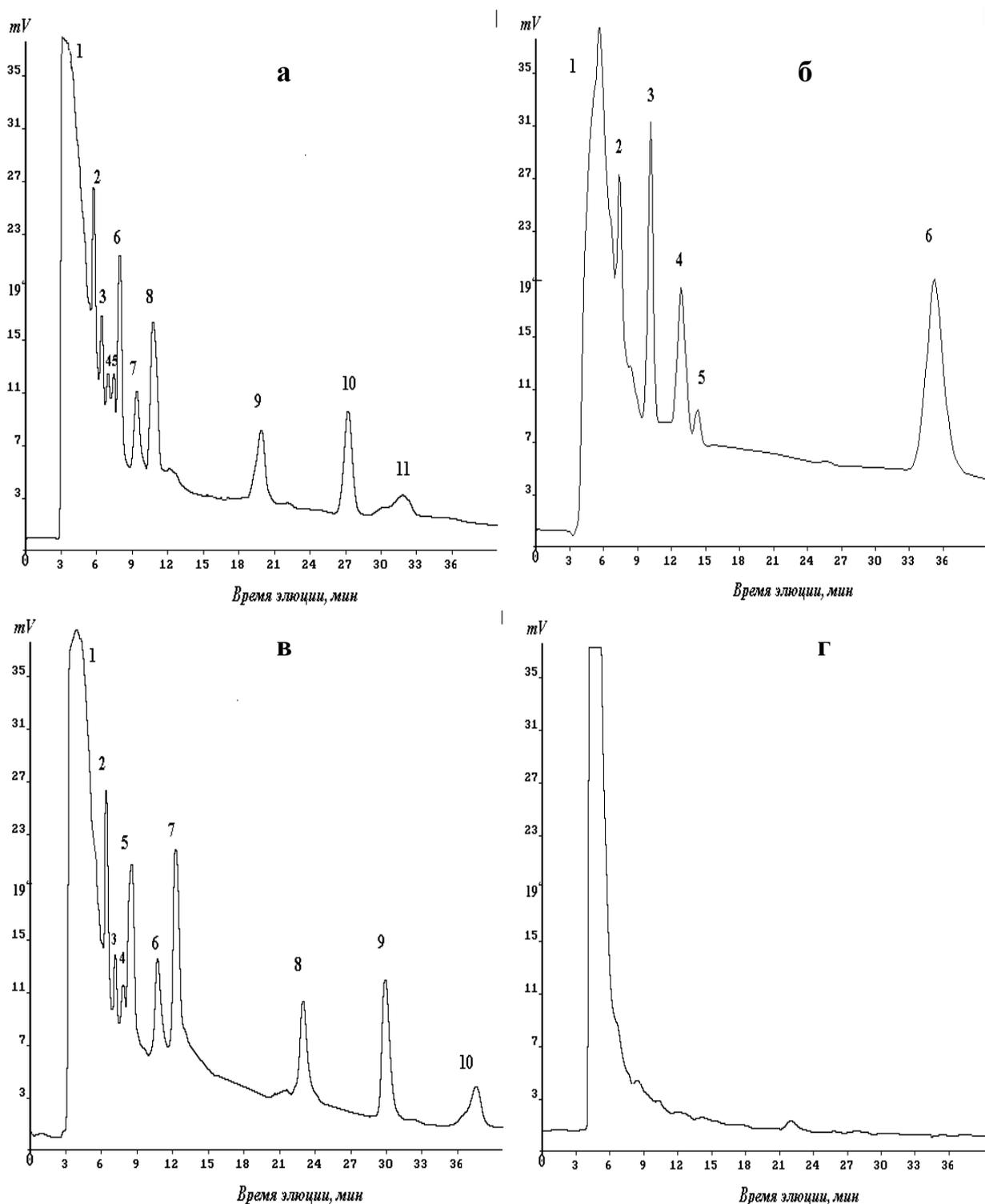


Рис. 3. Хроматографические профили НМ фракций метаболитов КЖ штаммов *Pseudomonas* (*P. putida* ИБ 17 (а), *P. chlororaphis* ИБ 51 (б), *P. chlororaphis* ИБ 6 (в)) и выделенных метаболитов этих штаммов, обладающих фунгицидной активностью (г); (ВЭЖХ, 254 нм, колонка Zorbax-ODS (250x4,6 мм, “Shimadzu”, Япония), элюент – вода). Цифрами обозначены номера компонентов фракции.

Штамм *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 6 – продуцент цитокининов.

Штамм бактерий *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 6 запатентован в качестве продуцента цитокининов. В результате оптимизации условий культивирования показано, что штамм способен синтезировать цитокинины, максимальный выход которых составляет 1117,1 нг/мл КЖ – а это в 1,5 раза превышает заявленные в патенте 680 нг/мл КЖ. Хроматографический профиль низкомолекулярной фракции образца с максимальной фитогормональной активностью представлен тремя компонентами (рис. 4). Один компонент обладает антигрибной активностью, остальные регуляторы роста растений. Причем максимум поглощения одного из исследуемых компонентов находился при длине волны 267 нм, можно было предположить, что это цитокинин зеатин, а максимальная абсорбция другого компонента цитокининовой природы наблюдалась при 257,5 нм (рис. 5).

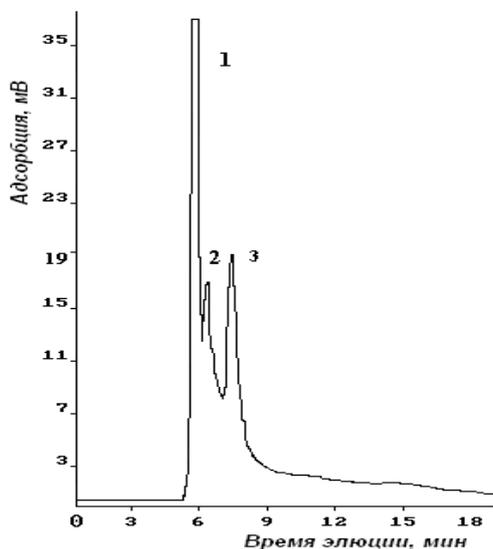


Рис. 4. Хроматографический профиль низкомолекулярной фракции культуральной жидкости с максимальной фитогормональной активностью штамма *P.*

chlororaphis ИБ 6 (ВЭЖХ, 254 нм, колонка Zorbax-ODS (250x4,6 мм, “Shimadzu”, Япония), элюент – вода). Компоненты фракций: 1 – с антигрибной активностью, 2, 3 – с фитогормональной активностью.

В дальнейшем методом хроматомасс - спектроскопии было подтверждено предположение о том, что один из компонентов с фитогормональной активностью является зеатином, ему соответствует пик с максимумом отношения массы к заряду, равным 220 (рис. 6а). Структура другого компонента представляется более интересной и новой для веществ цитокининовой природы. В результате интерпретации масс – спектра ее можно представить как три – О - пропионил - N⁶ - (Δ^2 - изопентенил)аденозин – новой формой цитокининоподобных веществ (рис. 6б) которому соответствует пик с отношением массы к заряду, равным 504. В спектре присутствуют фрагменты оснований цитокининов с m/z 136 (аденин), 204 (N⁶ - (Δ^2 - изопентенил)аденин). Наличие трипропионилрибозы обусловлено фрагментом с m/z 301, дальнейшее отщепление от которой двух молекул пропионовой кислоты приводит к фрагменту с m/z 153, последующее отщепление метилкетеновой группы – к фрагменту с m/z 97.

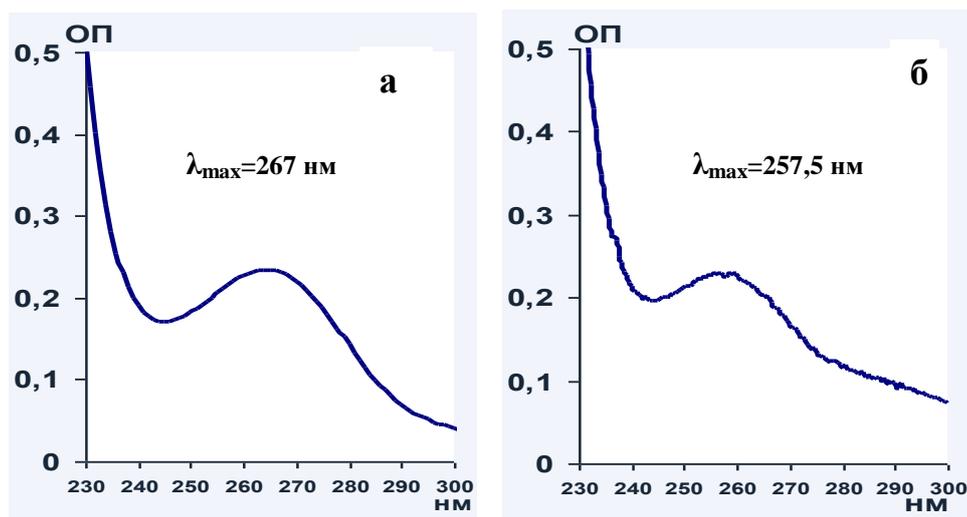


Рис. 5. УФ – спектры компонентов с фитогормональной активностью, выделенных из низкомолекулярной фракции метаболитов КЖ штамма *P. chlororaphis* ИБ 6: а – компонента 2 из рис. 4, б – компонента 3 из рис. 4.

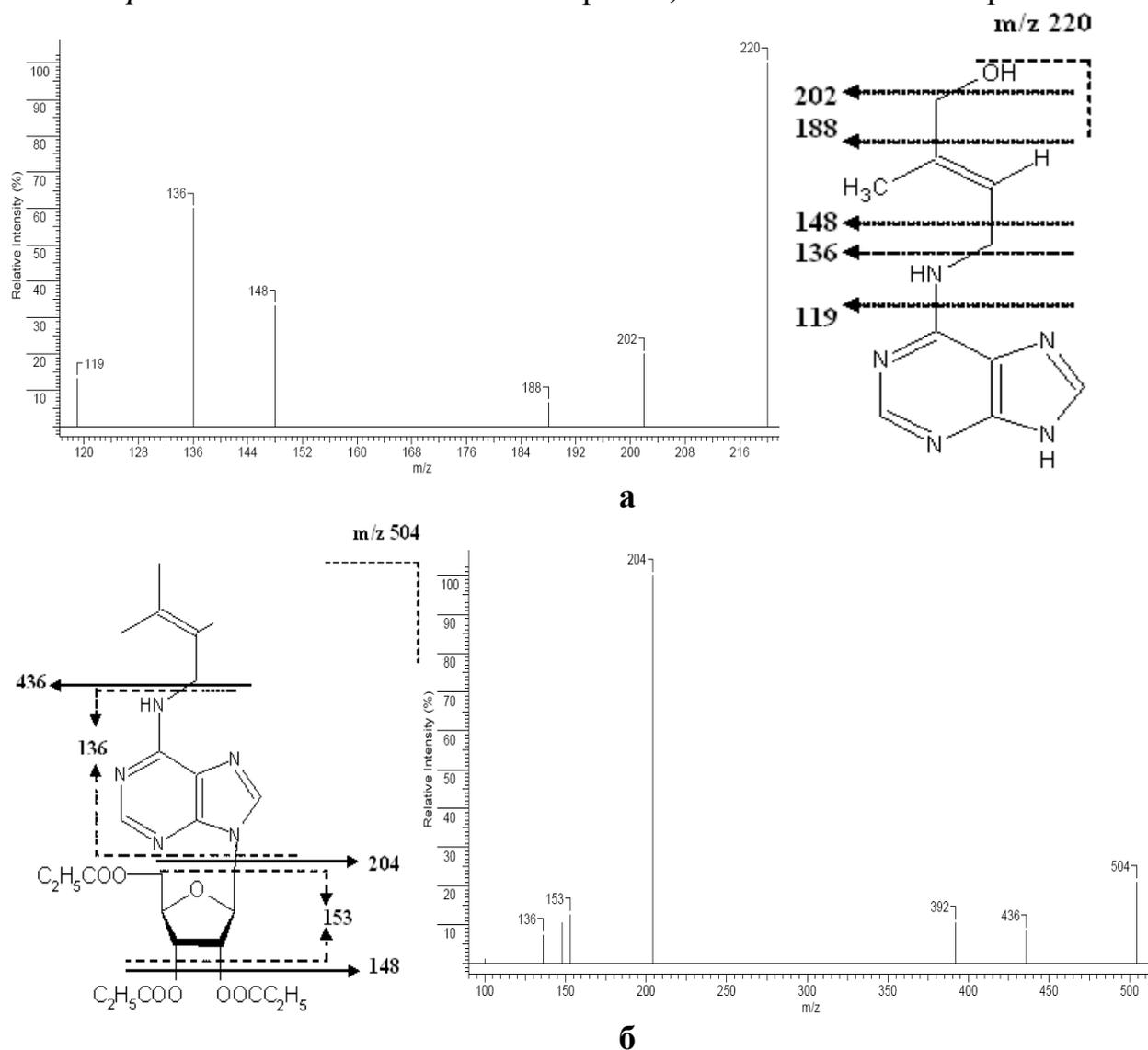


Рис. 6. Масс-спектры компонентов с фитогормональной активностью, выделенных из низкомолекулярной фракции метаболитов КЖ штамма *P. chlororaphis* ИБ 6: а – компонента 2 из рис. 4, б – компонента 3 из рис. 4.

Физико-химические свойства НМ фракций метаболитов штаммов

Pseudomonas. В интервале рН 6-9 уровень фунгицидной активности НМ фракций метаболитов штаммов *Pseudomonas* оставался максимальным и стабильным, критическими точками стабильности являлись значения рН < 4 и рН > 11, после которых активность падала больше, чем в два раза.

Максимум активности для изучаемых метаболитов штаммов *Pseudomonas* наблюдался в диапазоне температур 25 – 60°C, при температуре 70°C происходила значительная термоинактивация, но при этом 20-25 % от начальной активности у штаммов *P. chlororaphis* остается даже после инкубации при температуре 100°C. Такая картина может быть обусловлена наличием во фракциях двух компонентов, обладающих фунгицидной активностью, один из которых имеет пептидную природу и денатурирует при температуре, выше 60°C, а второй – антибиотик феназиновой природы в следовых количествах, нехарактерный для вида *P. putida*.

Выделение метаболитов штаммов Pseudomonas, обладающих фунгицидной активностью, оценка их чистоты и гомогенности.

Разработана методика выделения метаболитов, обладающих фунгицидной активностью (рис. 7).

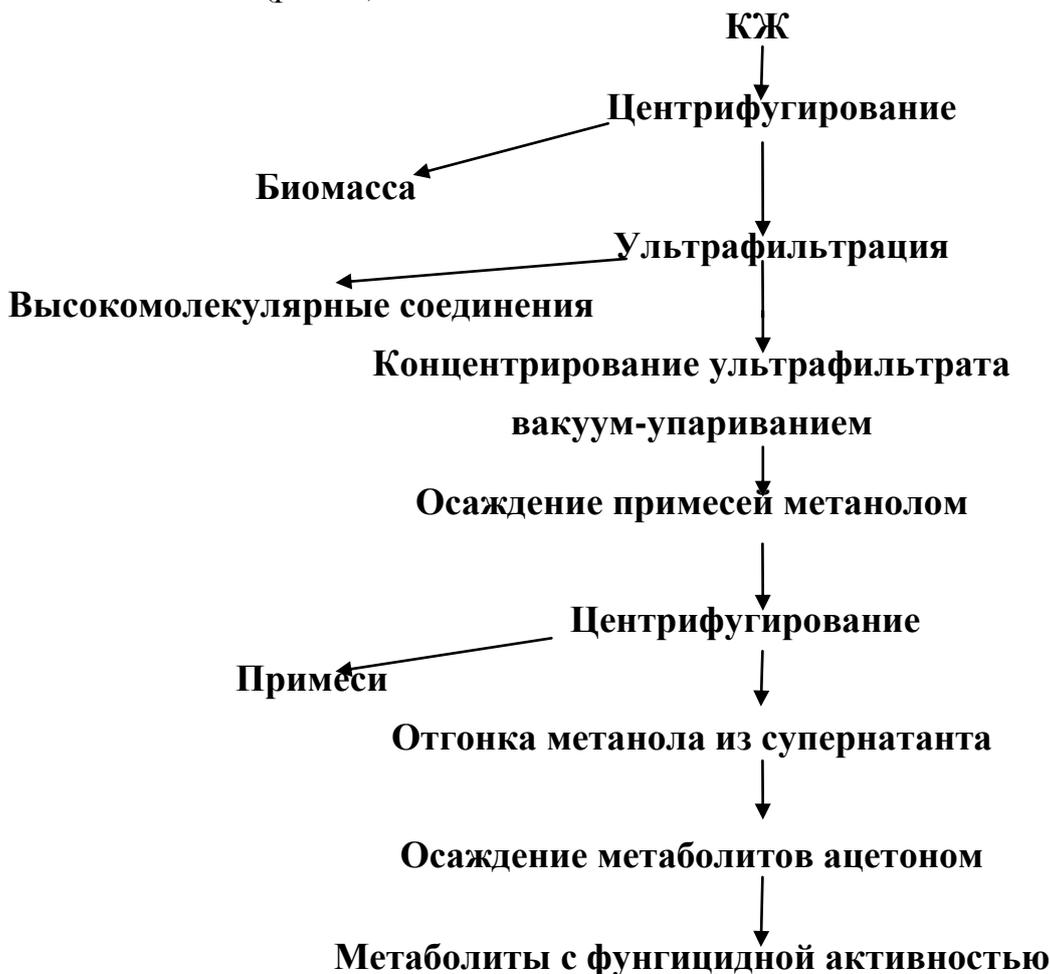


Рис. 7. Схема выделения метаболитов штаммов *P. chlororaphis* ИБ 51, *P. chlororaphis* ИБ 6 и *P. putida* ИБ 17, обладающих фунгицидной активностью.

Схема выделения метаболитов с антигрибной активностью включала в себя стадии центрифугирования, ультрафильтрации, концентрирования, осаждения примесей и осаждения метаболитов;

– центрифугирование КЖ. Стадия удаления микробных клеток из КЖ – общая стадия для всех методик по выделению экзоцеллюлярных антибиотических веществ;

– ультрафильтрация на модулях волоконного типа. Стадия избавления от высокомолекулярных соединений. Ультрафильтрации подвергаются супернатанты со стадии центрифугирования КЖ с отбором фильтратов, заведомо содержащих низкомолекулярные фракции (< 3 кДа) внеклеточных метаболитов. Эти фракции содержат 6-11 компонентов, причем, как было показано выше, антигрибной активностью обладает только один компонент каждой фракции;

– концентрирование ультрафильтрата. Эта стадия проводилась путем упаривания фильтрата на вакуумном роторном испарителе при 35°C. Степень концентрирования 20 раз;

– осаждение примесей. На этой стадии проводили осаждение солей и других остатков питательной среды в концентрате метанолом до 60 % насыщения с дальнейшим их отделением центрифугированием и отгонкой метанола из супернатанта под вакуумом;

– осаждение метаболитов, обладающих фунгицидной активностью. Заключительная стадия выделения, на которой из супернатанта предыдущей стадии, изучаемые вещества осаждали ацетоном.

В результате применения разработанной оригинальной методики выделения в хроматографических профилях элюции выделенных метаболитов присутствовал лишь один пик (рис. 3, г), по времени выхода соответствующий пикам компонентов, обладающих антигрибной активностью, причем время выхода активного компонента для каждого из штаммов *Pseudomonas* достоверно не отличалось.

Определение молекулярной массы метаболитов штаммов *Pseudomonas*, обладающих фунгицидной активностью. Определение молекулярной массы метаболитов проводили при помощи эксклюзионной жидкостной хроматографии с использованием маркеров молекулярной массы. В результате чего было установлено, что метаболиты штаммов *Pseudomonas* близки по молекулярной массе, различие составляет ± 200 Да, и их молекулярная масса варьирует в пределах 2,8 – 3,0 кДа (рис. 8).

Аминокислотный и элементный составы метаболитов *Pseudomonas*, обладающих фунгицидной активностью. Исходя из того, что активность изучаемых метаболитов штаммов псевдомонад проявлялась в диапазоне температур 25 – 60 °C, а при температуре 70 °C происходила их значительная термоинактивация, можно было предположить, что метаболиты имеют пептидную природу. Это предположение было подтверждено данными аминокислотного анализа гидролизатов метаболитов. Данные аминокислотного и элементного анализов (табл. 7 и 8) также показали, что метаболиты изучаемых штаммов неидентичны по своему составу, различие

составляет в одну аминокислоту, чем и определяется разница в их молекулярных массах.

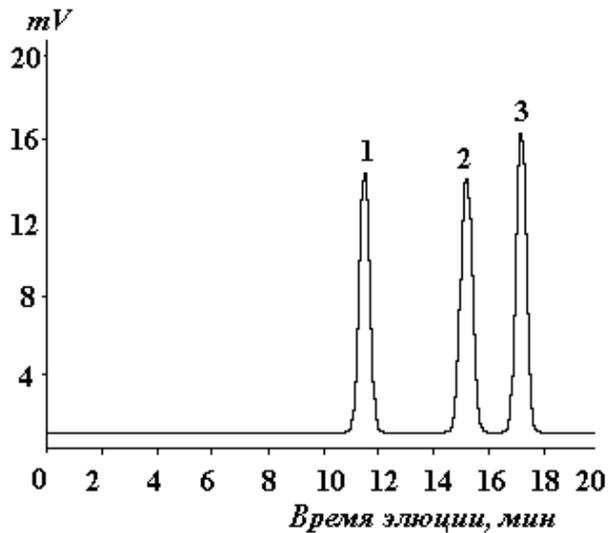


Рис. 8. Хроматограмма метаболитов *Pseudomonas* с антигрибной активностью (2, время выхода $15,2 \pm 0,1$ мин.) и маркеров молекулярной массы (1 – инсулин (Mr 5,8 кДа), время выхода 11,5 мин., 3 – витамин B12 (Mr 1355 Да), время выхода 17,2 мин.). (280 нм, колонка TSK G2000SW (300×7,8 мм), элюент - 0,1 М фосфат натрия, 0,3 М хлорид натрия (рН 7,0), расход 1 мл/мин).

Таблица 7

Эквимольное содержание аминокислот в структуре метаболитов, продуцируемых псевдомонадами

Аминокислота	Штамм- продуцент		
	<i>P. putida</i> ИБ 17	<i>P. chloraphis</i> ИБ 51	<i>P. chloraphis</i> ИБ 6
Аспарагиновая кислота	1	2	1
Треонин	1	2	1
Серин	1	1	1
Глутаминовая кислота	2	2	2
Пролин	2	2	2
Глицин	4	4	4
Аланин	2	2	2
Валин	1	1	1
Метионин	1	1	1
Лейцин	1	-	1
Лизин	1	1	1
Гистидин	1	1	1

Таблица 8

Элементный состав метаболитов бактерий р. *Pseudomonas*,
обладающих фунгицидной активностью

Культура	Содержание элемента (%)			
	Углерод	Водород	Азот	Сера
<i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	48,6±0,32	6,4±0,06	16,0±0,11	1,7±0,02
<i>P. putida</i> ИБ 17	50,2±0,33	6,5±0,07	16,1±0,12	1,8±0,02
<i>P. chlororaphis</i> ИБ 6	50,0±0,33	6,6±0,06	16,1±0,12	1,8±0,02

В состав кислотного гидролизата метаболита штамма *P. chlororaphis* ИБ 51 входит 19 аминокислот, штаммов ИБ 6 и ИБ 17 – 18 аминокислот, в основном составы схожие, за некоторым исключением. В составе гидролизата метаболита штамма ИБ 51 не наблюдается лейцина, который присутствует в составе гидролизатов штаммов ИБ 6 и ИБ 17, а аспарагиновая кислота и треонин присутствуют в удвоенном количестве.

ИК– и ЯМР ^{13}C – спектроскопия метаболитов *Pseudomonas*, обладающих фунгицидной активностью. Анализ данных ИК– и ЯМР ^{13}C – спектроскопии (рис. 9 и 10) показал, что молекулы изучаемых метаболитов содержат глицириновый остов, что характеризуется наличием химических сдвигов (ХС) 65 и 74 м.д. и характерными полосами поглощения в ИК – спектрах на 2968 и 1408 см^{-1} . К молекуле глицерина через эфирные атомы кислорода посредством карбонильных групп (1044 см^{-1} , 170 м.д.) присоединены три полипептидные цепочки, на наличие которых указывает увеличение площади пиков аминогрупп (3100-3200 см^{-1}) и изменение пропускания в области 1500 см^{-1} , характерной для аминных и ацетамидных групп.

Сравнение спектров выделенных метаболитов со спектрами, полученными при помощи программы ChemNMR Pro, позволило сделать вывод, что выделенные метаболиты по своей химической структуре являются трипептидами глицерина и представляют собой новую группу метаболитов бактерий рода *Pseudomonas*. Также очевидно, что выделенные метаболиты не являются сидерофорами в классическом понимании, т.к. не имеют в своем составе флюоресцентного хромофора. На рис. 11 представлена их химическая структура.

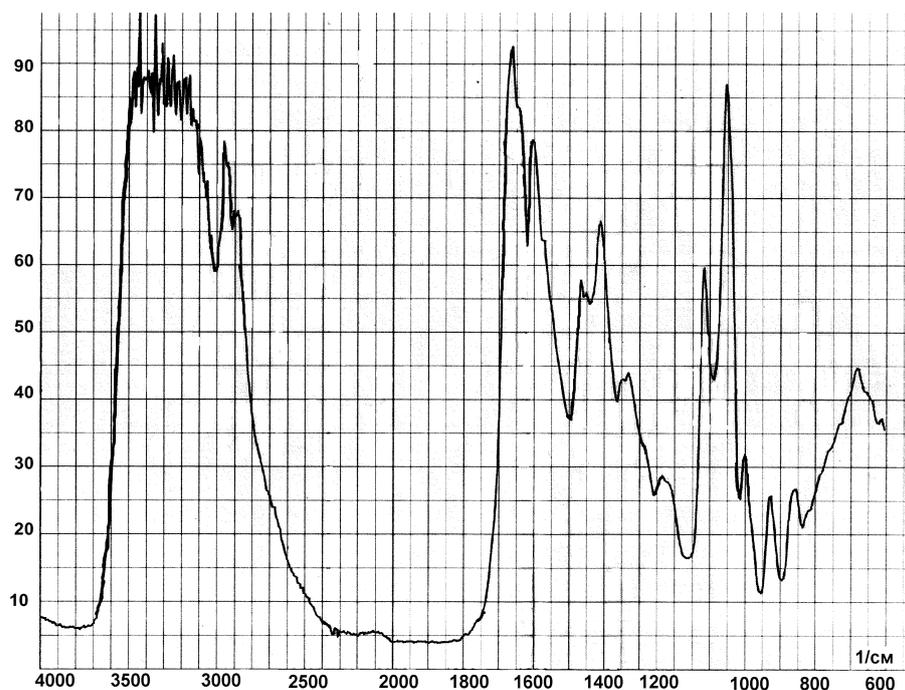


Рис. 9. ИК-спектр метаболитов с антигрибной активностью, продуцируемых штаммами *P. chlororaphis* ИБ 51, *P. chlororaphis* ИБ 6 и *P. putida* ИБ 17.

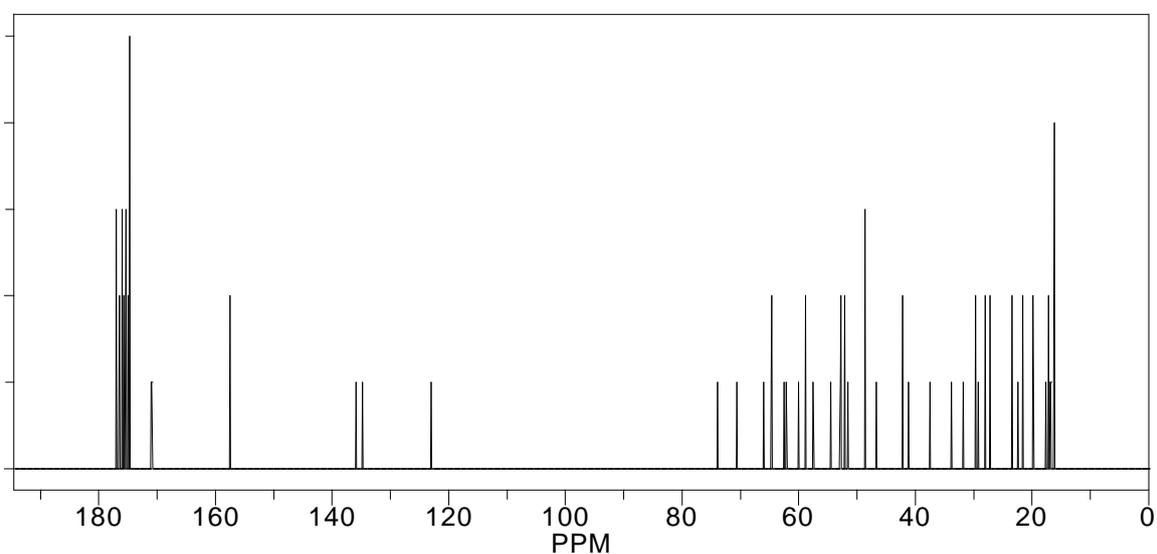


Рис. 10. ЯМР ¹³C -спектр метаболитов с антигрибной активностью, продуцируемых штаммами *P. chlororaphis* ИБ 51, *P. chlororaphis* ИБ 6 и *P. putida* ИБ 17

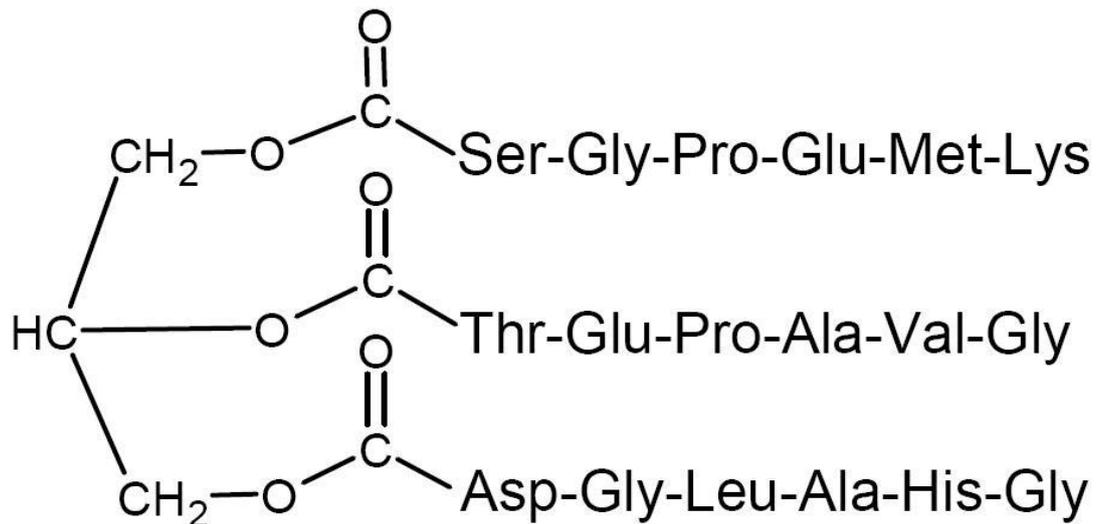


Рис. 11. Химическая структура молекулы триглицеридпептида – нового метаболита бактерий р. *Pseudomonas*

Дополнительное подтверждение структуры было получено путем ферментативного гидролиза с помощью липазы - фермента класса гидролаз, катализирующего гидролиз эфиров глицерина и обычно высших жирных кислот, однако большинство липолитических ферментов может гидролизовать также эфиры с совершенно отличной структурой (Брокерхоф, Дженсен, 1978), как получилось и в нашем случае – триглицеридпептид гидролизовался до глицерина и трех пептидных фрагментов (хроматография в условиях методики определения полипептидов и низкомолекулярных белков микробного происхождения методом нормально-фазовой ВЭЖХ (Логинов и др., 2003)(рис. 12).

Антигрибная активность триглицеридпептидов *Pseudomonas*. В связи с тем, что выделенные триглицеридпептиды являются новой группой метаболитов бактерий рода *Pseudomonas*, было интересно определить величину их фунгицидной активности и соотнести ее с таковыми известных метаболитов псевдомонад, обладающих антигрибной активностью.

Методом разведений выявлена минимальная ингибирующая концентрация ряда фитопатогенных грибов (табл. 9), которая является сопоставимой с величинами ингибирования фитопатогенов известными псевдомонадными антибиотиками (Смирнов, Киприанова, 1990; Paulitz et al., 2000; Fakhouri et al., 2001; Lee et al., 2003).

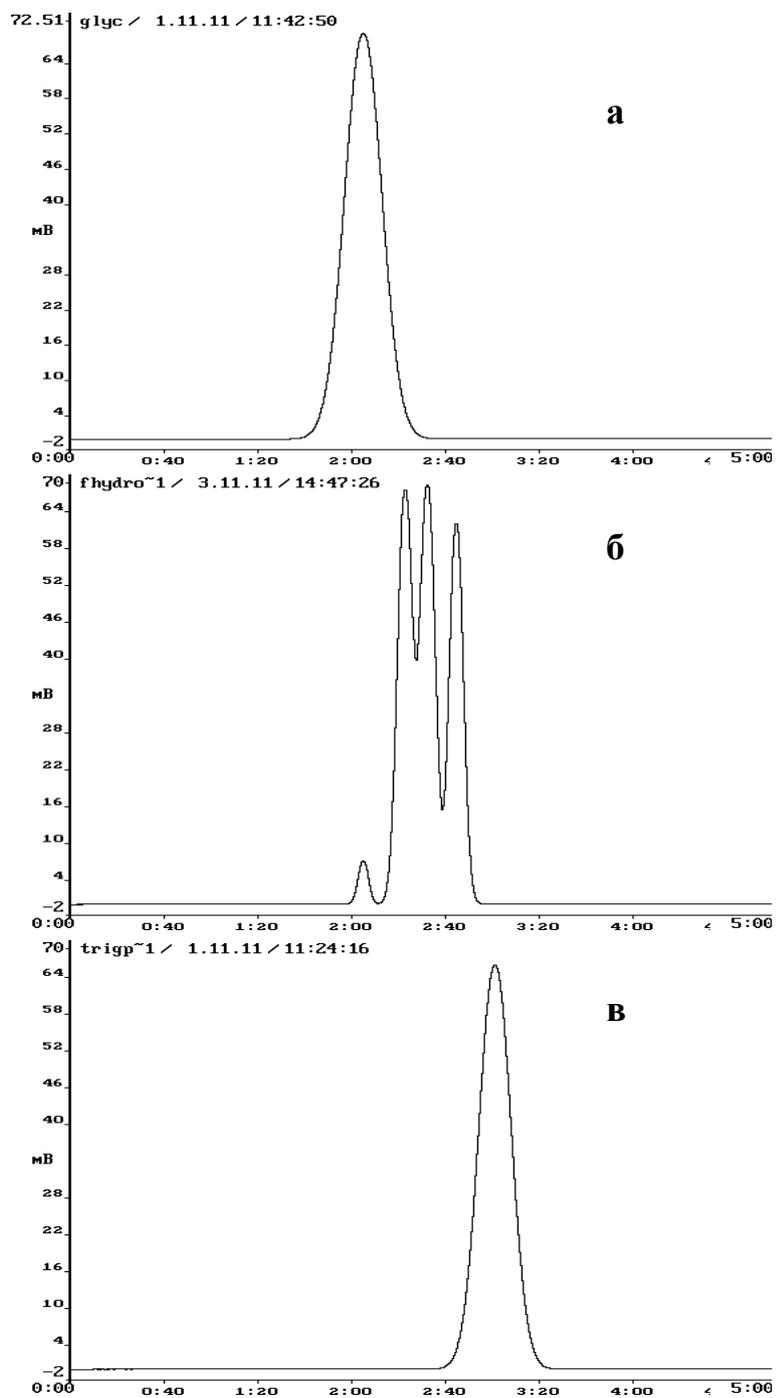


Рис. 12. Хроматографические профили глицерина (а), триглицеридпептида (в) и продуктов ферментативного гидролиза триглицеридпептида с помощью липазы (б). (ВЭЖХ, колонка Ultrasphere Si (5 мкм) 250×4,6 мм, элюент - вода с рН 7,4 (доводят раствором аммиака), расход - 0,5 мл/мин, УФ – детектор, 220 нм).

Спектр фунгицидной активности триглицеридпептидов,
продуцируемых бактериями р. *Pseudomonas*

Штамм – продуцент	Минимальная ингибирующая концентрация подавления следующих видов патогенных грибов, мг/мл									
	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium gibbosum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>
<i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	0,1- 0,2	0,5- 0,6	≥1	0,5- 0,6	0,5- 0,6	0,5- 0,6	0,8- 1,0	0,1- 0,2	0,3- 0,4	0,3- 0,4
<i>P. chlororaphis</i> ИБ 6	0,1- 0,2	0,5- 0,6	0,5- 0,6	0,1- 0,2	0,5- 0,6	0,2- 0,3	0,8- 1,0	0,1- 0,2	0,3- 0,4	0,3- 0,4
<i>P. putida</i> ИБ 17	0,1- 0,2	0,3- 0,4	≥1	0,5- 0,6	0,2- 0,3	0,3- 0,4	0,3- 0,4	0,1- 0,2	≥1	0,2- 0,3

Антигрибная активность триглицеридпептидов псевдомонад в средах с различными источниками углерода. Изучение влияния природы экссудатов растений (органических кислот, аминокислот и углеводов) на антигрибную активность метаболитов штаммов псевдомонад показало, что она оставалась высокой вне зависимости от химической природы вносимого в среду экссудатного компонента из выбранного спектра. Наблюдаемые различия в уровне активности были подвержены межвидовой корреляции. Антигрибная активность метаболитов штамма *P. putida* ИБ 17 значительно не различалась в вариантах со всеми химическими типами экссудатов, тогда как активность метаболитов штаммов вида *P. chlororaphis* была выше в вариантах с экссудатами углеводной природы (табл. 10).

В условиях непосредственного взаимодействия с метаболитами штаммов псевдомонад по истечении четырех суток конидии фитопатогена, высеянные в среду, не проросли, тогда как в контрольных вариантах, уже через 6 часов, можно было видеть массовое прорастание спор, а через сутки наблюдали сплошной рост гриба. Причем характер воздействия метаболитов на патогены был аналогичен антагонизму, который мы наблюдали в условиях совместного культивирования бактерий и грибов (рис. 1).

Минимальная ингибирующая концентрация метаболитов псевдомонад в зависимости от источника углерода (мг/мл)

Экссудат	Штамм бактерий		
	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 6	<i>P. putida</i> ИБ 17
	M±m		
Углевод	0,1±0,018	0,1±0,017	0,1±0,015
Органическая кислота	0,2±0,010	0,2±0,010	0,1±0,018
Аминокислота	0,1±0,015	0,2±0,011	0,1±0,017

Таким образом, установлено, что штаммы *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 51, *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 6 и *Pseudomonas putida* ИБ 17 способны к антагонистическому воздействию на фитопатогены, вызывая задержку прорастания спор и нарушение морфогенеза мицелия за счет секреции антибиотических веществ в средах с различными источниками углерода.

Мы предположили, что такой характер проявления антигрибной активности может быть связан с межмолекулярным взаимодействием в системе метаболит : экссудат, в связи с чем далее была исследована способность комплексообразования метаболитов бактерий рода *Pseudomonas* с экзометаболитами растений.

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ТРИГЛИЦЕРИДПЕПТИДОВ *Pseudomonas* С ЭКССУДАТАМИ РАСТЕНИЙ И ИОНАМИ МЕТАЛЛОВ

В природных условиях корневая система растений выделяет в ризосферу различные вещества, в том числе и углеводы, органические кислоты, аминокислоты. Борьба за источник питания между бактериями рода *Pseudomonas* и фитопатогенами может характеризоваться продукцией во внешнюю среду метаболитов, которые, связывая субстрат, ограничивают его доступность для других микроорганизмов. Поэтому хелатообразующая способность по отношению к экссудатам, по всей вероятности, обуславливает дополнительное ингибирующее действие на фитопатогенные грибы в средах, содержащих, в качестве источника углерода, различные сахара, аминокислоты и органические кислоты.

Триглицеридпептиды *Pseudomonas* не обладают сидерофорной активностью по отношению к ионам Fe^{+3} , но, в тоже время, они способны образовывать комплексы с ионами тяжелых металлов и молекулами различных веществ органической природы - представителей экзометаболитов растений. Причем комплексообразование метаболитов с углеводами, органическими кислотами и аминокислотами у бактерий рода *Pseudomonas*

является новым свойством, которое ранее не было отмечено другими исследователями.

Комплексообразующая способность триглицеридпептидов Pseudomonas с эксудатами растений органической природы.

На рисунке 13 представлены результаты изучения комплексообразования триглицеридпептидов псевдомонад с представителями различных классов эксудатов растений с использованием метода Бента-Френча. Из рисунка виден линейный характер логарифмических зависимостей, который указывал на образование комплекса в системах метаболит : эксудат, а значения первых членов в аппроксимирующих уравнениях показывали в первом приближении стехиометрическое соотношение в комплексах метаболит : эксудат.

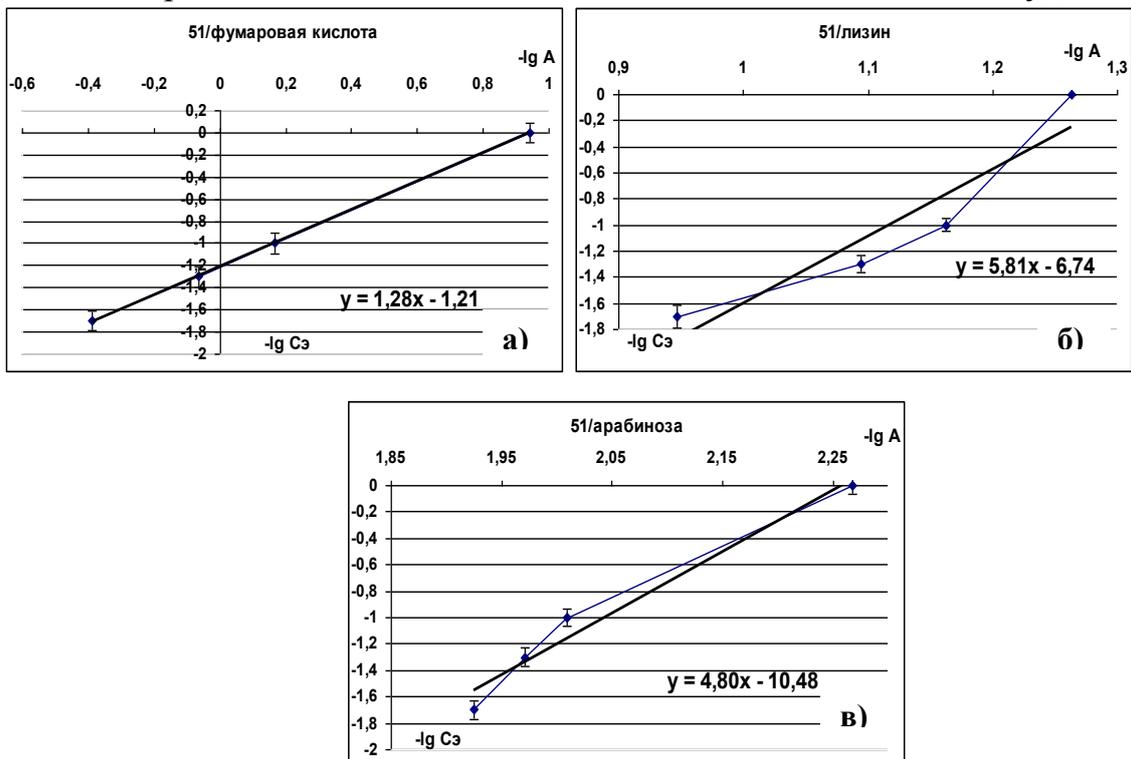


Рис. 13. Оценка комплексообразования триглицеридпептидов псевдомонад с представителями различных классов корневых эксудатов растений на примере штамма *P. chlororaphis* ИБ 51 с фумаровой кислотой (а), лизином (б) и арабинозой (в) методом Бента – Френча

Данные изомолярных серий метаболитов псевдомонад с теми же представителями эксудатов (рис. 14) подтвердили наличие комплексообразования в системах метаболит : эксудат и уточнили их стехиометрический состав. Например, из рис. 14а видно, что изомолярная серия метаболита штамма *P. chlororaphis* ИБ 51 с фумаровой кислотой имеет четкий излом, расположение которого, определенное по пересечению касательных, отвечает содержанию в комплексе 50 % (мольных) метаболита и 50 % (мольных) фумаровой кислоты. Следовательно, стехиометрический

состав комплекса метаболита штамма ИБ 51 и фумаровой кислоты составлял 1:1.

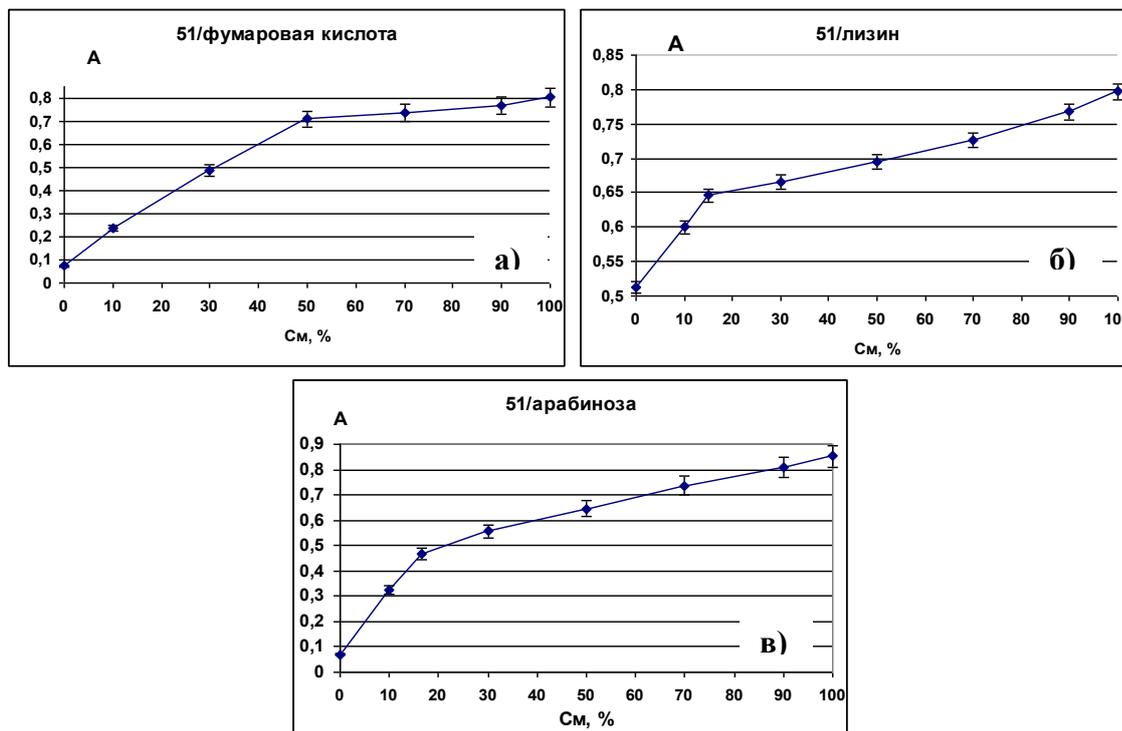


Рис. 14. Оценка комплексообразования триглицеридпептидов псевдомонад с представителями различных классов корневых экссудатов растений на примере штамма *P. chlororaphis* ИБ 51 с фумаровой кислотой (а), лизином (б) и арабинозой (в) методом изомолярных серий

Таким образом, метод изомолярных серий позволил уточнить и подтвердить данные по комплексообразованию триглицеридпептидов псевдомонад с представителями различных классов экзометаболических соединений растений и установлению их стехиометрического состава. Для окончательного уточнения и подтверждения количественных показателей составов комплексов было проведено исследование комплексообразования при помощи метода поляриметрии, который наглядно демонстрировал характерные изломы на графиках зависимости угла вращения $[\alpha]$ от мольного соотношения в системе метаболит : экссудат (рис. 15).

Результаты исследования стехиометрических соотношений в комплексах метаболит : экссудат, проведенные аналогично вышеописанному, для других корневых экссудатов растений представлены в таблице 11.

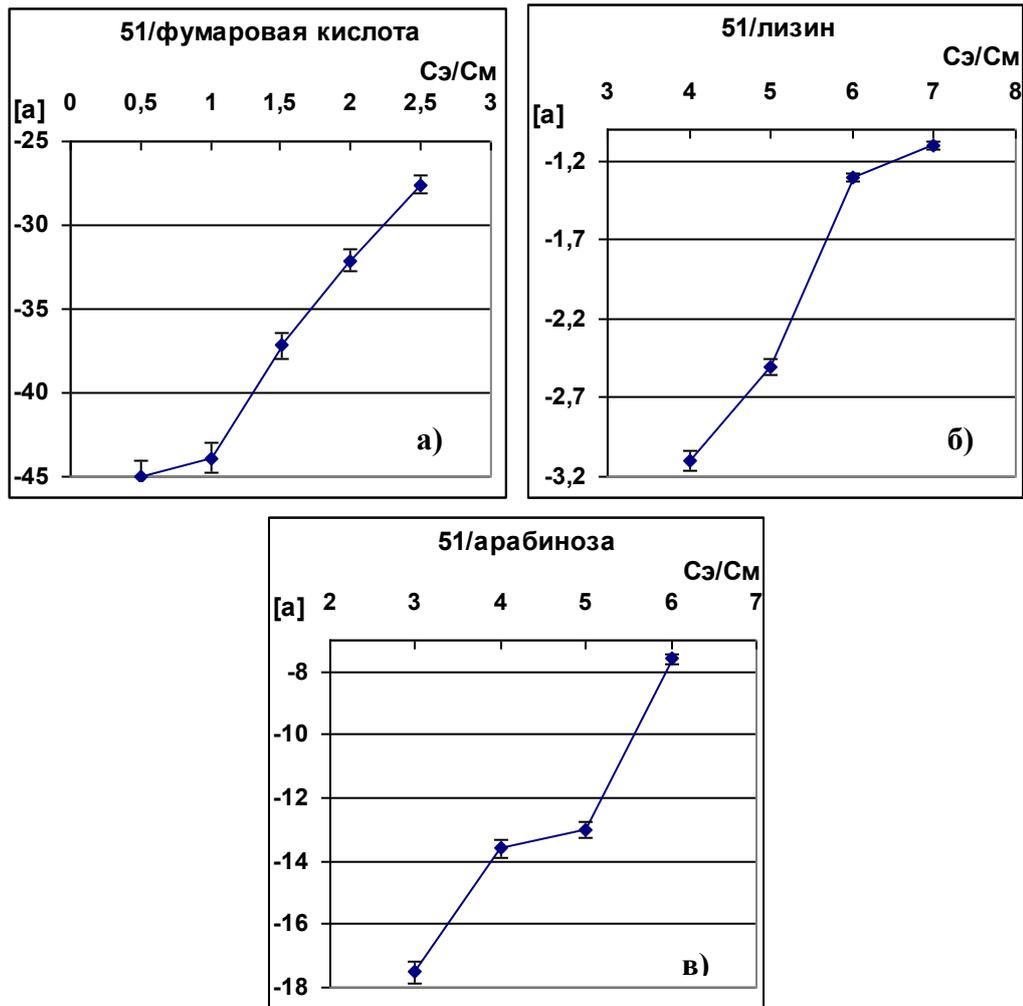


Рис. 15. Оценка комплексообразования триглицеридпептидов псевдомонад с представителями различных классов корневых экссудатов растений на примере штамма *P. chlororaphis* ИБ 51 с фумаровой кислотой (а), лизином (б) и арабинозой (в) методом поляриметрии

Таблица 11
Стехиометрические соотношения в комплексе метаболит : экссудат

Экссудат	Штамм бактерий		
	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 6	<i>P. putida</i> ИБ 17
1	2	3	4
Арабиноза	1:5	1:5	1:18
Ксилоза	1:5	1:5	1:10
Фруктоза	1:6	1:6	1:4
Глюкоза	1:7	1:7	1:2
Галактоза	1:3	1:4	1:17

Продолжение таблицы 11

1	2	3	4
Сахароза	1:8	1:8	1:15
Рафиноза	1:13	1:10	1:9
Рамноза	1:3	1:3	1:5
Маннит	1:15	1:14	1:2
Щавелевая кислота	1:2	1:2	1:2
Пропионовая кислота	1:16	1:9	1:21
Молочная кислота	1:17	1:13	1:12
Яблочная кислота	1:20	1:10	1:5
Пировиноградная кислота	1:3	1:3	1:3
Фумаровая кислота	1:1	1:1	1:2
Янтарная кислота	1:17	1:11	1:20
Кетоглутаровая кислота	1:7	1:8	1:6
Лимонная кислота	1:14	1:5	1:11
Аланин	1:10	1:15	1:17
Валин	1:13	1:6	1:16
Пролин	1:14	1:17	1:15
Метионин	1:6	1:3	1:5
Триптофан	1:2	1:2	1:2
Тирозин	1:1	1:1	1:1
Аспарагин	1:11	1:11	1:9
Цистеин	1:9	1:5	1:8
Лизин	1:6	1:4	1:4
Аргинин	1:20	1:9	1:8

Полученные соотношения не коррелировали с величиной антигрибной активности, с молекулярной массой или каким-либо другим физико-химическим свойством экссудата, что, вероятнее всего, можно связать с особенностью строения пептидных компонентов. Результаты проведенных экспериментов свидетельствовали о том, что метаболиты бактерий рода *Pseudomonas* способны к образованию межмолекулярных комплексов с различными экссудатами растений: углеводами, органическими кислотами и аминокислотами, лимитируя по субстрату фитопатогены. Оптимальный стехиометрический состав комплексов метаболит : экссудат для проявления антигрибной активности метаболитов бактерий рода *Pseudomonas*, находился в интервале от 1:1 до 1:20.

Комплексообразующая способность триглицеридпептидов *Pseudomonas* с ионами металлов. В данной работе изучена возможность комплексообразования триглицеридпептидов с ионами следующих тяжелых металлов: цинка, меди, кадмия, свинца и определена стехиометрия образующихся комплексов.

В результате исследований изомолярных серий комплексов метаболитов псевдомонад с катионами металлов были получены вольтамперограммы, т.е. графики зависимости величины тока в пике от соотношения метаболит : катион в изомолярной серии (рис. 16). Графически изомолярные серии триглицеридпептидов штаммов ИБ 51, ИБ 6 и ИБ 17 с ионом кадмия представлены на рис. 16а, из которого видно, что изомолярные серии имеют четкие изломы, расположение которых отвечает соотношению в комплексе метаболит : катион 50 % (мольных) метаболита и 50 % (мольных) ионов кадмия, причем эти соотношения были одинаковы для метаболитов всех трех исследуемых штаммов. Следовательно, стехиометрической состав комплексов с катионом кадмия определялся соотношением 1:1. Данные изомолярных серий метаболитов псевдомонад с ионами меди, цинка и свинца представлены на рис. 16б-г, стехиометрические составы комплексов с ними представлены в табл. 12.

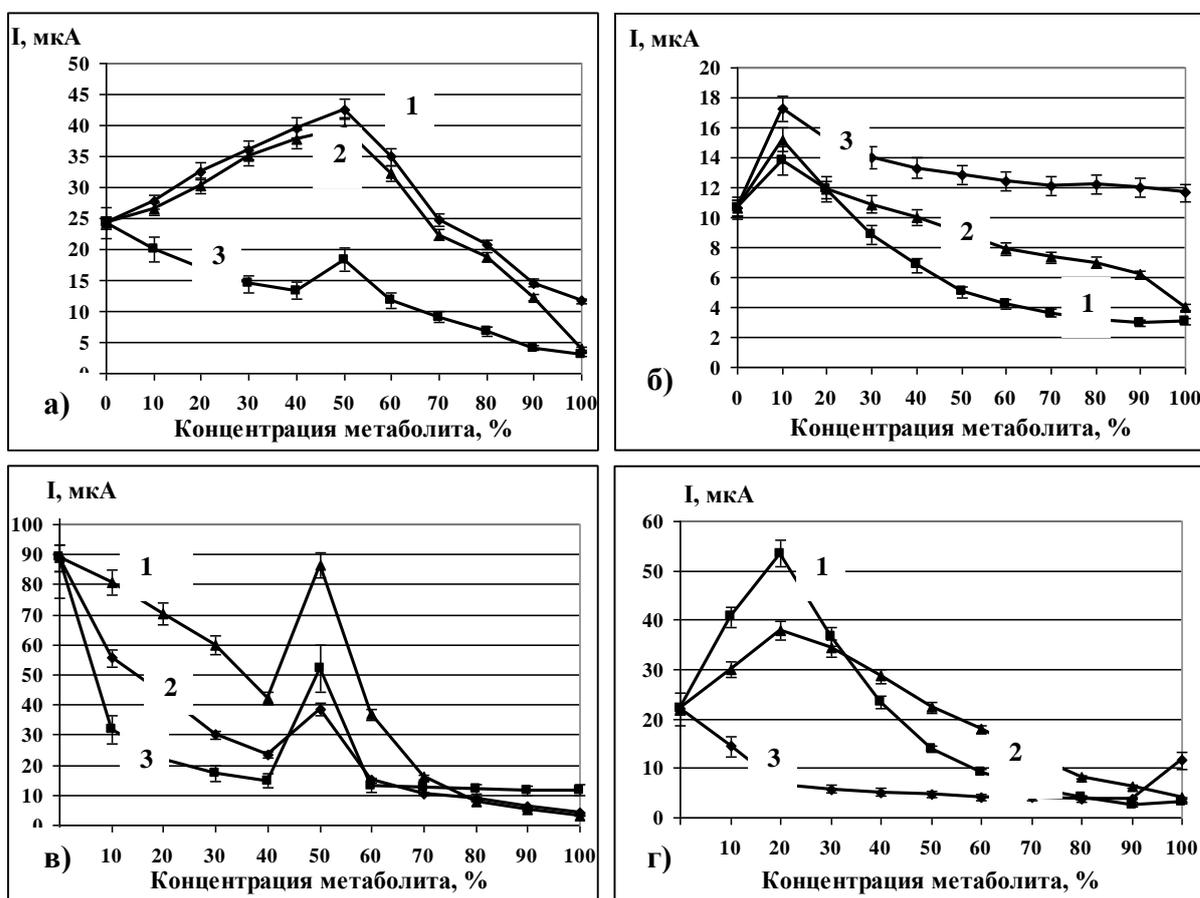


Рис. 16. – Оценка комплексообразования триглицеридпептидов псевдомонад (штаммы ИБ 51 (1) ИБ 6 (2), ИБ 17 (3)) с ионами металлов: а – кадмий; б – медь; в – свинец; г – цинк методом инверсионной вольтамперометрии

Стехиометрические соотношения в комплексе метаболит : ион металла

Ион металла	Штамм бактерий		
	<i>P. chlororaphis</i> ИБ	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 6	<i>P. putida</i> ИБ 17
Цинк	1:1	1:1	1:1
Кадмий	1:1	1:1	1:1
Медь	1:9	1:9	1:9
Свинец	1:4	1:4	1:4

В результате проведенных экспериментов было установлено, что метаболиты бактерий рода *Pseudomonas* способны к образованию межмолекулярных комплексов с неорганическими ионами кадмия, меди, свинца и цинка. Оптимальные стехиометрические составы комплексов метаболит : катион находились в интервале 1:1 – 1:9.

Таким образом, нами были проведены исследования способности комплексообразования метаболитов бактерий рода *Pseudomonas* с различными органическими кислотами, аминокислотами и углеводами. Было установлено, что метаболиты бактерий рода *Pseudomonas* обладают выраженной способностью к образованию комплексов с органическими кислотами, аминокислотами и углеводами. Нами были установлены оптимальные для проявления фунгистатического действия метаболитов стехиометрические соотношения комплексов метаболит : экссудат и метаболит : катион. Полученные результаты необходимы для разработки новых эффективных средств защиты растений от фитопатогенов.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *Pseudomonas*, ОБЛАДАЮЩИХ ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Определение оптимального состава питательных сред для культивирования бактерий рода *Pseudomonas*. Для создания оптимальной среды, состав которой мог бы полностью удовлетворять пищевые потребности культуры и способствовать максимальному накоплению антигрибной активности, целесообразно использовать методы математического планирования эксперимента, включающие план полного факторного эксперимента и опыт по методу крутого восхождения.

При широкомасштабном производстве биопрепаратов на основе бактерий рода *Pseudomonas* для практического использования в агробиотехнологии основной проблемой является высокая стоимость питательной среды, содержащей в своем составе такие дорогостоящие компоненты, как пептон и дрожжевой экстракт. С целью удешевления состава питательной среды заменили смесь дрожжевого экстракта и пептона на автолизат отработанных пивных дрожжей. При выборе этого компонента

питательной среды мы руководствовались, прежде всего, низкой стоимостью, доступностью и технологичностью сырья.

Отработанные дрожжи трёх разных производителей пивной продукции проанализировали на содержание различных форм азота. Результаты анализа автолизатов пивных дрожжей и пептона представлены в табл. 13.

Таблица 13

Характеристика пептона и полученных дрожжевых автолизатов различных пивоваренных производств

Показатель	«ПИТ», г. Новотроицк	«Шихан Хайнекен», г. Стерлитамак	«Amstar- Efes», г. Уфа	Пептон
Азот общий, % в пересчете на АСВ*	5,9±0,3	5,4±0,3	5,2±0,3	7,6±0,4
Азот аминный, % в пересчете на АСВ	2,0±0,1	1,5±0,1	1,6±0,1	3,6±0,2
Белок по Лоури, % в пересчете на АСВ	45,2±2,3	40,7±2,0	41,3±2,1	61,7±3,1

*абсолютно сухие вещества

Из приведённых данных видно, что отработанные дрожжи завода «ПИТ» г. Новотроицк по анализируемым показателям превосходят дрожжи остальных пивоваренных производств, что и послужило основанием для дальнейшей работы с ними по оптимизации питательных сред для культивирования бактерий рода *Pseudomonas*.

Согласно составленной матрице планирования, было проведено 16 экспериментов по каждому штамму бактерий *Pseudomonas* с различным варьированием изучаемых факторов (табл. 1). Эксперименты проводились с трёхкратной повторностью.

В результате экспериментов (табл. 14) были вычислены коэффициенты уравнений регрессии - математических моделей зависимости функций Y_1 (антигрибная активность) и Y_2 (титр клеток) от концентрации в ферментационной среде компонентов X_1, X_2, X_3, X_4 . На основании коэффициентов были получены математические модели зависимости антигрибной активности (Y_1) и титра клеток (Y_2) от концентраций в ферментационной среде компонентов. Полученные модели по накоплению биомассы и антигрибной активности при 95 % доверительном интервале дают основание утверждать, что статистически значимое действие в изученном диапазоне концентраций для разных штаммов оказывают разные компоненты.

Уравнения регрессии, с учетом значимости коэффициентов, выглядят следующим образом:

для штамма *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 51

$$Y_1 = 4,60 + 0,15X_1 + 1,46X_3,$$

$$Y_2 = 6,47 + 5,50X_2 + 4,78X_3;$$

для штамма *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 6

$$Y_1 = 4,19 + 0,63X_1 + 1,52X_3 + 1,06X_4,$$

$$Y_2 = 3,41 + 1,89X_2 + 1,39X_3;$$

для штамма *Pseudomonas putida* ИБ 17

$$Y_1 = 3,99 + 0,93X_2 + 0,62X_3 + 1,48X_4,$$

$$Y_2 = 2,11 + 0,64X_1 - 1,59X_2 + 0,49X_3.$$

Основное положительное влияние на антигрибную активность двух штаммов вида *P. chlororaphis* оказывает увеличение концентраций глицерина (X_1) и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (X_3), причем на штамм ИБ 6 дополнительное положительное влияние оказывает увеличение концентрации $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (X_4), а концентрация дрожжевого автолизата (X_2) соответствует оптимальному значению для штамма этого вида (т.е. изменение его концентрации в выбранных пределах не вызывает заметное, статистически значимое, изменение антигрибной активности). Несколько иначе ведет себя штамм вида *P. putida*, где положительное влияние на увеличение антигрибной активности оказывает увеличение концентраций автолизата (X_2), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (X_3) и $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (X_4).

На основании полученных данных в ПФЭ-2⁴ были поставлены опыты по плану крутого восхождения, в котором осуществляли одновременное изменение концентраций всех значимых факторов по алгоритму, рассчитанному точно в соответствии с величинами коэффициентов регрессии. Восхождение было начато от исходного состава среды (средний уровень ПФЭ 2⁴). Таким образом, были установлены оптимальные составы питательных сред (табл. 15).

ПФЭ и его результаты для штаммов *Pseudomonas*

Вариант	Фактор				<i>P. chlororaphis</i> ИБ 51		<i>P. chlororaphis</i> ИБ 6		<i>P. putida</i> ИБ 17	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y ₁ , ед/мл КЖ	Y ₂ , млрд КОЕ/мл КЖ	Y ₁ , ед/мл КЖ	Y ₂ , млрд КОЕ/мл КЖ	Y ₁ , ед/мл КЖ	Y ₂ , млрд КОЕ/мл КЖ
1	-	-	-	-	2,0±0,1	0,79±0,04	2,0±0,1	1,21±0,06	2,0±0,1	1,38±0,07
2	+	-	-	-	2,0±0,1	0,95±0,05	2,0±0,1	1,43±0,07	2,0±0,1	0,06±0,0
3	-	+	-	-	2,0±0,1	1,42±0,07	2,3±0,1	1,28±0,06	2,0±0,1	5,57±0,28
4	+	+	-	-	2,0±0,1	0,55±0,03	2,0±0,1	1,41±0,07	2,0±0,1	2,87±0,14
5	-	-	+	-	5,0±0,25	1,0±0,05	2,2±0,1	2,04±0,1	2,3±0,12	1,69±0,08
6	+	-	+	-	9,0±0,45	0,95±0,05	2,3±0,11	1,5±0,07	2,2±0,11	0,05±0,0
7	-	+	+	-	4,8±0,24	24,7±1,23	2,2±0,11	7,73±0,39	2,8±0,14	3,23±0,16
8	+	+	+	-	7,0±0,35	17,57±0,88	10,0±0,5	8,5±0,42	5,0±0,25	2,07±0,1
9	-	-	-	+	5,8±0,29	0,97±0,05	3,5±0,17	1,19±0,06	3,0±0,13	0,01±0,0
10	+	-	-	+	7,0±0,35	1,27±0,06	4,5±0,22	1,88±0,09	3,0±0,13	0,64±0,03
11	-	+	-	+	2,0±0,1	2,8±0,14	2,3±0,11	2,43±0,12	6,0±0,26	6,77±0,34
12	+	+	-	+	2,3±0,12	4,72±0,24	2,7±0,13	5,33±0,27	7,0±0,35	3,53±0,18
13	-	-	+	+	8,0±0,4	0,94±0,05	9,0±0,45	1,83±0,09	6,0±0,26	0,14±0,01
14	+	-	+	+	3,7±0,18	0,84±0,04	9,0±0,45	1,1±0,06	4,0±0,2	0,22±0,01
15	-	+	+	+	6,0±0,3	23,33±1,17	5,0±0,25	7,67±0,38	9,0±0,45	3,17±0,16
16	+	+	+	+	5,0±0,25	20,67±1,03	6,0±0,3	8,0±0,4	5,5±0,27	2,35±0,12
17	0	0	0	0	7,0±0,35	16,4±0,82	8,0±0,4	6,05±0,3	7,0±0,35	4,80±0,24

Таблица 15

Оптимизированные составы питательных сред

Компонент среды	Оптимальное содержание для штамма		
	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 6	<i>P. putida</i> ИБ 17
Глицерин, г/л	11,30	11,53	11,00
Дрожжевой автолизат, л/л	0,11	0,13	0,16
Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O, г/л	6,96	6,14	6,23
KH ₂ PO ₄ ×2H ₂ O, г/л	1,58	1,60	1,89
MgSO ₄ ×7H ₂ O, г/л	1,50		
FeCl ₃ , г/л	0,01		

Антигрибная активность выращенных на данных средах штаммов *Pseudomonas* в 1,5 раза выше, чем в среднем варианте, в то же время титр клеток на данной среде составил $2,20 \cdot 10^{10}$, $1,46 \cdot 10^{10}$ и $5,00 \cdot 10^9$ КОЕ/мл культуральной жидкости соответственно для штаммов ИБ 51, ИБ 6 и ИБ 17.

Оптимизация условий культивирования штаммов *Pseudomonas*.

Оптимизацию условий культивирования штаммов-продуцентов проводили в ферментерах на средах выше приведённого состава (табл. 15).

Результаты ПФЭ 2³ показали, что все три исследуемые культуры проявляют максимальную антигрибную активность в рамках выбранной системы ее определения вне зависимости от условий культивирования. Рассчитанные коэффициенты для уравнений регрессии, описывающих зависимость титра клеток от условий культивирования, оказались статистически незначимыми. Однако по результатам ПФЭ 2³ были выявлены параметры культивирования, позволяющие повысить титр клеток исследуемых штаммов бактерий рода *Pseudomonas* в культуральной жидкости, которые мы приняли за оптимальные параметры культивирования штаммов-продуцентов (табл. 16).

Таблица 16

Оптимальные условия культивирования

Условия культивирования	Оптимум для штамма		
	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 51	<i>P. chlororaphis</i> ИБ 6	<i>P. putida</i> ИБ 17
Перемешивание, об/мин	180	160	160
Температура, °С	26	26	30
Продолжительность культивирования, ч	48	48	48

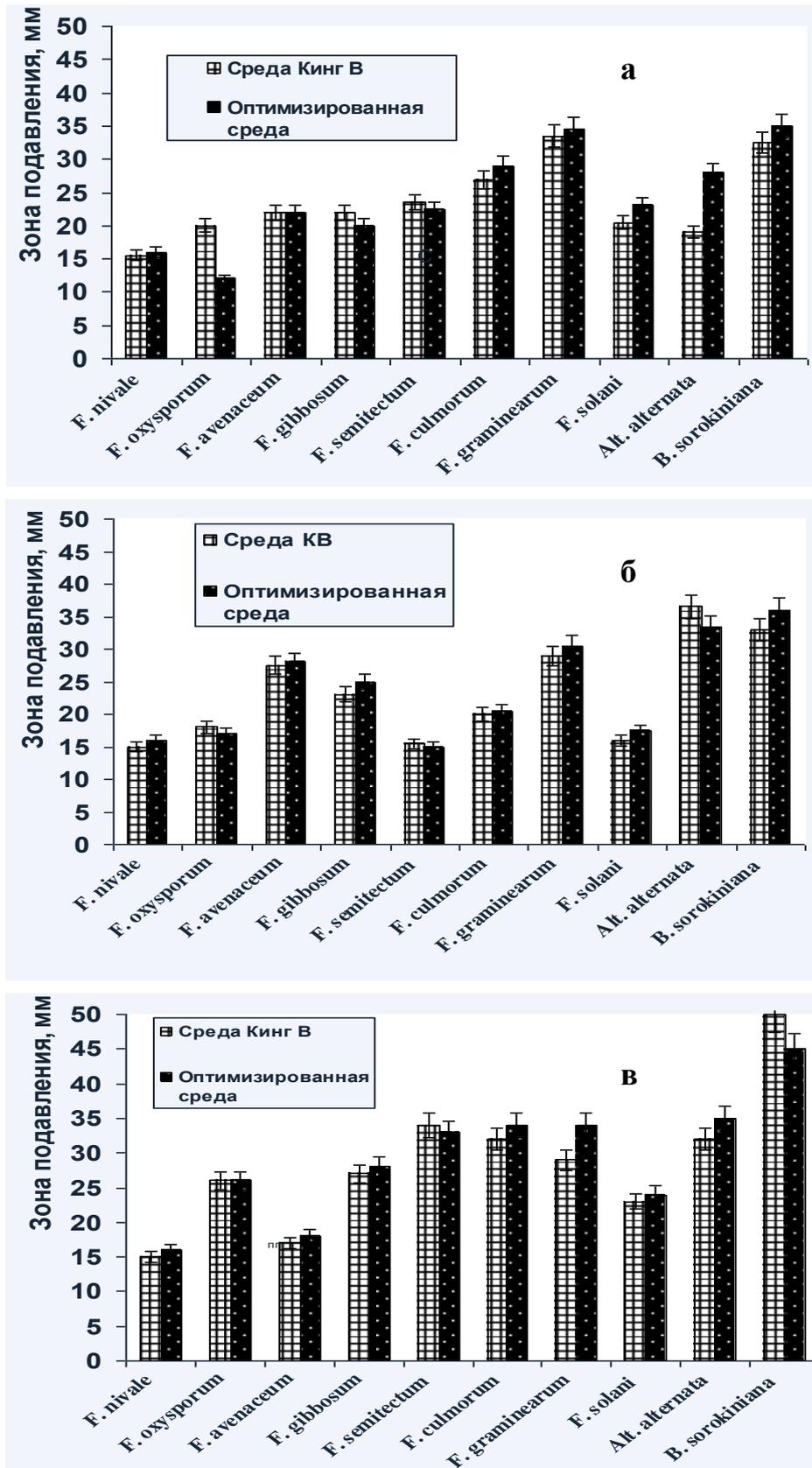


Рис. 17. Спектр антигрибной активности штаммов *P. chlororaphis* ИБ 51 (а), *P. chlororaphis* ИБ 6 (б), *P. putida* ИБ 17 (в), выращенных на оптимизированной среде и среде Кинг В, в сравнении.

Таким образом, результаты оптимизации условий культивирования штаммов *Pseudomonas* показывают, что всем исследуемым штаммам для накопления максимальной антигрибной активности и высокого ($3,42 \cdot 10^{10}$, $1,50 \cdot 10^{10}$ и $1,25 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл КЖ соответственно для штаммов ИБ 51, ИБ 6 и ИБ 17) титра клеток при культивировании в ферментёрах достаточно 48 ч, в условиях пониженной аэрации и перемешивания, при температуре 26 °С для двух штаммов вида *P. chlororaphis*, а для штамма *P. putida* необходимо 30 °С. Полученные данные согласуются с данными литературы по биосинтезу антибиотических веществ псевдомонадами.

Оценка антигрибной активности штаммов, выращенных на новых питательных средах. Исследуемые штаммы *P. chlororaphis* ИБ 51, *P. chlororaphis* ИБ 6, *P. putida* ИБ 17, выращенные в оптимальных условиях на оптимизированных средах, проверили на антигрибную активность. Спектр антагонистической активности был оценён зонами подавления гриба в сравнении с зонами подавления фитопатогенов штаммами, выращенными на классической среде Кинг В. По полученным результатам антигрибной активности исследуемых штаммов *Pseudomonas* видно (рис. 17), что бактерии, выращенные в оптимизированных условиях, по фунгицидной активности не уступают микроорганизмам, выращенным на классической среде Кинг В в тех же условиях.

Выявлено, что антигрибная активность, в отношении почти всех исследуемых тест-грибов штамма *Pseudomonas putida* ИБ 17, выращенного на оптимизированной среде (рис. 18), превышает активность двух других штаммов, выращенных также на оптимизированных средах.

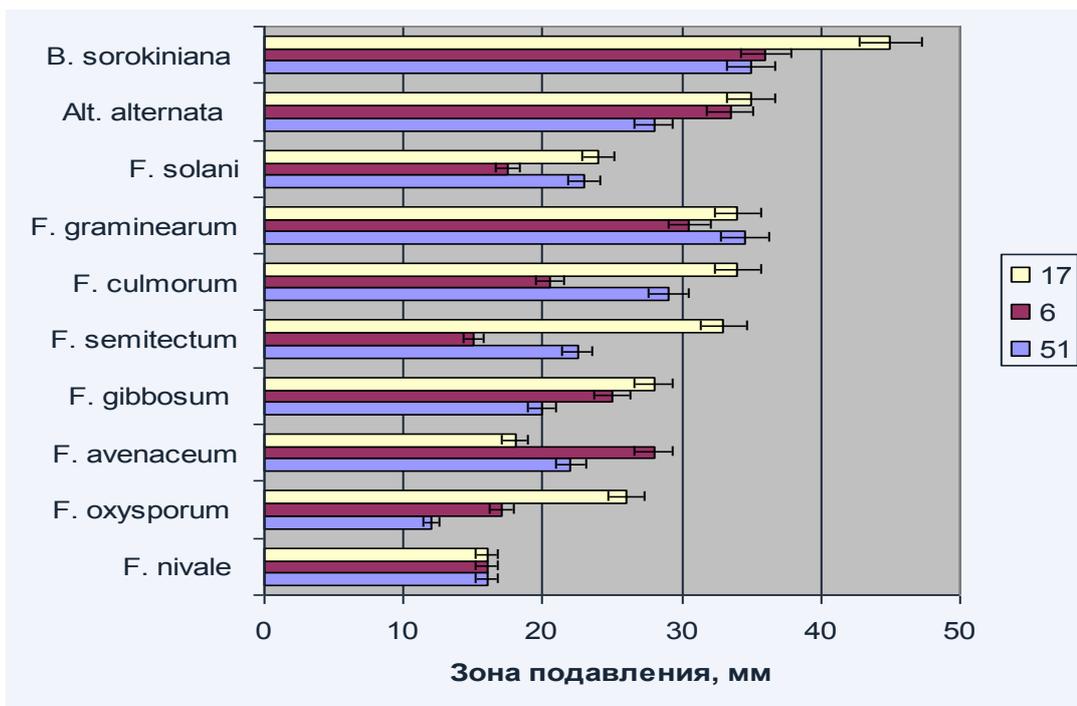


Рис. 18. Спектр антигрибной активности штаммов *P. chlororaphis* ИБ 51, *P. chlororaphis* ИБ 6 и *P. putida* ИБ 17, выращенных на оптимизированных средах, в сравнении.

Таким образом, штамм-антагонист *Pseudomonas putida* ИБ 17 может стать основой микробиологического препарата нового поколения, обладающего широким спектром антагонистической активности в отношении фитопатогенных грибов р. *Fusarium*, *Alternaria* и *Helminthosporium*.

Изучение параметров культивирования штамма *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 51 в периодических и непрерывных условиях. На основе штамма *P. chlororaphis* ИБ 51 ранее был разработан биопрепарат «Елена» (Логинов и др., 2003), наработка которого производится в периодическом режиме культивирования. Учитывая увеличивающуюся потребность в биологических препаратах в сельском хозяйстве, исследовали возможность наработки биопрепарата «Елена» в непрерывных условиях. Для определения максимальной удельной скорости роста рабочего штамма *P. chlororaphis* ИБ 51 в непрерывном режиме провели серию ферментаций в периодическом режиме культивирования. Кривая роста штамма *P. chlororaphis* ИБ 51 представлена на рис. 19.

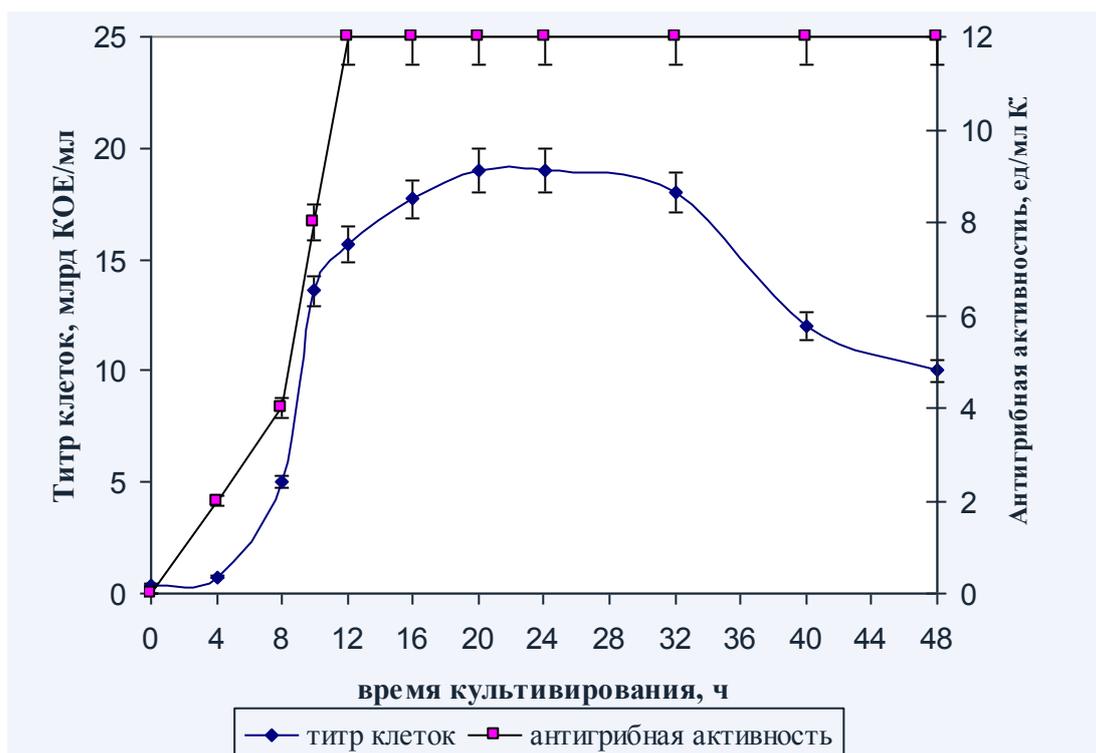


Рис. 19. Динамика периодического роста и накопления антигрибных веществ культурой *P. chlororaphis* ИБ 51.

Культивирование в оптимальных условиях позволяет штамму интенсивно накапливать метаболиты с антигрибной активностью на завершающей стадии экспоненциального роста к 12-14 ч культивирования. В дальнейшем антигрибная активность культуры *P. chlororaphis* ИБ 51 практически не изменяется до окончания культивирования.

Переход от периодического процесса культивирования к непрерывному провели при помощи графоаналитического метода. Были определены скорости разбавления для нескольких состояний динамического равновесия путем сопоставления зависимости накопления биомассы от времени культивирования с данными о продуктивности процесса по выходу биомассы.

Далее провели серию наработок культуры штамма *P. chlororaphis* ИБ 51 в режиме непрерывного культивирования в условиях, определенных расчетно-графически при скоростях разбавления $D=0,26; 0,34; 0,5; 0,7 \text{ ч}^{-1}$.

В ходе эксперимента было установлено, что при значении скорости разбавления $D=0,7 \text{ ч}^{-1}$ наблюдалось вымывание культуры из ферментера, так как соответствовало максимальной удельной скорости роста штамма (μ_{\max}). При установлении скорости разбавления $D=0,26 \text{ ч}^{-1}; 0,34 \text{ ч}^{-1}; 0,50 \text{ ч}^{-1}$ система достигает стационарного режима при концентрации клеток в интервале от $4 \cdot 10^9$ до $1,2 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл КЖ (максимум при $D=0,5 \text{ ч}^{-1}$). Дальнейшее увеличение скорости потока вызывает уменьшение урожая клеток.

Таким образом, были аналитически рассчитаны и экспериментально подтверждены параметры для промышленного культивирования штамма *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 51 в условиях хемостата с высокой производительностью процесса накопления биомассы.

Питательные среды для промышленного культивирования псевдомонад и экономический эффект от использования новых сред.

Исследовав параметры культивирования бактерий на среде с автолизатом отработанных пивных дрожжей, получили технологическое решение производства биопрепарата с использованием вторичного сырья.

Для того чтобы, не быть зависимыми в своем производстве от какой-то одной области промышленности, была предпринята успешная попытка перенести разработанные условия культивирования для производства биопрепарата на родственный субстрат – пекарские дрожжи и его автолизат. Автолизат пекарских дрожжей не уступает по своим характеристикам, таким как, содержание незаменимых аминокислот, аминного (4,47 %, АСВ) и общего азота (5,74%, от АСВ), автолизату пивных дрожжей.

Внедрение в технологический процесс новых питательных сред значительно сократит технологические расходы на стадии приготовления питательной среды, что крайне необходимо в условиях развивающейся агробιοтехнологии.

Данные экономического расчета (табл. 17) затрат на питательные среды (в ценах 2009 г.), показали, что наиболее дешёвой питательной средой является оптимизированная среда на основе автолизата пивных дрожжей. Экономический эффект от использования разработанной среды по сравнению с Кинг В составил 146275 руб за один цикл наработки целевого продукта в объёме 10 т. Таким образом, использование оптимизированной среды на основе автолизата пивных дрожжей значительно сокращает долю производственных затрат на питательную среду в себестоимости готового продукта с 22% до 3,6%.

Экономический эффект использования питательных сред за один цикл наработки (10 т) биопрепарата «Елена»

Варианты сред	Стоимость среды, руб.	Себестоимость продукта, руб.	Доля среды в себестоимости продукта
Модифицированная Кинг В	168763,21	765000	22%
Оптимизированная на автолизате пекарских дрожжей	23738,18	619975	3,8%
Оптимизированная на автолизате пивных дрожжей	22488,18	618724	3,6%

Нами показана целесообразность использования разработанных оптимизированных питательных сред на основе автолизата пивных дрожжей при производстве биопрепаратов на основе бактерий-продуцентов рода *Pseudomonas*, которые обеспечивают высокую антагонистическую активность в сочетании с экономической и технологической приемлемостью. В то же время, исходя из соображения соответствия цены и качества в сравнении со средой Кинг В, автолизат пекарских дрожжей, как и сами дрожжи, также могут быть использованы как компонент питательной среды в производстве биопрепарата «Елена».

ВЫВОДЫ

1. Выделены новые метаболиты для трех штаммов *Pseudomonas spp.*, различающихся по видовой принадлежности, обладающие фунгицидной активностью, представляющие по своей химической структуре трипептиды глицерина с молекулярной массой 2,8-3,0 кДа. Определены минимальные ингибирующие концентрации триглицеридпептидов изучаемых псевдомонад для ряда фитопатогенных и фитотоксичных грибов, показывающие, что антигрибная активность выделенных метаболитов сопоставима величине активности известных антибиотиков бактерий рода *Pseudomonas*.
2. Метаболиты бактерий рода *Pseudomonas* способны к образованию межмолекулярных комплексов с компонентами экзометаболизма растений – органическими кислотами, аминокислотами и углеводами, лимитируя по субстрату фитопатогены. Метаболиты бактерий рода *Pseudomonas* также способны образовывать ассоциаты с ионами меди, цинка, кадмия и свинца.
3. Стехиометрические составы комплексов метаболит : экссудат для триглицеридпептидов штаммов бактерий *P. chlororaphis* ИБ 51, *P. chlororaphis* ИБ 6, *P. putida* ИБ 17 с компонентами различных фракций

корневых экссудатных экзометаболитов растений находятся в интервале 1:1 – 1:20. Оптимальные для снижения содержания солей металлов стехиометрические составы комплексов метаболит : катион находятся в интервале 1:1 – 1:9.

4. Образование межмолекулярных комплексов триглицеридпептидами изученных штаммов бактерий рода *Pseudomonas* ограничивает доступность источников углерода для фитопатогенных грибов и является одним из механизмов проявления антигрибной активности метаболитов.

5. Выявлены условия максимальной продукции штаммом *Pseudomonas chlororaphis* ИБ 6 веществ цитокининовой природы, позволяющие получать культуральную жидкость этих бактерий с концентрацией цитокининов свыше 1100 нг/мл, в том числе и три – О - пропионил - N6 - (Δ^2 - изопентенил)аденозина – новой формой цитокининоподобных веществ.

6. Показано, что антигрибная активность и накопление биомассы при культивировании штаммов *P. chlororaphis* ИБ 51, *P. chlororaphis* ИБ 6 и *P. putida* ИБ 17 главным образом зависят от концентрации дрожжевого автолизата и фосфатов в ферментационной среде.

7. Разработаны новые экономичные ферментационные среды на основе автолизатов отработанных пивных дрожжей, пекарских дрожжей для промышленной наработки биопрепаратов на основе бактерий рода *Pseudomonas* для защиты сельскохозяйственных растений от грибных фитопатогенов с максимальной антигрибной активностью и высоким титром клеток.

8. Оптимизированы условия периодического и непрерывного промышленного культивирования биопрепарата «Елена» и аналогичных биопестицидов на основе бактерий рода *Pseudomonas*. Показано, что антигрибная активность штамма *P. putida* ИБ 17, выращенного в оптимальных условиях, максимальна среди исследуемых штаммов псевдомонад.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Логинов О.Н., Четвериков С.П. Биосинтез низкомолекулярных метаболитов бактериями *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 // Биотехнология. - 2003. - № 5. - С. 22-25.
2. Логинов О.Н., Четвериков С.П., Гусаков В.Н. Триглицеридпептиды – новая группа антигрибных метаболитов псевдомонад (*Pseudomonas*) // Доклады Академии Наук. - 2003. - Т. 393, № 5. - С. 715-717.
3. Логинов О.Н., Четвериков С.П., Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э. Высокоэффективная жидкостная хроматография низкомолекулярных бактериальных метаболитов белковой природы, обладающих фунгицидной активностью // Журнал аналитической химии. - 2004. - Т. 59, № 3. - С. 310-314.
4. Логинов О.Н., Четвериков С.П. Триглицеридпептиды псевдомонад – новые агенты биологического контроля фитопатогенных грибов // Прикладная биохимия и микробиология. - 2005. - Т. 41, № 1.- С. 90-93.
5. Четвериков С.П., Асабина Е.А., Логинов О.Н. Оптимизация состава питательной среды для промышленного производства биопрепарата «Елена» // Башкирский химический журнал. - 2006. - Т. 13, № 2. - С. 10-13.
6. Сулейманова Л.Р., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Метаболиты бактерий рода *Pseudomonas*: экологичный механизм взаимодействия с растениями // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2007. - Вып. № 75. - С. 338-340.
7. Сулейманова Л.Р., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Комплексообразование триглицеридпептидов бактерий рода *Pseudomonas* с корневыми экссудатами растений // Башкирский химический журнал. - 2007. - Т. 14, № 3. - С. 47-51.
8. Сулейманова Л.Р., Асабина Е.А., Дубинина О.Н., Логинов О.Н., Четвериков С.П., Черняева Н.Ю., Хузнарязанова Р.Ф., Силищев Н.Н. Микроорганизм *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 и биопрепарат «Елена» // Токсикологический вестник. - 2008. - № 3. - С. 39-41.
9. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Сравнительный анализ математических моделей биосинтеза ингибиторов роста фитопатогенов псевдомонадами. // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2008. - Вып. № 86. - С. 122-124.
10. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Отработанные пивные дрожжи – компонент сред для промышленного производства биопрепаратов // Аграрная Россия. – 2009. Специальный выпуск. – С. 115.
11. Сулейманова Л.Р., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Комплексообразующая способность метаболитов псевдомонад с ионами металлов // Аграрная Россия. – 2009. Специальный выпуск. – С. 130-131.
12. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Оптимизация биосинтеза ингибиторов роста фитопатогенов бактериями рода *Pseudomonas* // Биотехнология. – 2009. № 3. – С. 67-71.
13. Четвериков С.П., Логинов О.Н. Новые метаболиты *Azotobacter vinelandii*, обладающие фунгицидной активностью // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 4. – С. 428-432.
14. Четвериков С.П., Сулейманова Л.Р., Логинов О.Н. Комплексообразование триглицеридпептидов псевдомонад с корневыми

экссудатами растений как механизм воздействия на фитопатогены // Прикладная биохимия и микробиология. -2009. Т. 45, №5. – С. 506-511.

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

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

17. Патент РФ № 2260951, 2005. Штамм бактерий *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 6 – продуцент цитокининов / Логинов О.Н., Мелентьев А.И., Свешникова Е.В., Кузьмина Л.Ю., Четвериков С.П., Васильева Н.С., Силищев Н.Н.

18. Патент РФ № 2303061, 2007. Питательная среда для культивирования бактерий рода *Pseudomonas* / Логинов О.Н., Силищев Н.Н., Коршунова Т.Ю., Четвериков С.П., Асабина Е.А.

ТЕЗИСЫ

1. Логинов О.Н., Четвериков С.П. Разработка методов выделения веществ, обладающих ростстимулирующей и фунгицидной активностью, из культуральной жидкости микроорганизмов рода *Pseudomonas* // Материалы XV Межд. научно-техн. конф. «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии» (7-10 октября 2002 г., Уфа). Гос. изд-во научно-техн. лит-ры «Реактив», Уфа, 2002. - Т. 1. - С. 108.

2. Логинов О.Н., Четвериков С.П. Низкомолекулярные метаболиты *Pseudomonas sp.*, обладающие ростстимулирующей и фунгицидной активностью // Материалы I Межд. Конгресса «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (14-18 октября 2002 г., Москва), М., 2002. - С. 496.

3. Логинов О.Н., Четвериков С.П. Низкомолекулярные токсины псевдомонад – ингибиторы роста фитопатогенных грибов // Материалы II Российской научно-практ. конф. «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов» (2-3 июня 2003 г., Москва), М., РАЕН-МААНОИ. - 2003. - С. 131.

4. Четвериков С.П., Логинов О.Н. Новые антигрибные метаболиты пептидной природы *Pseudomonas*, способные к комплексообразованию с углеводами // Материалы II Межд. конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (10-14 ноября 2003 г., г. Москва). М., 2003.-Ч. 1. - С. 338-339.

5. Логинов О.Н., Свешникова Е.В., Четвериков С.П. Агенты биологического контроля рода *Pseudomonas*, обладающие нитрогеназной активностью // Материалы II Межд. конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (10-14 ноября 2003 г., г. Москва). М., 2003.-Ч. 1. - С. 226-227.

6. Логинов О.Н., Свешникова Е.В., Четвериков С.П., Пугачева Е.Г., Васильева Н.С., Силищев Н.Н. Новые биопрепараты для сельского хозяйства и восстановления окружающей среды // Тез. докл. семинара-презентации инновационных научно-технических проектов «Биотехнология – 2003» (24-25 ноября 2003 г., г. Пущино, ИБФМ). Пущино, 2003. - С. 74-75.

7. Ильина И.Г., Гусаков В.Н., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Комплексообразование метаболитов *Pseudomonas* с цинком // Материалы XVII

Международной научно-технической конференции «Химические реагенты, реактивы и процессы малотоннажной химии» (12-14.10.2004 г., Уфа). Гос. изд-во научн-техн. лит-ры «Реактив», Уфа. - 2004. - С. 63-64.

8. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Оптимизация состава питательной среды для культивирования *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51-продуцента БАВ // Сборник тезисов IV Всероссийской научной INTERNET-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии», Уфа. -2006.- С.109.

9. Сулейманова Л.Р., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Комплексообразование метаболитов бактерий рода *Pseudomonas* с простыми углеводами // Сборник тезисов IV Всероссийской научной internet-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (15–25 декабря 2005 г., Уфа). – Уфа: Реактив, 2006. – С. 131–132.

10. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Оптимизация состава питательной среды для культивирования *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 6 - продуцента БАВ // Сборник тезисов XIX Международной научно-технической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии Реактив-2006», Уфа. - 2006. - С.48.

11. Сулейманова Л.Р., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Комплексообразование триглицеридпептидов бактерий рода *Pseudomonas* с эксудатами растений // Материалы XIX Международной научно-технической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии» (2–4.10.2006 г., Уфа). Уфа: Реактив, 2006. – Т. 1. – С. 109–110.

12. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Оптимизация состава питательных сред для культивирования бактерий рода *Pseudomonas*- продуцентов БАВ // Материалы I Всероссийской научно-практической конференции «Питательные среды и методы культивирования клеток для биологии, медицины и биоиндустрии: фундаментальные и прикладные аспекты», Пушкино 24-25 мая. - 2007.- С.7.

13. Асабина Е.А., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Отработанные пивные дрожжи компонент сред для промышленного производства биопрепаратов – фунгицидов // Современная микология в России. Том 2. материалы второго Съезда микологов России М.: Национальная академия микологии. - 2008. – С.286.

14. Сулейманова Л.Р., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Влияние бактериальных метаболитов на грибные фитопатогены растений // Современная микология в России. Том 2. Материалы 2-го Съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии. – 2008. – С. 331–332.

15. Сулейманова Л.Р., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Изучение механизма влияния БАВ псевдомонад на фитопатогены // Международная научно-техническая конференция «Китайско-российское научно-техническое сотрудничество. Наука-образование-инновации» – КНР, Харбин – Санья. 2008. Т. 1. – С. 68–69.

16. Сулейманова Л.Р., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Комплексообразование метаболитов бактерий рода *Pseudomonas* с ионами металлов // Материалы XIX Международной научно-технической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии». – Уфа: Реактив, 2008. – Т. 1. – С. 90–91.