

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ НАН БЕЛАРУСИ»

УДК 579.6+579.2+ 579.8

**МАНДРИК-ЛИТВИНКОВИЧ
МАРИНА НИКОЛАЕВНА**

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА БАКТЕРИЙ
PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM БИМ В-446 –
ОСНОВЫ БИОПЕСТИЦИДА «ЭКОГРИН»**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.02.03 – микробиология

Минск 2017

Научная работа выполнена в государственном научном учреждении «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»

Научный руководитель: **Коломиец Эмилия Ивановна**, доктор биологических наук, член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, генеральный директор государственного научно-производственного объединения «Химический синтез и биотехнологии» - директор государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»

Официальные оппоненты: **Прокулевич Владимир Антонович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета Белорусского государственного университета

Падутов Владимир Евгеньевич, доктор биологических наук, доцент, член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, заведующий лабораторией генетики и биотехнологии государственного научного учреждения «Институт леса Национальной академии наук Беларуси»

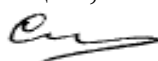
Оппонирующая организация: Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет»

Защита состоится 28 декабря 2017 г. в 10.00 ч на заседании совета по защите диссертаций Д 01.34.01 при государственном научном учреждении «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220141, г. Минск, ул. акад. В.Ф. Купревича, 2, тел.: (+375-17) 267-62-09, факс: (+375-17) 267-47-66, e-mail: microbio@mbio.bas-net.by

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»

Автореферат разослан 27 ноября 2017 г.

Ученый секретарь совета по защите диссертаций,
кандидат биологических наук



Т.В. Семашко

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертации. В настоящее время большое внимание уделяется вопросам защиты овощных и зеленных культур от болезней, приводящих к потере 40-70 % урожая. Проблема контроля фитопатогенных микроорганизмов – возбудителей болезней является особенно актуальной при выращивании растений в условиях защищенного грунта, в том числе с использованием малообъемных гидропонных технологий, которые, благодаря высокой экономической эффективности, получили широкое распространение в мире. В Беларуси активно развиваются парниково-тепличные хозяйства и внедряются новые технологии, обеспечивающие конкурентоспособность отечественной овощной и зеленой продукции. В настоящее время в республике функционирует 27 тепличных комбинатов общей площадью 270 га, из которой 70 % отведено под малообъемные технологии.

В условиях гидропонных систем опасность инфицирования возделываемых культур особенно велика, так как фитопатогены быстро распространяются с питательным раствором, приводя к массовым заболеваниям растений – эпифитотиям. К примеру, на зеленных культурах развитие корневых гнилей, вызываемых грибами родов *Fusarium* и *Pythium*, может достигать 43-100 % (Юзефович, 2012). Большую угрозу для тепличных хозяйств представляют грибы родов *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, часто выделяемые из поврежденных растений. Развитие указанных патогенов способны подавлять химические препараты, однако в связи с высокой токсичностью их применение в условиях малообъемной гидропоники запрещено. Это обуславливает необходимость разработки экологически безопасных биологических средств защиты растений (Hultberg, 2008; Gravel, 2006; Свергуненко, 1994).

Перспективными для биологического контроля фитопатогенов являются бактерии рода *Pseudomonas*, способные легко адаптироваться к условиям внешней среды и продуцировать комплекс биологически активных соединений с антимикробной, рост- и иммуностимулирующей активностями. Широкомасштабное использование биопрепаратов на основе ризосферных псевдомонад сдерживается недостатком научно-обоснованных данных о свойствах бактерий-антагонистов и механизмах их фитозащитного действия.

В этой связи особую актуальность приобретает изучение молекулярно-генетических и физиолого-биохимических особенностей бактерий рода *Pseudomonas* с выраженной антагонистической активностью к бактериальным и грибным патогенам овощных и зеленных культур – как основы создания высокоэффективных биопрепаратов для защиты растений в условиях малообъемной гидропоники.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами и темами. Диссертационная работа выполнена в лаборатории средств биологического контроля государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси» в рамках проектов: «Биопестициды и биоудобрения на основе осадка городских сточных вод» (грант «Visby Programme University Co-operation with Central-Eastern Europe», 2006-2007 годы); «Муниципальные отходы как сырье для культивирования бактерий *Pseudomonas aurantiaca* S-1, характеризующихся высокой антагонистической активностью к возбудителям болезней растений» (грант на выполнение научно-исследовательской работы аспирантами НАН Беларуси, 2007 г.); «Исследование механизмов регулирования физиологической активности и жизнеспособности бактерий – основы биопестицидов с целью повышения эффективности и стабильности их действия» (№ Б08Л-003, БРФФИ, 2006-2010 годы, № госрегистрации 20082446); «Разработать и внедрить технологию получения микробиологического препарата для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники» (задание 2.11, ГНТП «Промышленные биотехнологии», 2009-2010 годы, № госрегистрации 20093224); «Разработать и внедрить технологию получения биопрепарата Полибакт для восстановления микробоценозов почв и повышения урожайности сельскохозяйственных культур» (задание 1.21, ГНТП «Промышленные биотехнологии», 2011-2015 годы, № госрегистрации 20132022).

Тема диссертационной работы соответствует разделу 6. «Био- и наноиндустрия: нанотехнологии; биотехнологии в сельскохозяйственном производстве и пищевой промышленности» перечня приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016-2020 годы, утвержденного Указом Президента Республики Беларусь от 22.04.2015 № 166, и разделам 3. «Биологические системы и технологии» и 9. «Агропромышленный комплекс и продовольственная безопасность» перечня приоритетных направлений научной деятельности в Республике Беларусь на 2016-2020 годы, утвержденного постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 № 190.

Цель и задачи исследования. Цель исследования – получить и охарактеризовать штамм бактерий с комплексной антагонистической и ростстимулирующей активностью, разработать на его основе технологию получения биопестицида для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

выделить и идентифицировать фитопатогенные микроорганизмы, вызывающие заболевания овощных и зеленных культур в условиях малообъемной гидропоники;

выделить из природной среды и отселектировать бактериальный штамм с высокой антагонистической активностью к фитопатогенам овощных и зеленных культур, оценить его фитозащитные и ростстимулирующие свойства;

изучить физиолого-биохимические и молекулярно-генетические особенности штамма;

идентифицировать метаболиты, ответственные за антагонистическую активность бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446, и определить гены, обуславливающие синтез этих соединений;

разработать на основе бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 технологию получения биопестицида для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники.

Научная новизна.

Получен штамм бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446, отличающийся от известных аналогов наличием комплексной антимикробной и фитостимулирующей активности, способностью колонизировать субстраты гидропонных систем, перспективный для разработки биологических средств защиты растений.

В геноме бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 выявлены гены, кодирующие белки, участвующие в синтезе биологически активных соединений с фитозащитными (2,4-диацетилфлороглюцинол (2,4-ДАФГ), пиовердин, цианид) и ростстимулирующими свойствами (1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-дезаминаза (АЦК-дезаминаза), индолил-3-уксусная кислота).

Показано, что метаболитом, определяющим высокую антимикробную активность бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446, является поликетидный антибиотик широкого спектра действия 2,4-ДАФГ. Определена нуклеотидная последовательность *phl*-оперона, кодируемые белки которого контролируют синтез 2,4-ДАФГ (регистрационный номер в ГенБанк NCBI – KU507532). Выявлено, что в состав *phl*-оперона (9087 п.н.) входят 7 структурных (*phlA*, *phlC*, *phlB*, *phlD*, *phlE*, *phlI*, *phlG*) и 2 регуляторных (*phlF*, *phlH*) гена.

Установлено, что инактивация регуляторного гена *phlF* приводит к увеличению уровня продукции 2,4-ДАФГ в 2,7 раза и повышению антимикробной активности штамма *P. brassicacearum* БИМ В-446 в 1,4 раза.

Подобраны условия температурной обработки посевного материала *P. brassicacearum* БИМ В-446 (48 °С, 30 мин), позволяющие интенсифицировать рост бактерий и биосинтез целевых метаболитов, сократить продолжительность ферментации в 2 раза.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

- Штамм бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446, обладающий комплексной антимикробной и фитостимулирующей активностью, эффективно колонизирующий субстраты гидропонных систем, является оптимальной основой биопрепарата для защиты овощных и зеленных культур в условиях малообъемной гидропоники.
- 2,4-ДАФГ – метаболит, определяющий высокую антагонистическую активность штамма *P. brassicacearum* БИМ В-446 в отношении широкого спектра бактериальных и грибных фитопатогенов. Синтез антибиотика детерминируется 7 структурными (*phlA*, *phlC*, *phlB*, *phlD*, *phlE*, *phlI*, *phlG*) и 2 регуляторными (*phlF*, *phlH*) генами, организованными в *phl*-оперон, размером 9087 п.н.
- Технология получения биопестицида «Экогрин», основанная на глубинном культивировании бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 в оптимизированных условиях с использованием активированного в процессе температурной обработки (48 °С, 30 мин) посевного материала, обеспечивает сокращение продолжительности ферментации в 2 раза и снижение себестоимости готового продукта в 1,3 раза.

Личный вклад соискателя. Соискателем проанализирована научная литература по теме диссертации, получены и систематизированы экспериментальные данные, составляющие основу работы, осуществлен их анализ, обобщение и статистическая обработка, подготовлены публикации. Соавторами опубликованных работ являются сотрудники лабораторий средств биологического контроля и «Центр аналитических и генно-инженерных исследований» Института микробиологии НАН Беларуси, РУП «Институт защиты растений», УО «Гродненский государственный аграрный университет», биохимической лаборатории Химического центра Лундского университета (Швеция), Института микробиологии и биотехнологии Латвийского университета (Латвия).

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю члену-корреспонденту НАН Беларуси, доктору биологических наук Э.И. Коломиец за ценные консультации и поддержку на всех этапах выполнения и оформления диссертационной работы.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Материалы работы представлены на IV Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 12-16 марта 2007 г.); Международной научной конференции «Биоценотическая регуляция – основа современных фитосанитарных технологий» (Санкт-Петербург, 21-25 мая 2007 г.); Международной научной конференции молодых учёных и студентов «Modern problems of Microbiology and Biotechnology» (Одесса, 28-31 мая 2007 г.); VI Международной

конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, 2-6 июня 2008 г.); VII Международной научной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, 31 мая – 4 июня 2010 г.); 6 Европейском Конгрессе микробиологов FEMS (Маастрихт, 7-11 июня 2015 г.); IX Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 7-11 сентября 2015 г.); 7 Европейском Конгрессе микробиологов FEMS (Валенсия, 6-12 июля 2017 г.).

Технология получения биопестицида «Экогрин» на основе бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 внедрена в опытно-промышленное производство Института микробиологии НАН Беларуси.

Опубликование результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 19 работ, в том числе статей в рецензируемых научных журналах – 10, сборниках научных трудов – 2, материалах конференций – 3, тезисов докладов – 4. Объем публикаций, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, составляет 5,0 авторских листов. Получено 2 патента РБ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, пяти глав, заключения, списка литературы (в том числе списка использованных источников из 203 наименований), 11 приложений. Работа изложена на 144 страницах, содержит 38 таблиц на 21 листе и 21 рисунок на 11 листах.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обобщены литературные сведения о перспективах использования бактерий рода *Pseudomonas* для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники, дана физиолого-биохимическая и генетическая характеристика псевдомонад с антимикробной и ростстимулирующей активностями, рассмотрены основные подходы к созданию биопрепаратов фитозащитного действия на основе данных микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение микроорганизмов-антагонистов осуществляли из образцов почвы с растительными остатками и ризосферы сельскохозяйственных растений (Герхардт, 1980). Отбор бактерий-антагонистов проводили методами точечного тестирования и лунок (Сэги, 1983).

В качестве основного объекта исследования отобран штамм бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 с комплексной антагонистической и ростстимулирующей активностью, выделенный нами из образцов почвы с растительными остатками. Идентификацию культуры проводили по определителю Берджи (Берджи, 1997) и с использованием генетических методов исследования (анализ нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК, *groEL1*, *gyrB*, *leuB*, *oprI*, *recA*, *rpoD*, *pvdL*).

Для получения фагоустойчивых мутантов в колбу Эрленмейера вносили в равных объёмах культуральную жидкость (КЖ) бактерий (10^7 КОЕ/мл) и вирулентного фага (10^5 БОЕ/мл), после 48 ч совместного культивирования 100 мкл суспензии высевали на агаризованную среду и несколькими пересевами устойчивые бактерии очищали от фага.

Для получения антибиотикоустойчивых мутантов проводили селекцию бактерий на средах с возрастающей концентрацией эритромицина (50-150 мкг/мл), после чего клоны, резистентные к эритромицину (150 мкг/мл), пересевали на среды с доксициклином в концентрации 1-4 мкг/мл.

Глубинное культивирование бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 осуществляли при температуре 28–30 °С на оптимизированной питательной среде состава (г/л): меласса – 30,0; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 7,0; KH_2PO_4 – 3,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,5; Na-цитрат – 0,5; кукурузный экстракт (КЭ) – 2,5; вода – 1 л, в колбах Эрленмейера на качалке (200 об/мин) в течение 48 ч и в лабораторных ферментерах АНКУМ–10М при интенсивности перемешивания 180 об/мин, объеме подаваемого воздуха 1,0 л/л·мин и продолжительности процесса 24 ч. Норма внесения 1-суточного посевного материала 7-10 об.%. Инокулят, предназначенный для засева питательной среды в ферментере, предварительно прогревали 30 мин при 48 °С.

Для определения титра бактерий использовали метод предельных разведений (Звягинцев, 1980). Антагонистическую активность определяли методом лунок (Сэги, 1983). В качестве тест-объектов использовали фитопатогенные бактерии родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Pectobacterium* и фитопатогенные грибы родов *Plectosphaerella*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Botrytis*, *Epicoccum*, *Helmintosporium*, *Fusarium*, *Fusicladium*, *Pleiochaeta*, *Penicillium*, *Phoma*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Chaetomium*, полученные из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов и выделенные нами из пораженных тканей огурца, томата, укропа, петрушки.

Фитопатогенные микроорганизмы выращивали в колбах на качалке (200 об/мин) на питательной среде с бульоном Хоттингера при температуре 28-30 °С в течение 24 ч (бактерии) и на картофельно-глюкозной среде при температуре 24 °С в течение 48 ч (грибы).

Физиолого-биохимические свойства бактерий-антагонистов исследовали по общепринятым методам (Герхардт, 1980), морфологию бактериальных клеток изучали с использованием светового микроскопа (Kozo Optic XJS500, Китай) при увеличении (1600×).

Ферментативную активность КЖ (эндо-1,4-β-глюканазную, амилазную, ксиланазную, протеазную, лакказную, лигнин-пероксидазную) определяли спектрофотометрически с использованием хромогенных субстратов Megazyme и 2,2-азино-бис-[3-этилтиазолин-6-сульфоната] (Megazyme, 2006; Heinzkill, 1998).

Оценку фитотоксичности бактерий-антагонистов проводили на семенах салата, томата и огурца, результаты оценивали по всхожести семян, весу и степени развития проростков (Возняковская, 1969).

Изучение взаимодействия бактерий-антагонистов с фитопатогенными грибами проводили методом агаровых пластинок (Тирранен, 1989; Сэги, 1983) с использованием светового микроскопа (Kozo Optic XJS500, Китай) при увеличении (100×).

Для определения концентрации 2,4-ДАФГ проводили экстракцию антибиотика из КЖ этилацетатом, полученный экстракт высушивали на вакуумном испарителе IKARV 10 basic (Германия), растворяли в ацетонитриле и анализировали на масс-спектрометре Accurate-MassQ-TOFLC/MSSystem (США).

Генетические методы исследования. Геномную ДНК выделяли с использованием набора реагентов Bacteria DNA Preparation Kit (Jena Bioscience). Библиотеку ДНК для секвенирования готовили при помощи набора Nextera XT (Illumina). Определение нуклеотидных последовательностей проводили на приборе MiSeq (Illumina) с использованием комплекта реактивов MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina).

Поиск генов, обуславливающих синтез биологически активных соединений, осуществляли с помощью программы BLAST (Altschul, 1990). Аннотацию *phl*-оперона проводили с помощью программ BPROM (Solovyev, 2011), ARNold (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold>), SigmID (Nikolaichik, 2016), SQ (Николайчик, 2010).

Фрагменты генов *phlA* (575 п.н.) и *phlF* (550 п.н.) амплифицировали с использованием праймеров *phlA*-F (5'-ATC GTA CAC ATG AAT AAA GTA GG-3'), *phlA*-R (ATC TTG TCA GCG ACA TCT GC) и *phlF*-F (5'-CAT CAG AAG TGT CGT CAA TTC ATT GAT-3'), *phlF*-R (5'-ATC CAT TGG CTC ATT GAG GAG-3'). Режим: 96 °C – 3 мин (1 цикл); 96 °C – 15 сек, 53 °C – 15 сек, 72 °C – 30 сек (20 циклов); 72 °C – 3 мин (1 цикл).

Инактивацию генов *phlF* и *phlA* осуществляли путем введения суицидальных плазмид pK18mob-*phlF*::Ω-Tn5 и pK18mob-*phlA*::Ω-Tn5 из штамма *E. coli* BW19851 в бактерии *P. brassicacearum* БИМ В-446 методом конъюгации.

Отбор мутантов проводили по устойчивости к стрептомицину (50 мкг/мл) (селективный маркер) и эритромицину (50 мкг/мл) (контрселективный маркер).

Фитозащитное действие биопестицида «Экогрин» оценивали совместно с РУП «Институт защиты растений» на культурах укропа (сорт *Gold Crown*), петрушки (сорт *Mooskrause*) и огурца (сорт *Цезез F1*) в условиях УП «Минский парниково-тепличный комбинат», а также на культурах огурца (гибрид *Мирабелл F1*) и томата (гибрид *Торперо F1*) в условиях РУП «Гродненская овощная фабрика» совместно с УО «Гродненский государственный аграрный университет». Пораженность растений болезнями и биологическую эффективность биопестицида определяли согласно общепринятым методикам (Прищепа, 2008).

Статистическую обработку результатов (значения средних арифметических и их доверительных интервалов для уровня вероятности 95 %) осуществляли с использованием компьютерных программ Microsoft Excel 2010 и Statistica for Windows, v. 6.0 (Тюрин, 1998).

ПОЛУЧЕНИЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА БАКТЕРИЙ *P. BRASSICACEARUM* БИМ В-446 – АНТАГОНИСТА ПАТОГЕНОВ ОВОЩНЫХ И ЗЕЛЕННЫХ КУЛЬТУР

Из образцов почвы с растительными остатками и ризосферы растений выделено 300 культур бактерий, проанализирована их способность подавлять рост и развитие 10 грибных (*Epiccocum nigrum* Л-1, *Alternaria alternata* П-Л-2, F-C-1, *Botrytis cinerea* F-C-2, *Plectosphaerella cucumerina* F-C-5, *Fusarium oxysporum* КГ-4, КГ-3, *Fusarium* sp. 4, F-C-4, *Pythium* sp. КГ-5) и 2 бактериальных (*Pseudomonas syringae* Л-3, *Xanthomonas campestris* Л-4) фитопатогенов, изолированных нами из пораженных тканей овощных и зеленных культур. Установлено, что 150 бактерий в различной степени подавляют развитие фитопатогенных бактерий и грибов, а 10 из них (*Bacillus* sp. М-17, М-19, М-22, М-1, *Paenibacillus* sp. М-2, М-16, *Pseudomonas* sp. S, М-11, F-1, F-2) обладают комплексной антибактериальной и антифунгальной активностью. Для дальнейших исследований отобран штамм *Pseudomonas* sp. S, ингибирующий рост всех испытанных фитопатогенов (таблица 1).

С целью повышения технологичности и обеспечения селективных преимуществ получен фагоустойчивый штамм *Pseudomonas* sp. S-1, резистентный к эритромицину (150 мкг/мл) и доксициклину (4 мкг/мл), не уступающий исходному штамму по скорости роста и антимикробной активности.

Установлено, что бактерии *Pseudomonas* sp. S-1 являются строгими аэробами, в факторах роста не нуждаются, разжижают желатин, восстанавливают нитраты до нитритов, гидролизуют крахмал, пептонизируют молоко,

каталазоположительные, утилизируют цитрат, способны к кислотообразованию из сахаров (глюкоза, арабиноза, ксилоза), синтезируют два водорастворимых пигмента – коричнево-оранжевый и флуоресцирующий желто-зеленый, растут в температурном диапазоне от 5 °С до 37 °С, при рН 5,5-9,0, выдерживают 7-10 % NaCl [6]. Исследуемый штамм утилизирует широкий спектр углеводов, включая глюкозу, фруктозу, сахарозу, арабинозу, галактозу, трегалозу, раффинозу, инозит, глицерин, маннит, сорбит, дульцид, маннозу, рамнозу, крахмал; растет на среде Муромцева с фосфатом кальция, образуя зоны растворения фосфатов диаметром 14-16 мм; продуцирует гидролитические и окислительно-восстановительные ферменты – эндо-1,4-β-глюканазу, амилазу, протеазу, лакказу, пероксидазу, благодаря чему может использовать в качестве единственных источников углерода натрий карбоксиметилцеллюлозу, гидролизный лигнин, крафт лигнин. При росте на полноценных питательных средах продуцирует индолил-3-уксусную кислоту (2,7-2,9 мкг/мл) [3, 4, 7, 13].

По физиолого-биохимическим свойствам бактерии *Pseudomonas* sp. S-1 отнесены к виду *Pseudomonas aurantiaca*.

С помощью сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей ряда генов (*groEL1*, *gyrB*, *leuB*, *oprI*, *recA*, *rpoD*, *pvdL*) уточнен таксономический статус исследуемых бактерий до вида *P. brassicacearum*, принадлежащего к обширной филогенетической группе *P. fluorescens*, включающей ряд ризосферных бактерий с фитостимулирующей активностью.

Штамм *P. brassicacearum* S-1 не патогенен и не токсигенен, депонирован в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов как *P. brassicacearum* БИМ В-446.

Установлено, что использование 2 % рабочего раствора КЖ бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 ($4,6-5,5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл) повышает всхожесть семян салата, огурца и томата на 4-8 %, вес проростков, длину надземной части и корня – на 5,8-15,3 %, 14,8-25,0 % и 4,3-8,7 %, соответственно, что свидетельствует о ростстимулирующей активности штамма [7].

Показано, что в условиях малообъемной гидропоники при выращивании огурца, укропа и петрушки бактерии *P. brassicacearum* БИМ В-446 активно колонизируют минеральную вату и торфогрунт, снижая количество патогенных грибов *P. cucumerina* в ризосфере огурца в 10,0-10,5 раза, грибов *Fusarium* sp. в ризосфере укропа и петрушки в 2,5-3,0 и 9,5-10,0 раз, соответственно [5].

По ряду хозяйственно-ценных свойств штамм *P. brassicacearum* БИМ В-446 превосходит известные аналоги (*Pseudomonas* sp. 7Г, *Pseudomonas* sp. 7Г2К, *Pseudomonas* sp. 17-2) и защищен патентом РБ [20].

Таблица 1. – Спектр антимикробной активности отобранных бактерий-антагонистов

Штамм бактерий	Диаметр зоны подавления роста тест-объекта, мм											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>Bacillus</i> sp. M-1	19±2,0	24±1,0	20±1,0	16±2,0	15±1,0	20±1,0	20±1,0	20±2,0	19±1,0	16±2,0	25±1,0	23±1,0
<i>Paenibacillus</i> sp. M-2	17±2,0	-	-	24±2,0	16±2,0	20±1,0	20±0,5	20±1,0	20±1,0	-	-	20±2,0
<i>Pseudomonas</i> sp. M-11	16±2,0	-	-	23±0,5	17±1,0	15±2,0	15±1,0	20±1,0	21±1,0	-	19±2,0	23±0,5
<i>Paenibacillus</i> sp. M-16	-	-	-	16±2,0	16±1,0	14±0,5	16±0,5	14±1,0	15±0,5	-	-	18±0,5
<i>Bacillus</i> sp. M-17	-	-	-	-	-	16±0,2	16±0,5	16±1,0	16±0,5	-	-	18±0,5
<i>Bacillus</i> sp. M-19	16±1,5	18±0,5	18±0,5	18±2,0	20±1,0	20±0,5	20±0,5	20±0,5	21±0,5	17±0,5	23±1,0	23±1,0
<i>Bacillus</i> sp. M-22	17±0,5	24±1,0	22±0,5	17±0,5	24±0,3	24±1,0	20±1,0	20±0,5	22±0,5	20±0,5	21±1,0	23±0,5
<i>Pseudomonas</i> sp. S	23±1,0	26±0,5	25±0,5	27±1,0	28±1,5	22±1,0	22±1,0	26±1,0	24±1,5	22±0,5	23±1,0	25±1,0
<i>Pseudomonas</i> sp. F-1	-	-	-	-	-	14±1,0	20±1,0	-	-	-	19±0,7	20±0,5
<i>Pseudomonas</i> sp. F-7	-	-	-	25±1,0	-	-	-	14±1,5	17±0,5	-	-	18±0,5

Примечание – I. - *E. nigrum* Л-1, II. - *A. alternata* П-Л-2, III. - *A. alternata* F-C-1, IV. - *B. cinerea* F-C-2, V. - *P. cucumerina* F-C-5, VI. - *F. oxysporum* КГ-4, VII. - *F. oxysporum* КГ-3, VIII. - *Fusarium* sp. 4, IX. - *Fusarium* sp. F-C-4, X - *Pythium* sp. КГ-5, XI- *P. syringae* Л-3, XII. - *X. campestris* Л-4

ОСОБЕННОСТИ АНТАГОНИСТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИЙ *P. BRASSICACEARUM* БИМ В-446

Установлено, что бактерии *P. brassicacearum* БИМ В-446 обладают широким спектром антагонистического действия, подавляют рост и развитие не только патогенов овощных и зеленных культур, выращиваемых в условиях малообъемной гидропоники, но и возбудителей болезней картофеля, ячменя, пшеницы, люпина, сои, капусты, моркови и др. (таблица 2) [1-3, 7, 8, 11, 12, 14-19].

Таблица 2. – Влияние бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 на рост фитопатогенных микроорганизмов (метод лунок)

Патоген	Болезнь	Диаметр зоны подавления роста, мм
Фитопатогенные грибы		
<i>A. alternata</i> F-C-1	альтернариоз огурца	26,0±0,5
<i>A. brassicae</i> F-B-1	альтернариоз капусты	24,0±1,5
<i>C. globosum</i> F-C-5	корневая гниль огурца	19,2±0,5
<i>C. lupini</i> БИМ F-397	антракноз люпина	27,0±0,5
<i>B. cinerea</i> БИМ F-383	серая гниль люпина	29,0±1,0
<i>B. cinerea</i> F-Beta-2	кагатная гниль сахарной свеклы	29,0±0,5
<i>B. cinerea</i> F-C-2	серая гниль огурца	28,6±0,5
<i>F. oxysporum</i> КГ -3	корневая гниль томата	24,5±1,0
<i>F. culmorum</i> БИМ F-459	фузариоз ячменя	30,5±0,5
<i>F. avenaceum</i> БИМ F-458	фузариоз ячменя	26,5±1,0
<i>Fusarium</i> sp. F-C-4	корневая гниль зеленных культур	26,0±0,5
<i>H. sativar</i> БИМ F-464	корневая гниль пшеницы	24,5±0,5
<i>P. expansum</i> F-Beta-9	кагатная гниль сахарной свеклы	19,0±0,5
<i>P. betae</i> БИМ F-461	кагатная гниль сахарной свеклы	23,0±1,0
<i>P. setosa</i> F-Lup-5	бурая пятнистость люпина	29,2±0,5
<i>P. cucumerina</i> БИМ F-571	некроз огурца	26,0±0,5
<i>R. solani</i> F-S-9	ризоктониоз картофеля	26,5±0,5
Фитопатогенные бактерии		
<i>P. carotovorum</i> БИМ В-662	мокрые гнили овощных культур	19,5±1,5
<i>P. syringae</i> В-М-3	бактериальный рак плодовых	26,0±0,5
<i>P. syringae</i> 239	бактериозы зерновых культур	26,0±0,5
<i>X. campestris</i> БИМ В-634	сосудистый бактериоз капусты, моркови	25,3±0,5
<i>X. phaseoli</i> БИМ В-279	угловатая пятнистость сои	25,0±1,5

Ингибирующее действие бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 на фитопатогенные грибы родов *Fusarium* и *Colletotrichum* проявляется на стадии прорастания спор и формирования мицелия (рисунки 1, 2). При обработке спор фитопатогенных грибов КЖ бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 их прорастание замедляется на 4-6 ч по сравнению с контролем. При этом проросшие споры останавливаются в развитии и не способны к формированию мицелия. При обработке мицелия наблюдаются морфологические изменения гиф – опухолевидные вздутия, пролиферация концевых клеток, суперскрученность.

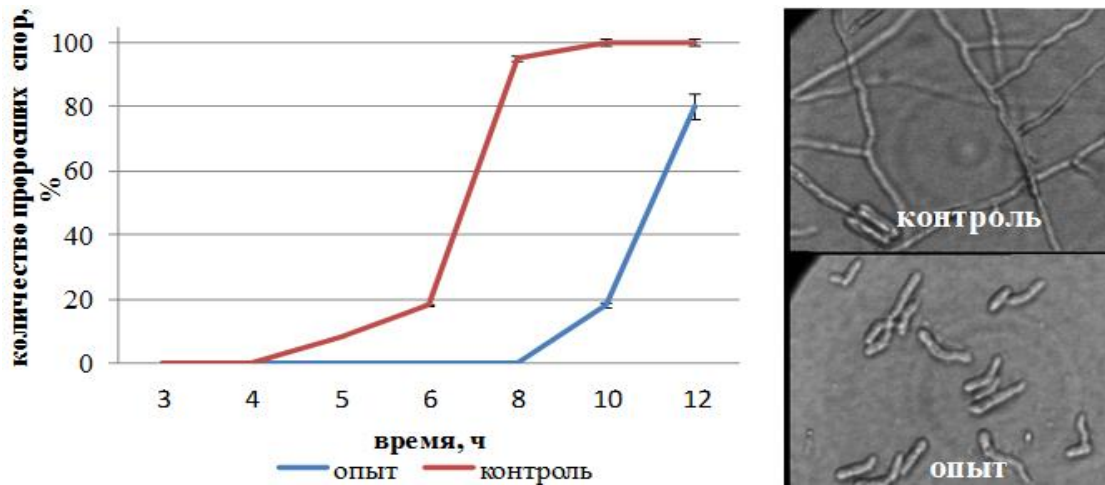
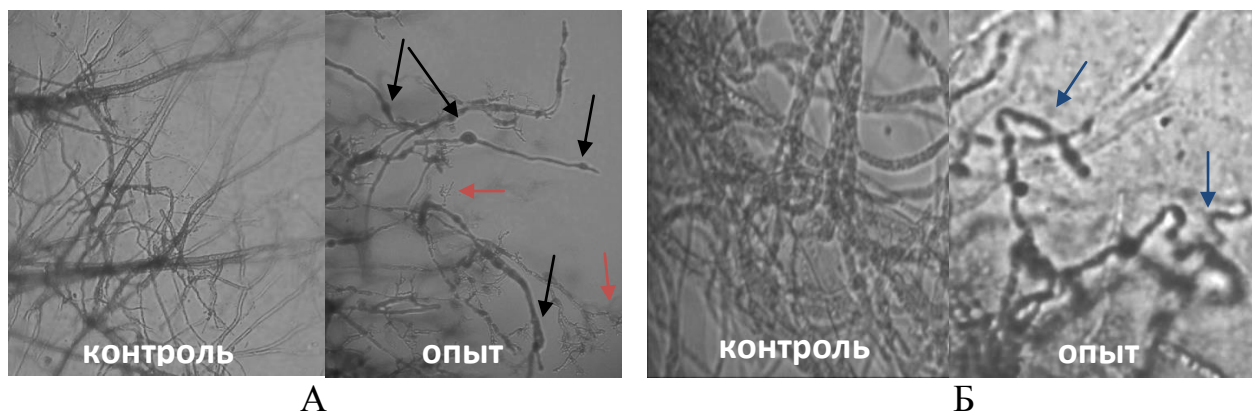


Рисунок 1. – Влияние КЖ бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 на прорастание спор гриба *C. lupini* БИМ F-397



↓ - опухолевидные вздутия; ↓ - усиленная пролиферация концевых клеток;
 ↓ - суперскрученность гиф

Рисунок 2. – Действие КЖ бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 на мицелий грибов *F. culmorum* БИМ F-459 (А) и *F. oxysporum* КГ-3 (Б)

Установлено, что ключевая роль в антифунгальном действии бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 принадлежит экзометаболизму (таблица 3) [8].

Таблица 3. – Антагонистическое действие клеточных и внеклеточных фракций бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 на фитопатогенные микроорганизмы

Фитопатоген	Диаметр зоны подавления роста, мм			
	КЖ	бесклеточный фильтрат	интактные клетки	разрушенные клетки
<i>F. oxysporum</i> КГ-3	28±0,9	25±0,6	13±0,8	14±1,0
<i>P. syringae</i> Л-3	27±0,5	23±0,3	12±0,9	12±0,9

С помощью масс-спектрометрического анализа показано, что в КЖ *P. brassicacearum* БИМ В-446 содержится поликетидный антибиотик широкого спектра действия 2,4-ДАФГ в концентрации 2,5-2,6 мкг/мл, а также его предшественник – флороглюцинол (рисунок 3). Полученные результаты согласуются с данными литературы (Смирнов, 1990), что некоторые виды псевдомонад продуцируют 2,4-ДАФГ, содержание которого в антимикробном комплексе может достигать 80 %.

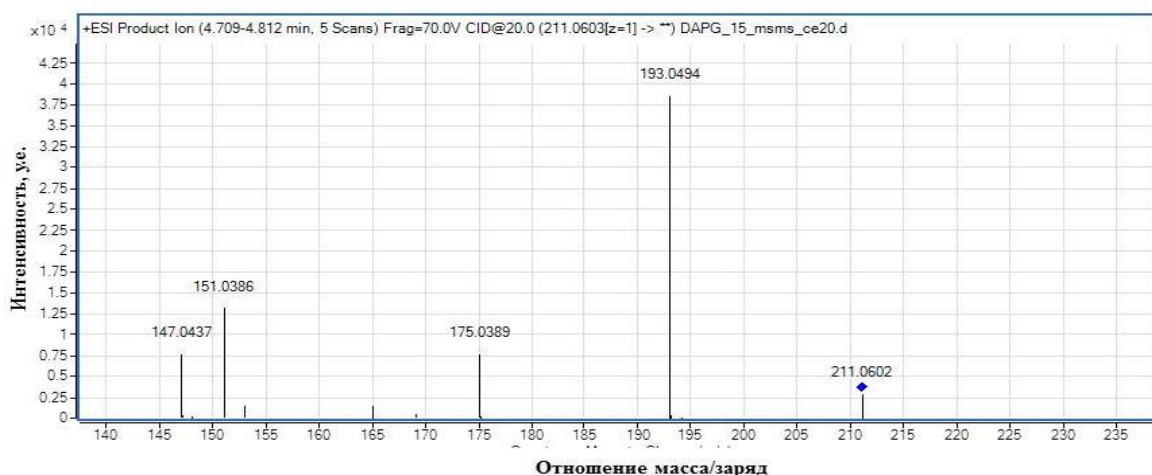
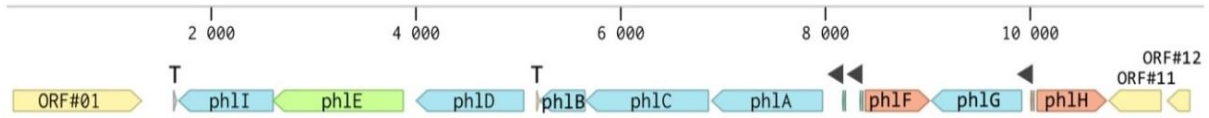


Рисунок 3. – Масс-спектрометрический анализ 2,4-ДАФГ в КЖ *P. brassicacearum* БИМ В-446

В результате анализа полной нуклеотидной последовательности генома бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 установлено наличие генов, кодирующих белки, участвующие в синтезе 2,4-ДАФГ (*phl*-оперон), а также ряда других биологически активных соединений, таких как пиовердин (*pvd*-оперон), цианид (*hcn*-оперон), индолил-3-уксусная кислота (*iaaM*), лакказы (*Cu-oxidase_4*), пероксидазы (*prk15061*), амилазы (*amyL*, *amyC*), протеазы (*prtC*), глюканазы (*xghA*), глюкозидазы (*nagZ*, *treA*), фитазы (*phy*) и АЦК-дезаминазы (*acdS*).

Детально изучен *phl*-оперона бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 (рисунок 4). Оперон имеет размер 9087 п.н. и организован подобно другим *phl*-оперонам бактерий рода *Pseudomonas*: содержит 7 структурных (*phlA*, *phlC*, *phlB*, *phlD*, *phlE*, *phlI*, *phlG*) и 2 регуляторных (*phlF*, *phlH*) гена.

Согласно данным литературы, *phl*-оперон может иметь различное окружение у представителей одного рода псевдомонад (Nowak-Thompson, 1994). Для штамма *P. brassicacearum* БИМ В-446 выявлены отличия для 3'-конца *phl*-оперона – за *phlI* геном расположен ген, кодирующий порин (на рисунке 4 ген обозначен *orf1*), ранее не описанный для окружения *phl*-оперона.



названия генов соответствуют известным гомологичным детерминантам. Т - терминаторные последовательности, черный треугольник – возможные промоторные последовательности, узнаваемые RpoD сигма-фактором
Рисунок 4. – Генетическая карта локуса, определяющего синтез 2,4-ДАФГ у бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446

Для проверки роли 2,4-ДАФГ в антимикробном действии *P. brassicacearum* БИМ В-446 использовали направленный мутагенез. Получен ряд мутантов, одни из которых не способны к синтезу 2,4-ДАФГ (с дефектным первым структурным геном *phlA*), а другие характеризуются повышенной продукцией антибиотика на уровне 7,5-7,8 мкг/мл (с дефектным регуляторным геном *phlF*) (рисунок 5).

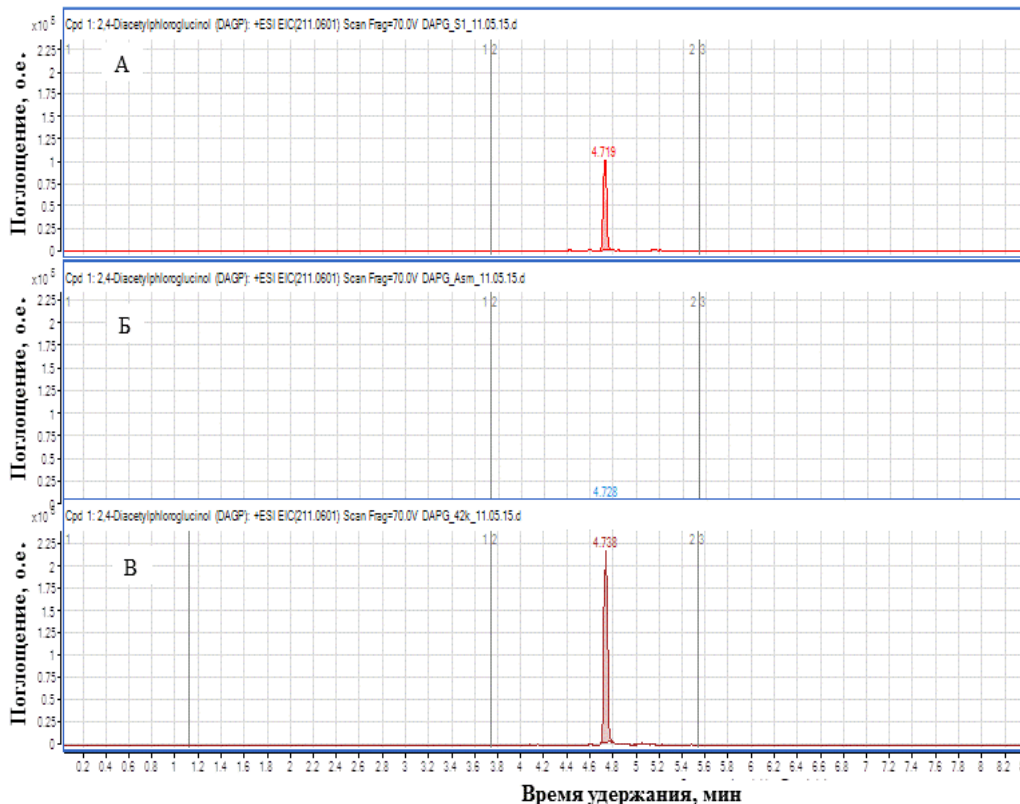


Рисунок 5. – Хроматографический анализ содержания 2,4-ДАФГ в КЖ *P. brassicacearum* БИМ В-446: А) штамм дикого типа; Б) мутант с дефектным геном *phlA*; В) мутант с дефектным геном *phlF*

Показано, что мутанты, не способные к синтезу 2,4-ДАФГ, не подавляют развитие фитопатогенных грибов родов *Fusarium*, *Botrytis* и бактерий рода *Pseudomonas*, тогда как мутанты с повышенной в 2,7-3,1 раза продукцией антибиотика по показателям антимикробной активности превосходят исходный штамм в 1,4 раза [9]. Полученные результаты подтверждают важную роль 2,4-ДАФГ в антимикробном действии *P. brassicacearum* БИМ В-446.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПЕСТИЦИДА «ЭКОГРИН» ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОВОЩНЫХ И ЗЕЛЕННЫХ КУЛЬТУР В УСЛОВИЯХ МАЛООБЪЕМНОЙ ГИДРОПОНИКИ

Разработка технологии получения биопестицида «Экогрин», основанной на глубинном культивировании бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446, включала оптимизацию состава питательной среды и технологических параметров ферментационного процесса.

В процессе оптимизации состава питательной среды установлено, что замена сахарозы отходом свеклосахарного производства – мелассой (30 г/л) и внесение кукурузного экстракта (2,5 г/л) в качестве дополнительного источника азота позволяют повысить показатели титра бактерий ($3,5 \pm 0,1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл), антимикробной активности ($25,0 \pm 0,5$ - $26 \pm 0,5$ мм) и выхода 2,4-ДАФГ ($2,70 \pm 0,05$ мкг/мл) по сравнению с контрольной средой Мейнелла (таблица 4).

Таблица 4. – Показатели роста и антагонистической активности бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 на контрольной и оптимизированной питательных средах

Показатели	Среда Мейнелла (контроль)	Оптимизированная среда
		сахароза – 20,0; K_2HPO_4 – 7,0; KH_2PO_4 – 3,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; Na-цитрат – 0,5; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0; вода водопроводная – 1 л.
Титр, КОЕ/мл	$2,8 \pm 0,2 \cdot 10^9$	$3,5 \pm 0,1 \cdot 10^9$
Диаметр зоны подавления роста тест- объекта, мм		
<i>F. oxysporum</i> КГ-3	$23,0 \pm 0,5$	$25,0 \pm 0,5$
<i>P. syringae</i> Л-3	$24,0 \pm 1,0$	$26,0 \pm 0,5$
Концентрация 2,4-ДАФГ, мкг/мл	$2,50 \pm 0,10$	$2,70 \pm 0,05$

Показано, что оптимальные условия для роста и накопления антимикробных метаболитов культурой *P. brassicacearum* БИМ В-446 достигаются при исходном рН среды 6,5-7,5, температуре культивирования 28–30 °С, норме внесения односуточного посевного материала (титр КОЕ $5,0-5,5 \cdot 10^8 - 1,0-1,2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл) 7-10 % от объёма среды, интенсивности вращения мешалки 180 об/мин, количестве подаваемого воздуха 1,0 л/л·мин.

Подобраны условия температурной обработки посевного материала *P. brassicacearum* БИМ В-446 (48 °С, 30 мин), позволяющие интенсифицировать рост и биосинтез целевых метаболитов бактериями, и, как следствие, сократить продолжительность ферментации с 48 до 24 ч.

При изучении динамики периодического роста бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 в оптимизированных условиях установлено, что кривая роста культуры имеет классический вид: лаг-фаза составляет 2 ч, фаза экспоненциального роста – 20-22 ч. Максимальная удельная скорость роста приходится на 5-6 ч и составляет $0,37-0,38 \text{ ч}^{-1}$. К 24 ч ферментации культура переходит в стационарную фазу развития, достигаются максимальные показатели титра клеток ($4,2 \pm 0,1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл), выхода биомассы (4,0-4,2 г/л), продукции 2,4-ДАФГ ($3,1 \pm 0,1$ мкг/мл) и антимикробной активности (диаметр зон задержки роста тест-объектов $26 \pm 0,5-27 \pm 1,0$ мм) (рисунок 6).

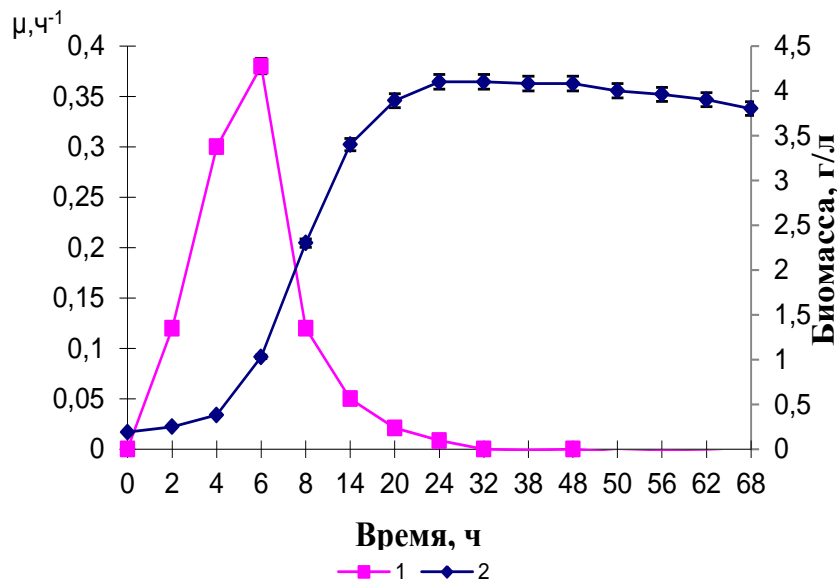


Рисунок 6. – Удельная скорость роста (1) и выход биомассы (2) бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 при культивировании в оптимизированных условиях

По результатам исследований разработана нормативная документация: ТУ ВУ 100289066.070-2010 на биопестицид «Экогрин», лабораторный (ЛР-10/2009) и опытно-промышленный (ОПР-07/2010) регламенты на производство биопрепарата «Экогрин» на основе бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 [10, 21].

Использование разработанной технологии получения биопестицида «Экогрин» позволяет сократить время культивирования бактерий до 24 ч и уменьшить себестоимость готового продукта в 1,3 раза, что при сравнительно невысоких энерго- и трудозатратах обеспечивает получение высококачественной продукции (таблица 5).

Таблица 5. – Некоторые технико-экономические показатели получения биопестицида «Экогрин»

Показатели	До оптимизации технологии	После оптимизации технологии
Титр, КОЕ/мл	$2,8 \pm 0,1 \cdot 10^9$	$4,2 \pm 0,1 \cdot 10^9$
Диаметр зоны подавления роста тест-объекта, мм		
<i>F. oxysporum</i> КГ-3	23±0,5	26±0,5
<i>P. syringae</i> Л-3	24±0,5	27±1,0
Концентрация 2,4-ДАФГ, мкг/мл	2,50±0,05	3,1±0,1
Продолжительность ферментации, ч	48	24
Энергозатраты, руб.	0,81	0,49
Трудозатраты, руб.	1,06	0,88
Стоимость 1 л препарата, руб.	6,8	5,1

По результатам производственных испытаний в УП «Минский парниково-тепличный комбинат» и РУАП «Гродненская овощная фабрика» биопестицид «Экогрин» зарегистрирован и включен в «Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь» на зеленных и овощных культурах.

Согласно полученным совместно с РУП «Институт защиты растений» в условиях УП «Минский парниково-тепличный комбинат» учетным показателям биологическая эффективность препарата против стеблевой формы серой гнили огурца (сорт *Цезез F1*) составляет 49-64 %, корневой гнили укропа (сорт *Gold Crown*) и петрушки (сорт *Mooskrause*) – 24,4-69,8 и 20,9-40,2 % соответственно. Биологическая эффективность от применения препарата в РУАП «Гродненская овощная фабрика» против корневых и прикорневых гнилей на томате (гибрид *Торреро F1*) и огурце (сорт *Мирабелла F1*) достигает 44,6 и 40,4 % соответственно. Прибавка урожая овощных и зеленных культур при применении биопестицида «Экогрин» – 6,9-10,0 % [5, 10, 21].

Технология освоена на опытно-промышленном производстве Института микробиологии НАН Беларуси. В период 2011-2017 гг. произведено и реализовано 8 540 л биопестицида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Получен штамм бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446, характеризующийся высокой антагонистической активностью к грибным (*Alternaria*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Plectosphaerella*, *Pythium*) и бактериальным (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*) патогенам, вызывающим заболевания овощных и зеленных культур. Штамм способен развиваться в широком диапазоне температур (5-37 °С) и кислотности среды (рН 5,5-9,5), продуцировать гидролитические и окислительно-восстановительные ферменты (эндо-1,4-β-глюканазу, амилазу, протеазу, лакказу, пероксидазу), утилизировать широкий спектр углеродсодержащих субстратов (в том числе лигнинсодержащих). Стимулирует рост и развитие растений, в условиях малообъемной гидропоники активно колонизирует субстраты (минеральную вату и торфогрунт) и подавляет развитие патогенных грибов в ризосфере [3-7, 13]. По ряду хозяйственно-ценных свойств штамм *P. brassicacearum* БИМ В-446 превосходит известные аналоги и защищен патентом РБ [20].
2. Антагонистическое действие бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 в отношении фитопатогенных грибов обусловлено продукцией экзометаболитов и проявляется в ингибировании прорастания спор, образовании опухолевидных вздутий и суперскрученности гиф в процессе формирования мицелия [1-3, 5, 7, 8, 11, 12, 14-19].
3. Одним из ключевых антимикробных соединений бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 является поликетидный антибиотик широкого спектра действия 2,4-ДАФГ, накапливающийся в КЖ в концентрации 2,5-3,1 мкг/мл. Синтез 2,4-ДАФГ кодируется *phl*-опероном (9087 п.н.), состоящим из 7 структурных (*phlA*, *phlC*, *phlB*, *phlD*, *phlE*, *phlI*, *phlG*) и 2 регуляторных (*phlF*, *phlH*) генов. Нуклеотидная последовательность *phl*-оперона *P. brassicacearum* БИМ В-446 депонирована в ГенБанк NCBI (регистрационный номер KU507532). Мутанты *P. brassicacearum* БИМ В-446, не способные к синтезу 2,4-ДАФГ, не подавляют развитие фитопатогенов, а мутанты с повышенной в 2,7-3,1 раза продукцией антибиотика по показателям антимикробной активности превосходят исходный штамм в 1,4 раза [9].
4. Оптимизированы состав питательной среды и условия глубинного культивирования бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446, подобраны условия температурной обработки посевного материала (48 °С, 30 мин), разработана

технология получения биопестицида «Экогрин», обеспечивающая конкурентоспособность производимой продукции за счет высоких качественных показателей (титр $4,2 \pm 0,1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, диаметр зон задержки роста фитопатогенов *F. oxysporum* КГ-3 и *P. syringae* Л-3 – 26-27 мм), сокращения продолжительности ферментационного процесса в 2 раза и снижения себестоимости в 1,3 раза [10, 21].

5. Биопестицид «Экогрин» успешно применен для контроля патогенов овощных и зеленных культур в условиях малообъемной гидропоники. Биологическая эффективность биопестицида против стеблевой формы серой гнили огурца (сорт *Цезез* F1) составила 49–64 %, корневых и прикорневых гнилей томата (гибрид *Торрепо* F1) и огурца (сорт *Мурабелла* F1) – 44,6 и 40,4 % соответственно, корневой гнили укропа (сорт *Gold Crown*) и петрушки (сорт *Mooskrause*) – 24,4–69,8 и 20,9–40,2 %, соответственно. Прибавка урожая овощных и зеленных культур при применении биопестицида «Экогрин» достигает 6,9-10 % [5, 10].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Для организации производства биологических средств защиты растений рекомендуются штамм бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 с высокими фитозащитной и ростстимулирующей активностями, депонированный в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов; биопестицид «Экогрин» на основе штамма бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники.

Разработана техническая документация: лабораторный ЛР-10/2009 и опытно-промышленный ОПр-07/2010 регламенты на производство биопестицида, технические условия на биопестицид «Экогрин» (ТУ ВУ 100289066.070-2010). Технология получения биопестицида внедрена в опытно-промышленное производство Института микробиологии НАН Беларуси.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых изданиях:

1. Influence of cultural factors on antimicrobial activity of biological control agents for legume crops protection / **M. N. Mandryk (Mandryk-Litvinkovich)**, V. N. Kuptsov, E.I. Kolomiets, N. I. Girilovich // *Phytopathologia polonica*. – 2007. – Vol. 44. – P. 7–15.

2. **Mandryk (Mandryk-Litvinkovich), M. N.** Characterization of antimicrobial compounds produced by *Pseudomonas aurantiaca* S-1 / **M. N. Mandryk (Mandryk-Litvinkovich)**, E. I. Kolomiets, E. S. Dey // *Polish Journal of Microbiology* – 2007. – Vol. 56, № 4. – P. 245–250.

3. **Мандрик (Мандрик-Литвинкович), М. Н.** Перспективы использования осадка городских сточных вод в качестве питательной среды для культивирования бактерий *Pseudomonas aurantiaca* S-1 – основы биопестицида для защиты зернобобовых культур от болезней / **М. Н. Мандрик (Мандрик-Литвинкович)** // Молодежь в науке – 2007 : прил. к журн. Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2007. – С.173–176.

4. Sludge and lignin as growth media for the production of antimicrobial substances by selected microorganisms / **M. N. Mandryk (Mandryk-Litvinkovich)**, E. I. Kolomiets, V. Shapaval, E. S. Dey // *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. – 2009. – Vol. 42, № 8. – P.783–795.

5. Бактерии *Pseudomonas aurantiaca* БИМ В-446 – основа биопрепарата Экогрин для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники / Э. И. Коломиец, В. Н. Купцов, Н. В. Сверчкова, Н. В. Евсегнеева, **М. Н. Мандрик-Литвинкович**, Л. Т. Мишин, Д. В. Войтка, А. И. Рапопорт, Г. М. Хрусталева // *Микробные биотехнологии: функциональные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Ин-т микробиологии ; редкол. : Э. И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2012. – Т. 4. – С. 98–107.*

6. Physiological engineering of *Pseudomonas aurantiaca* antimicrobial activity: effects of sodium chloride treatment / L. Rozenfelde, G. Khroustalyova, **M. Mandrik (Mandryk-Litvinkovich)**, E. Kolomiets, A. Rapoport // *Microbiology Research*. – 2012. – Vol. 3, № 2. – P. 108–111.

7. **Мандрик-Литвинкович, М. Н.** Бактериальный штамм *Pseudomonas aurantiaca* БИМ В-446 с комплексной фитопротекторной, ростстимулирующей и ферментативной активностью / **М. Н. Мандрик-Литвинкович** // *Микробные биотехнологии: функциональные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Ин-т микробиологии ; редкол.: Э. И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2014. – Т. 6. – С. 166–177.*

8. Антимикробные и иммуномодулирующие свойства бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446, основы биопестицида «Экогрин» / **М. Н. Мандрик-Литвинкович**, Т. Л. Носонова, В. Н. Купцов, О. В. Молчан, А. Н. Гриц, Т. В. Янчевская, Э.И. Коломиец // Микробные биотехнологии: функциональные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Ин-т микробиологии ; редкол.: Э. И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2015. – Т. 7. – С. 184–196.

9. Молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих синтез 2,4-диацетилфлороглюцинола бактериями *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В- 446 / **М. Н. Мандрик-Литвинкович**, А. А. Муратова, Т. Л. Носонова, О. В. Евдокимова, Л. Н. Валентович, М. А. Титок, Э. И. Коломиец // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53, № 1. – С. 38–46.

10. Основы технологии получения биопестицида «Экогрин» / **М. Н. Мандрик-Литвинкович**, Т. Л. Носонова, В. Н. Купцов, Г. К. Журомский, Е. Г. Шинкоренко, Э. И. Коломиец // Микробные биотехнологии: функциональные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Ин-т микробиологии ; редкол.: Э. И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2017. – Т. 9. – С. 210–224.

Статьи в сборниках научных трудов:

11. Новые подходы к созданию биопестицидов для защиты зернобобовых культур от болезней / **М. Н. Мандрик (Мандрик-Литвинкович)**, В.Н. Купцов, Э. И. Коломиец, Н. И. Гирилович, Э. Дэй // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Ин-т микробиологии ; редкол.: Э. И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2007. – Т. 1. – С. 185–195.

12. Most deleterious pathogens of lupine and soya and their control by antagonistic bacteria strains in Belarus / V. N. Kuptsov, E. I. Kolomiets, N. S. Kuptsov, **M. N. Mandrik (Mandryk-Litvinkovich)**, N. V. Evsegneeva // Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych / Instytut sadownictwa i kwiaciarnictwa. – Skierniewice, 2010. – Vol. 554. – P.77–83.

Материалы конференций и симпозиумов:

13. **Мандрик (Мандрик-Литвинкович), М. Н.** Ферментативная активность и антимикробный комплекс *Pseudomonas aurantiaca* S-1 / **М. Н. Мандрик**, Э. И. Коломиец, Э. Дэй // Информационный бюллетень ВПРС МОББ / Междунар. организация по биол. борьбе с вредными животными и растениями, Восточнопалеарктическая региональная секция ; редкол.: В. Павлюшин [и др.]. (Биоценотическая регуляция – основа современных фитосанитарных технологий : материалы юбилейного Междунар. симп, С.-Петербург, 21-25 мая 2007 г.). – С.-Петербург, 2007. – Т. 38. – С. 161–164.

14. Купцов, В. Н. Биологический метод в контроле фитопатогенов люпина / В. Н. Купцов, **М. Н. Мандрик (Мандрик-Литвинкович)**, Э. И. Коломиец // Информационный бюллетень ВПРС МОББ / Международная организация по биол. борьбе с вредными животными и растениями, Восточнопалеарктическая региональная секция; редкол.: В. Павлюшин [и др.]. (Биоценотическая регуляция – основа современных фитосанитарных технологий : материалы юбилейного Международ. симп., С.-Петербург, 21-25 мая 2007 г.). – С.-Петербург, 2007. – Т. 38. – С. 154–156.

15. Использование бактерий-антагонистов для обеззараживания семян узколистного люпина / В. Н. Купцов, Э. И. Коломиец, Н. В. Евсегнеева, **М. Н. Мандрик (Мандрик-Литвинкович)**, Н. С. Купцов // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы VII междунар. науч. конф., Минск, 31 мая–4 июня 2010 г. / НАН Беларуси, Ин-т микробиологии; редкол.: Э. И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2010. – С.494–495.

Тезисы докладов:

16. Prospects of applying antagonistic strain *Pseudomonas aurantiaca* S-1 for biological control of fungal and bacterial pathologies in cultivars / **М. Mandryk (Mandryk-Litvinkovich)**, N. Sverchkova, E. Kolomiets, E. Dey // Modern problems of Microbiology and Biotechnology: proceedings of the young scientists and students international scientific conference, Odessa, 28–31 May 2007 / Mechnikov Odesa National University. – Odessa, 2007. – P. 58.

17. Купцов, В.Н. Биологический метод в защите люпина от антракноза / В. Н. Купцов, **М. Н. Мандрик (Мандрик-Литвинкович)**, Э. И. Коломиец // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы VI Междунар. науч. конф., Минск, 2–6 июня 2008 г.: в 2 т. / НАН Беларуси, Ин-т микробиологии; редкол.: З. М. Алещенкова [и др.]. – Минск, 2008. – Т. 2. – С. 345–347.

18. Бактерии *Pseudomonas aurantiaca* S-1 в биологическом контроле фитопатогенов зернобобовых культур / **М. Н. Мандрик (Мандрик-Литвинкович)**, Н. В. Сверчкова, И. Н. Ананьева, В. Н. Купцов, Э. И. Коломиец // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии : материалы VI Междунар. науч. конф., Минск, 2–6 июня 2008 г. : в 2 т. / НАН Беларуси, Ин-т микробиологии ; редкол.: З. М. Алещенкова [и др.]. – Минск, 2008. – . 2. – С.337–339.

19. Most deleterious pathogens of lupine and soya in Belarus and their antagonists / V. N. Kuptsov, E. I. Kolomiets, N. S. Kuptsov, **М. N. Mandryk (Mandryk-Litvinkovich)**, N. V. Evsegneeveva // Nowe patogeny i choroby roślin: streszczenia II konferencję, Skierniewice, Polska, 13-14 kwietnia 2010 roku / Instytut sadownictwa i kwiaciarnictwa. – Skierniewice, 2010. – С.30–31.

Патенты:

20. Штамм бактерий *Pseudomonas aurantiaca* БИМ В-446 Д, обладающий антагонистической активностью в отношении грибных и бактериальных патогенов растений : пат. ВУ 12761 / Э. И. Коломиец, В. Н. Купцов, Н. В. Сверчкова, **М. Н. Мандрик (Мандрик-Литвинкович)**. – Оpubл. 30.12.2009.

21. Способ получения биопрепарата для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники: пат. ВУ 17575 / Э. И. Коломиец, Н. В. Сверчкова, В. Н. Купцов, **М. Н. Мандрик-Литвинкович**, Н. В. Евсегнеева. – Оpubл. 30.10.2013.

РЭЗІЮМЭ

МАНДРЫК-ЛІТВІНКОВІЧ МАРЫНА МІКАЛАЕЎНА

АТРЫМАННЕ І ХАРАКТАРЫСТЫКА ШТАМА БАКТЭРЫЙ
PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM БІМ В-446 – АСНОВЫ
БІЯПЕСТЫЦЫДА «ЭКАГРЫН»

Ключавыя словы: бактэрыі-антаганісты фітапатагенаў, *Pseudomonas brassicacearum*, малааб'ёмная гідрапоніка, 2,4-дыацэтылфлораглюцынол, біяпестыцыд «Экагрын».

Мэта даследавання: атрымаць і ахарактарызаваць штама бактэрыі з комплекснай антаганістычнай і ростстимулюючай актыўнасцю, распрацаваць на яго аснове тэхналогію атрымання біяпестыцыда для аховы агароднінних і зяленіўных культур ад хвароб ва ўмовах малааб'ёмнай гідрапонікі.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя, біяхімічныя, малекулярна-генетычныя.

Выкарастаная апаратура: мас-спектрометр Accurate-MassQ-TOFLC/MSSystem (ЗША), спектрафатометр Beckman Coulter DU 800 (Германія).

Атрыманыя вынікі і іх навізна: атрыманы штама бактэрыі *P. brassicacearum* БІМ В-446, які адрозніваецца ад вядомых аналагаў наяўнасцю комплекснай антымікробнай і фітастимулюючай актыўнасці, здольнасцю каланізаваць субстраты гідрапонных сістэм, перспектывы для распрацоўкі біялагічных сродкаў аховы раслін. Вызначана, што антымікробная актыўнасць *P. brassicacearum* БІМ В-446 абумоўлена прадукцыяй полікетыднага антыбіётыка шырокага спектра дзеяння 2,4-дыацэтылфлораглюцынола (2,4-ДАФГ). У геноме бактэрыі *P. brassicacearum* БІМ В-446 выяўлены *phl*-аперон, які дэтэрмінуе сінтэз 2,4-ДАФГ, вызначана яго структура. На аснове глыбіннага культывавання бактэрыі *P. brassicacearum* БІМ В-446 распрацавана канкурэнтаздольная тэхналогія атрымання біяпестыцыда «Экагрын» для кантроля патагенаў агароднінних і зяленіўных культур ва ўмовах малааб'ёмнай гідрапонікі.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: штама бактэрыі *P. brassicacearum* БІМ В-446 з фітаахоўнай і ростстимулюючай актыўнасцямі; біяпестыцыд «Экагрын» для аховы агароднінних і зяленіўных культур ад хвароб ва ўмовах малааб'ёмнай гідрапонікі.

Вобласць выкарыстання: мікрабіялогія, біятэхналогія, раслінаводства, сельская гаспадарка.

РЕЗЮМЕ

МАНДРИК-ЛИТВИНКОВИЧ МАРИНА НИКОЛАЕВНА

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА БАКТЕРИЙ
PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM БИМ В-446 – ОСНОВЫ
БИОПЕСТИЦИДА «ЭКОГРИН»

Ключевые слова: бактерии-антагонисты фитопатогенов, *Pseudomonas brassicacearum*, малообъёмная гидропоника, 2,4-диацетилфлороглюцинол, биопестицид «Экогрин».

Цель работы: получить и охарактеризовать штамм бактерий с комплексной антагонистической и ростстимулирующей активностью, разработать на его основе технологию получения биопестицида для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники.

Методы исследования: микробиологические, биохимические, молекулярно-генетические.

Использованная аппаратура: масс-спектрометр Accurate-MassQ-TOFLC/MSSystem (США), спектрофотометр Beckman Coulter DU 800 (Германия).

Полученные результаты и их новизна. Получен штамм бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446, отличающийся от известных аналогов наличием комплексной антимикробной и фитостимулирующей активности, способностью колонизировать субстраты гидропонных систем, перспективный для разработки биологических средств защиты растений. Установлено, что антимикробная активность *P. brassicacearum* БИМ В-446 обусловлена продукцией поликетидного антибиотика широкого спектра действия 2,4-диацетилфлороглюцинола (2,4-ДАФГ). В геноме бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 выявлен *phl*-оперон, детерминирующий синтез 2,4-ДАФГ, определена его структура. На основе глубинного культивирования бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 разработана конкурентоспособная технология получения биопестицида «Экогрин» для контроля патогенов овощных и зеленных культур в условиях малообъемной гидропонии.

Рекомендации по использованию: штамм бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 с фитозащитной и ростстимулирующей активностями; биопестицид «Экогрин» для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропонии.

Область применения: микробиология, биотехнология, растениеводство, сельское хозяйство.

SUMMARY

MANDRYK-LITVINKOVICH MARYNA

**OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF BACTERIAL STRAIN
PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM BIM B-446 – THE BASIS OF
BIOPESTICIDE «ECOGREEN»**

Key words: bacteria-antagonists of phytopathogens, *Pseudomonas brassicacearum*, small-scale hydroponics, 2,4-diacetylphloroglucinol, biopesticide «Ecogreen».

Aim of study: to obtain and characterize bacterial strain with complex antagonistic and growth-promoting activity, further used in technology of producing microbial pesticide for biological control of diseases affecting vegetable and green spice crops in small-scale hydroponic culture.

Research methods: microbiological, biochemical, molecular-genetical.

Applied equipment: mass-spectrometer Accurate-MassQ-TOFLC/MSSystem (USA), spectrophotometer Beckman Coulter DU 800 (Germany).

Obtained results and their novelty. Obtained bacterial strain *Pseudomonas brassicacearum* BIM B-446 differs from the known analogs by presence of complex antimicrobial and phyto stimulating activities, ability to colonize substrates of hydroponic systems and is prospective for introduction into plant biological control agents. Antimicrobial activity of *Pseudomonas brassicacearum* BIM B-446 was found to be determined by synthesis of polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG). *Phl*-operon determining 2,4-DAPG production was revealed in *Pseudomonas brassicacearum* BIM B-446 genome and its structure was deciphered. Submerged fermentation of bacterial strain *Pseudomonas brassicacearum* BIM B-446 resulted in elaboration of competitive technology for production of biopesticide «Ecogreen» to control pathogens of vegetable and green spice crops in small-scale hydroponic culture.

Recommendation for use: bacterial strain *Pseudomonas brassicacearum* BIM B-446 with phytoprotective and growth-promoting activities; biopesticide «Ecogreen» for biological control of diseases affecting vegetable and green spice crops grown in small-scale hydroponic culture.

Application areas: microbiology, biotechnology, plant cultivation, agriculture.

Подписано в печать 24.11.2017 Формат 60x84_{1/16} Бумага офсетная
Гарнитура Roman Печать цифровая Усл.печ.л. 1,3 Уч.изд.л. 1,4
Тираж 60 экз. Заказ № 2511
ИООО «Право и экономика» 220072 Минск Сурганова 1, корп. 2
Тел. 284 18 66, 8 029 684 18 66

E-mail: pravo-v@tut.by; pravo642@gmail.com Отпечатано на издательской системе
KONICA MINOLTA в ИООО «Право и экономика»
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий, выданное
Министерством информации Республики Беларусь 17 февраля 2014 г.
в качестве издателя печатных изданий за № 1/185