

На правах рукописи



Ха Тхи Зунг

**ПОЛУЧЕНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО НАЗНАЧЕНИЯ
НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *PAENIBACILLUS***

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Казань – 2021

Работа выполнена на кафедре пищевой биотехнологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»)

Научный руководитель

доктор технических наук, профессор кафедры пищевой биотехнологии, ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»,
Канарский Альберт Владимирович

Официальные оппоненты

Волкова Галина Сергеевна,
доктор технических наук, профессор, заведующая лабораторией биотехнологии органических кислот, пищевых и кормовых добавок, федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии»

Рожкова Александра Михайловна,
кандидат химических наук, старший научный сотрудник, институт биохимии им. А.Н. Баха

Ведущая организация

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (ФГАОУ ВО «КФУ»), г. Казань

Защита состоится 25 мая 2021 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д999.095.03 при РХТУ имени Д.И. Менделеева (125047, г. Москва, Миусская площадь, д. 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ имени Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <https://mustr.ru>.

Автореферат диссертации разослан « » _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 999.095.03, к.т.н.



И. В. Шакир

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Одной из основных тенденций современной сельскохозяйственной технологии является применение биологически активных веществ, синтезируемых микроорганизмами, способствующих росту, развитию растений и животных и улучшению их физиологического состояния. Биопрепараты на основе микроорганизмов имеют широкие спектры действия, что позволяет применять их в качестве регулятора роста растений, биофунгицида, иммуномодулятора и/или земледобрильного препарата. Микроорганизмы могут использоваться для получения противомикробных препаратов медицинского и ветеринарного назначения.

Мировой рост объема производства микробиологических удобрений обусловлен частичной заменой в агротехнологии минеральных удобрений, из которых азот, фосфор и калий эффективно не усваиваются растениями, что приводит к засолению почвы. Российский рынок биопрепаратов и удобрений интенсивно растет на 30 % в год. По данным Союза органического земледелия за последние годы были зарегистрированы 26 микробиологических удобрений, в том числе Байкал ЭМ-1, Экстрагран, Ризобакт, Эктрасол, Эффект био и др., которые изготовлены на основе *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Rhizobium sp.*, *Azotobacter sp.*, *Trichoderma sp.* и др. Однако, увеличение потребления органической продукции, такой как молоко, мясо, овощи и другие пищевые продукты, вызывает необходимость расширения ассортимента биопрепаратов с удовлетворяющими потребительскими свойствами для организации органического сельского хозяйства. В связи с этим необходим поиск новых видов и штаммов микроорганизмов с хозяйственными ценными признаками, такими как мощная ферментативная система, фунгицидная активность и стимулирующие рост растений фосфат-мобилизирующая и азотфиксирующая способности и последующее их внедрение в технологию защиты агроценозов от неблагоприятных факторов среды. Это является перспективным направлением, связанным с экологизацией растениеводства и животноводства.

Анализ опубликованных работ показывает, что к перспективным микроорганизмам для сельского хозяйства можно отнести ризосферные микроорганизмы рода *Paenibacillus*. Микроорганизмы этого рода способны гидролизовать высокомолекулярные углеводы и синтезировать экзополисахариды, продуцировать целый ряд внеклеточных ферментов, включая амилазы, целлюлазы, гемицеллюлазы, липазы, пектиназы, оксигеназы, дегидрогеназы, лигнин-модифицирующие ферменты и мутаназы, которые широко применяются в производстве моющих средств, продуктов питания, кормов, текстиля, бумаги, биотоплива, а также в здравоохранении. Вышеуказанные свойства некоторых штаммов бактерий рода *Paenibacillus* были изучены отечественными и зарубежными учеными, такими как Виноградов Е. Я., Няникова Г. Г., Naing K. W., Kumar S., Weselowski B., Wang L. Y. и др. Авторы подчеркивали, что со временем микроорганизмы рода *Paenibacillus* будут играть более важную роль в научно-техническом прогрессе для повышения устойчивого развития сельского хозяйства и различных отраслей промышленности.

Помимо поиска новых продуцентов актуальным является снижение себестоимости биопрепаратов, которое можно достичь использованием в технологии в качестве субстратов вторичных ресурсов переработки растительного сырья, в частности, отходов сельскохозяйственного производства.

Следует отметить, что в настоящее время биопрепараты производятся в основном в жидком виде. Сроки хранения этих биопрепаратов ограничены и равномерное внесение в почву затруднительно. Вторичные ресурсы переработки растительного сырья могут использоваться не только как субстрат (сырье), но и как носители микроорганизмов, увеличивая гарантийные сроки хранения биопрепаратов. Таким образом, использование вторичных ресурсов сельскохозяйственного производства позволит решить экономические и экологические проблемы.

Учитывая перспективность применения в биотехнологии ризобактерий рода *Paenibacillus* как продуцентов биопрепаратов сельскохозяйственного назначения, поиск

эффективных штаммов рассматриваемых бактерий и изучение их способности ассимилировать углеводы и другие вещества вторичных ресурсов переработки растительного сырья весьма актуален.

Цель и задачи работы. Целью работы является разработка технологических основ получения биопрепаратов сельскохозяйственного назначения с применением бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Определение биотехнологических характеристик штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 и штамма *P. salinicaeni* 17-6 по калий-фосфат-мобилизирующей и азотфиксирующей способностям, синтезу ферментов, экзополисахаридов и накоплению индолилуксусной кислоты.

2. Оценка эффективности утилизации субстратов, полученных из вторичных ресурсов переработки растительного сырья, в частности, ферментолизата клетчатки рисовой шелухи, экстрактов ксилана из многолетних растений и мелассы, штаммами бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*.

3. Определение влияния условий культивирования бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на синтез ферментов, биомассы и экзополисахаридов.

4. Получение биопрепаратов и разработка принципиальных технологических схем изготовления биоудобрений и кормовых добавок на основе наиболее активных штаммов из рассмотренных бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*, продуцирующих биомассу, экзополисахариды и ферменты.

Методология и методы исследования. Культивирование бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* проводили принятыми в биотехнологии и микробиологии методами. В работе использованы физико-химические методы анализа, в том числе, фотоэлектроколориметрия, спектрофотометрия, газожидкостная хроматография, рентгенофлуоресцентный метод. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы «Microsoft Excel», «Prism» и «Statistica 6.0».

Научная новизна работы.

1. Показан двухфазный рост (диауксия) штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560, 563, 567, 572, 574 при культивировании на питательной среде, содержащей гетерогенные по составу субстраты: сахарозу, глюкозу и фруктозу.

2. Обоснована целесообразность культивирования рассматриваемых штаммов почвенных бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательных средах, приготовленных на основе вторичных ресурсов переработки растительного сырья: ферментолизата рисовой шелухи и мелассы. Показано, что рассматриваемые штаммы почвенных бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* обладают полиферментативной активностью, в частности, β -фруктофуразидазной, нитрогеназной, фитазной, целлюлазной, целлюлобиазной и ксиланазной активностями.

3. По результатам проведенного скрининга свойств и подбора условий культивирования на питательной среде, содержащей ферментолизат клетчатки рисовой шелухи, отобран штамм *P. mucilaginosus* 560 – продуцент ксиланаз, целлюлаз и целлюлобиаз, рекомендуемый для получения биопрепаратов. Установлено, что активность ксиланаз, полученных культивированием штамма *P. mucilaginosus* 560 на питательной среде с ферментолизатом клетчатки однолетних растений (рисовая шелуха), больше, чем активность ксиланаз, полученных на питательной среде с экстрактами, содержащими преимущественно ксиланы многолетних растений (береза, бук).

4. По результатам проведенного скрининга свойств и подбора условий культивирования на питательных средах с сахарозой и мелассой показано, что штамм *P. mucilaginosus* 574 обладает наибольшей способностью азотфиксации, максимальным накоплением индолилуксусной кислоты, максимальным выходом биомассы и экзополисахаридов и рекомендуется для получения биопрепаратов. Установлено, что данный штамм эффективно культивируется на питательной среде с мелассой без дополнительного источника солей и азота. В результате

подбора условий культивирования на питательной среде, содержащей мелассу, штамм *P. mucilaginosus* 574 способен ассимилировать 96 % углеводов мелассы, синтезировать до 9,6 г/л экзополисахаридов при содержании в культуральной жидкости $6 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Показана выживаемость продуцента в полученном продукте после сушки и при хранении в течение 3 месяцев не менее 10^7 КОЕ/г.

Практическая значимость работы.

1. Полученные результаты исследований позволяют рекомендовать и расширить возможность применения вторичных ресурсов переработки растительного сырья, в частности, мелассы и ферментоллизатов клетчатки рисовой шелухи в качестве субстратов для культивирования почвенных бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*. Обоснованы параметры технологии комплексной переработки клетчатки рисовой шелухи для получения ферментоллизата с минимальными потерями простых сахаров.

2. Определены технологические параметры культивирования для синтеза ксиланаз штаммом *P. mucilaginosus* 560 на основе ферментоллизата клетчатки рисовой шелухи с максимальной активностью 20 ед/мл.

3. Обоснованы условия для культивирования штамма *P. mucilaginosus* 574 на питательной среде, содержащей мелассу, для получения высокого выхода биомассы и экзополисахаридов.

4. Предложен технологический процесс получения биоудобрения на основе отходов сахарного производства, в том числе, мелассы и дефеката с минимальной потерей количества жизнеспособных клеток штамма *P. mucilaginosus* 574 в полученном сухом препарате. Проведены эксперименты по испытанию биоудобрения в деляночных опытах. Полученные результаты подтверждены актом ООО «Микробокс». На основе этого штамма и бентонита разработана кормовая добавка, обладающая защитным эффектом от микотоксинов.

5. Предложен технологический процесс получения кормовой добавки и биоудобрения на основе ферментоллизата клетчатки рисовой шелухи с использованием бактерий *P. mucilaginosus* 560 в качестве продуцента. При этом для получения кормовой добавки в качестве носителя использовали шрот клетчатки рисовой шелухи. Согласно акту испытания кормовая добавка обладает адсорбционными свойствами по отношению к микотоксинам.

6. Рекомендовано применение комбинированной кормовой добавки на основе штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 для повышения детоксикации кормов от микотоксинов и увеличения усвояемости кормов животными.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты определения биотехнологических характеристик бактерий *P. mucilaginosus* 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 и штамма *P. salinicaeni* 17-6 по калий-фосфат-мобилизирующей и азотфиксирующей способностям, синтезу ферментов, экзополисахаридов и накоплению индолилуксусной кислоты.

2. Результаты, отражающие эффективность культивирования бактерий *P. mucilaginosus* на питательных средах, приготовленных на основе вторичных ресурсов переработки растительного сырья: мелассы, ферментоллизата клетчатки рисовой шелухи и экстрактов ксилана из древесины бука и березы.

3. Результаты, отражающие влияние условий культивирования наиболее эффективных штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 на синтез ферментов, биомассы и экзополисахаридов.

4. Результаты испытания биопрепаратов и разработанные принципиальные технологические схемы изготовления биоудобрений и кормовых добавок на основе штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Работа соответствует паспорту научной специальности ВАК 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) – по п. 2 (в части: исследование и разработка требований к сырью (включая вопросы его предварительной обработки), биостимуляторам и другим элементам. Оптимизация процессов биосинтеза), по п. 3 (в части: изучение и разработка технологических режимов

выращивания микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов, изучение их состава и методов анализа, технико-экономических критериев оценки, создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения).

Апробация результатов. Результаты работы докладывались и обсуждались на международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2018), XI Всероссийской научно-практической конференции «Биомедицинская инженерия и биотехнология» (Курск, 2018), научной конференции с международным участием «Неделя науки СПбПУ» (Сант-Петербург, 2018), XVI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, посвященной 150 – летию Периодической таблицы химических элементов (Казань, 2019), международной научно-технической конференции, посвященной памяти профессора В. И. Комарова, «Проблемы механики целлюлозно-бумажных материалов» (Архангельск, 2019), XIV международной научно-практической конференции (Самара, 2019), международной научно-практической конференции по вопросам подготовки кадров для научного обеспечения АПК, включая ветеринарию (Белгород, 2020).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, в том числе, 7 публикаций в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 1 из них в журнале, входящем в реферативную базу Scopus, 3 из них в журнале, входящем в реферативную базу Web of Sciences, 9 - в других изданиях и материалах конференций.

Личный вклад автора заключается в получении экспериментальных результатов, изложенных в диссертации, участии в постановке задач, обработке и анализе полученных данных, обсуждении, написании и оформлении публикаций. Работа выполнена на кафедре пищевой биотехнологии ФГБОУ ВО «КНИТУ».

Достоверность результатов исследований подтверждаются их воспроизводимостью и корреляцией экспериментальных данных, полученных с применением независимых взаимодополняющих методов, а также их согласованностью с известными литературными данными.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.т.н., проф. Канарскому А.В., д.х.н., проф., заведующему кафедрой пищевой биотехнологии Сысоевой М.А. и к.б.н., доц. Зариповой С.К. за неоценимую помощь и поддержку, ценные замечания и предложения.

Структура и объём диссертации. Работа изложена на 170 стр., состоит из введения, 6 глав, заключения, списка использованной литературы (277 наименований), содержит 19 таблиц и 33 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы и определены основные направления исследования.

ГЛАВА 1. Обзор литературы. Представлен обзор литературных данных по теме исследований. Рассмотрены прямые и косвенные механизмы стимулирования роста растений ризосферными бактериями. На основе этих механизмов определена перспективность применения ризосферных бактерий, в том числе бактерий рода *Paenibacillus*, в растениеводстве и в животноводстве в качестве продуцентов биопрепаратов сельскохозяйственного назначения. Представлена характеристика и проанализированы методы предобработки, биоконверсии вторичных ресурсов переработки растительного сырья, показана возможность их использования для производства ценных продуктов путем ферментации микроорганизмами. Показано влияние условий культивирования на рост и продуцирование метаболитов ризосферных бактерий рода *Paenibacillus*, которые необходимо учитывать при разработке перспективных технологий получения биопрепаратов сельскохозяйственного назначения.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследований. В работе использованы 7 штаммов бактерий *P. mucilaginosus*: 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 и 1 штамм бактерий *P. salinicaeni* 17-6, предоставленных Ведомственной коллекцией непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург).

Питательные среды для культивирования. Глубинное культивирование бактерий осуществляли на жидкой питательной среде Александра следующего состава (%): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 0,20; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,05; $CaCO_3$ – 0,01; $NaCl$ – 0,02. В качестве источника азота применялись как неорганические соли ($(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3), так и органические вещества (дрожжевой экстракт, кукурузный экстракт, бетафин, карбамид, пептон) концентрацией до 0,40%. В качестве источника углерода использовали моносахариды (глюкоза – ГОСТ 6038-79), фруктоза (ТУ 6-09-1979-72)), дисахарид (сахароза – ГОСТ 5833-75), олигосахарид (экстракт ксилана бука компании Cath Roth, Germany), а также вторичные ресурсы переработки растительного сырья, такие как ферментолитат клетчатки рисовой шелухи, экстракт ксилана из березы, меласса свекловичная концентрацией от 0,50 до 4,00 %.

Ферментолитат клетчатки рисовой шелухи получен путем предварительной обработки гидроокисью натрия, нейтрализацией и дальнейшей ферментативной обработкой. Состав ферментолитата рисовой шелухи определяли методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) триметилсилильных производных. Для извлечения ксилана щепу березы (*Betula pendula*) экстрагировали под давлением горячей водой (максимум 150 °С) в бескислородной среде.

Оценка калиймобилизующих и фосфатсольбилизующих свойств бактерий проводили на питательной среде Александра с добавлением 0,20 % слюды и 0,20 % фосфата кальция вместо K_2HPO_4 в качестве источников калия и фосфора, соответственно. Количественное содержание свободных фосфатов в среде определяли по интенсивности окраски фосфорномолибденовокислого аммония. Количественное содержание калия в среде определяли на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой iCAP 6300 DUO (фирма Thermo Scientific, USA).

Определение редуцирующих веществ (РВ) в питательной среде и культуральной жидкости (КЖ) проводили с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты.

Азотфиксирующую способность бактерий определяли косвенно по способности синтеза биомассы на безазотистой питательной среде и накоплению общего азота в культуральной жидкости, которое определяли с применением реактива Несслера.

Способность синтеза бактериями индолилуксусной кислоты (ИУК) оценивали фотометрическим методом с использованием реагента Сальковского.

Определение активности ферментов. Активность β -фруктофуранозидазы, ксиланазы, целлюлазы и целлюбиазы определяли по окрашиванию редуцирующих сахаров 3,5-динитросалициловой кислотой. Активность фитазы определяли по интенсивности окраски неорганического фосфата молибденового комплекса.

Концентрация белка определялась с использованием метода Бредфорда. Удельная активность ферментов выражалась числом единиц ферментативной активности на 1 мг белка.

Определение концентрации бактериальных клеток проводили фотометрическим методом с предварительным построением калибровочного графика. Оптическую плотность бактерий определяли при длине волны 540 нм и ширине кюветы 5 мм. Подсчет колоний проводили на чашках Петри с десятикратным разведением культуральной жидкости.

Биомассу бактерий определяли гравиметрическим методом после высушивания на влагомере «MX-50» (компания AND, Japan).

Синтез экзополисахаридов (ЭПС) оценивали косвенно по значению вязкости культуральной жидкости, которая определялась на вискозиметре Vibro SV-10A (компания AND, Japan). Количество экзополисахаридов определяли гравиметрическим методом. Для этого экзополисахариды выделяли и очищали осаждением трехкратным объемом изопропанола с дальнейшим центрифугированием и высушиванием.

Определение кинетических параметров. Удельную скорость роста, время генерации оценивали принятыми в биотехнологии методами.

Для изучения влияния условий культивирования (рН среды, температуры культивирования, возраста и дозы посевного материала, источника азота и углерода и их концентраций) на рост и продуктивность метаболических продуктов, синтезируемых бактериями *P. mucilaginosus*, использовали метод - один фактор за один раз (или one factor at a time - OFAT). При изучении каждого фактора другие факторы оставались постоянными.

Статистическую обработку результатов экспериментов, полученных не менее чем в трех повторностях, проводили по программе Microsoft Excel, Prism, Statistica 6.0, а также в соответствии с использованными в работе стандартами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3. Исследование биотехнологических характеристик бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*. Обоснование технологии получения биопрепаратов сельскохозяйственного назначения основывалось на определении биотехнологических ценных свойств использованных в исследованиях штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*. Результаты определения характерных признаков биотехнологической активности рассматриваемых штаммов на сахарозно-минеральной среде представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Биотехнологическая активность исследуемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*

Характеристика	Штаммы бактерий <i>P. mucilaginosus</i>							<i>P. salinicaeni</i>
	560	563	567	568	572	574	17-2	17-6
На безазотистой среде								
-концентрация биомассы*, г/л	1,50	1,17	1,16	1,13	1,17	1,93	1,40	0,62
-содержание азота в КЖ*, мг/л	14,89	11,97	10,21	4,66	11,38	19,57	0,86	0,72
Синтез ИУК*, мг/л	24,05	29,64	30,25	35,11	30,25	60,00	33,89	5,35
Мобилизация калия*, мг/л	0	4,20	1,65	6,10	2,75	2,00	6,10	8,60
Мобилизация фосфатов, мг/л	52,26	64,29	66,54	58,53	58,53	59,78	80,32	68,04
Фитазная активность*, ед/мл	0,56	0,69	0,72	0,63	0,63	0,64	0,86	0,73
β-фруктофуранозидазная активность**, ед/мл	1,63	0,54	1,68	1,17	1,07	2,33	0,69	0,47
Синтез ЭПС**, г/л	9,55	8,18	7,43	5,27	6,98	9,10	1,50	0,80

Примечание: Показаны в таблице средние значения при трехкратных повторностях.

«*» Значения, полученные после 72 ч культивирования, «**» - после 48 ч культивирования

Результаты, отражающие рост биомассы и наличие азота в культуральной жидкости по окончании культивирования на безазотистой среде, позволяют сделать вывод о способности исследуемых штаммов фиксировать атмосферный азот. Кроме этого, эти штаммы продуктивно продуцируют ИУК, обладают калий-, фосфатмобилизующей способностью и синтезируют как ферменты, так и ЭПС. При этом наиболее эффективным азотфиксирующим и продуктивным продуцентом ИУК является штамм *P. mucilaginosus* 574. Отмечена наиболее высокая фитазная активность и потенциальная способность к фосфатмобилизации у штамма *P. mucilaginosus* 17-2, который из минеральных фосфатов способен выделить в среду до 80 мг/л подвижных форм фосфора. Из труднорастворимого субстрата слюды штамм *P. salinicaeni* 17-6 выделяет до 8,6 мг/л калия.

Влияние моносахаридов и дисахаридов на синтез биомассы и экзополисахаридов бактериями *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*. Установлено, что при культивировании штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560, 563, 567, 572 и 574 на питательных средах с сахарозой и при совместном присутствии глюкозы и фруктозы наблюдается диауксия. В качестве примера на рисунке 1 показан рост штамма *P. mucilaginosus* 574, который интенсивно растет на питательных средах с глюкозой, сахарозой, а также в присутствии в питательной среде глюкозы и фруктозы с концентрацией бактериальных клеток больше $4,5 \times 10^5$ КОЕ/мл.

Показано, что при использовании фруктозы в качестве единственного источника углерода рост бактерий не наблюдался (рис. 1).

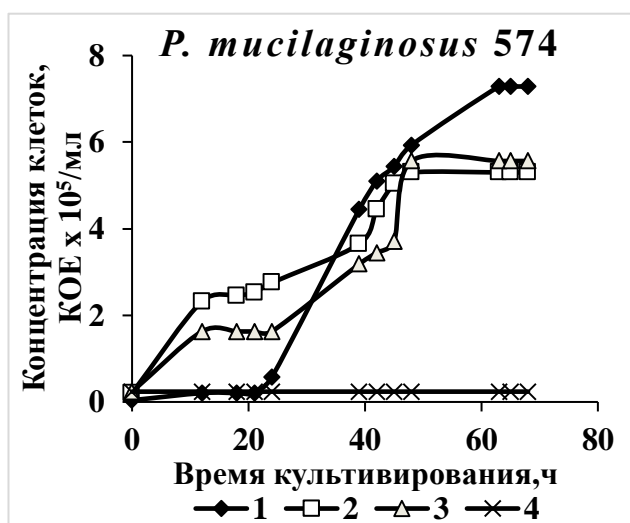


Рисунок 1 – Рост штамма *P. mucilaginosus* 574 при культивировании на питательных средах, приготовленных на основе глюкозы (1), сахарозы (2), при совместном присутствии глюкозы-фруктозы (3) и фруктозы (4)

При этом потребление РВ штаммами бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 на питательной среде с глюкозой составляет 57 – 60 %, на питательной среде с глюкозой и фруктозой потребление РВ – 77 – 78 % и на питательной среде с сахарозой доходит до 81 – 86 % (табл. 2). Следовательно, потребление рассматриваемыми бактериями фруктозы происходит на питательных средах с сахарозой и при совместном присутствии глюкозы и фруктозы. Продолжительная лаг-фаза штамма *P. mucilaginosus* 574 на питательной среде с глюкозой, по-видимому, связана с системой транспорта глюкозы, которая ограничивает усвоение глюкозы этими бактериями. При этом продолжительность лаг-фазы этого штамма незначительна на питательной среде с сахарозой и при совместном присутствии глюкозы и фруктозы (рис. 1).

Возможно, это связано с усвоением фруктозы в первую очередь при диауксии, что согласуется с ранее опубликованными данными о росте бактерий *Rhodopseudomonas cupsuluta*. Кинетика роста других штаммов, использованных в экспериментах, аналогична. Эффективность усвоения субстратов и продолжительность лаг-фазы рассматриваемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* можно представить в следующем порядке: сахароза > совместное присутствие в питательной среде глюкозы и фруктозы > глюкоза. Бактерии *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* способны синтезировать β-фруктофуранозидазу, которая гидролизует сахарозу до фруктозы и глюкозы, что обеспечивает рост и синтез ЭПС этими бактериями. Самым продуктивным продуцентом этого фермента является штамм *P. mucilaginosus* 574 (больше 2 ед/мл, табл. 1).

Показано, что при культивировании рассматриваемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательной среде с сахарозой выход биомассы и ЭПС выше, чем при культивировании этих штаммов бактерий на питательных средах с глюкозой и при совместном присутствии глюкозы и фруктозы (табл. 2).

Таблица 2 – Потребление РВ и выход биомассы и ЭПС штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 при культивировании на питательных средах с сахарозой, глюкозой и при совместном присутствии глюкозы и фруктозы

Источник углерода	Выход биомассы и ЭПС, г/л	Потребление РВ, %
<i>P. mucilaginosus</i> 560		
Глюкоза	4,56 ± 0,25	60,30 ± 2,50
Сахароза	8,61 ± 0,50	86,30 ± 2,50
Глюкоза и фруктоза (1:1)	2,72 ± 0,16	78,40 ± 2,50
<i>P. mucilaginosus</i> 574		
Глюкоза	4,61 ± 0,25	57,25 ± 2,50
Сахароза	7,72 ± 0,50	81,14 ± 2,50
Глюкоза и фруктоза (1:1)	2,62 ± 0,16	77,70 ± 2,50

Незначительная продолжительность лаг-фазы, эффективное усвоение, высокий выход биомассы и ЭПС позволяет рекомендовать использование сахарозы в питательной среде для культивирования всех рассмотренных штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*. Синтез ЭПС интенсивно происходит в конце экспоненциальной фазы роста при культивировании этих бактерий на питательной среде с сахарозой. При этом максимальная концентрация синтезируемых ЭПС наблюдается у штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 (табл. 1).

ГЛАВА 4. Оценка эффективности культивирования бактерий *P.mucilaginosus* на питательной среде, приготовленной на основе мелассы. Получение биоудобрений и кормовых добавок путем микробиологического синтеза на питательной среде, приготовленной на основе сахарозы, экономически не оправдано. Для снижения себестоимости этих биопрепаратов сельскохозяйственного назначения необходимо использовать доступные источники углерода. В этой связи определялась возможность культивирования штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 на питательной среде, приготовленной на основе мелассы, являющейся вторичным ресурсом сахарного производства, в которой содержится около 50 % сахарозы. При глубинном культивировании обоих штаммов бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде с мелассой отмечено, что концентрация биомассы и ЭПС, синтезируемых штаммом *P.mucilaginosus* 574 в 2 и 1,2 раза, соответственно, больше по сравнению с концентрацией биомассы и ЭПС, синтезируемых штаммом *P. mucilaginosus* 560. Таким образом, перспективным продуцентом ЭПС при культивировании на питательной среде с мелассой является штамм *P.mucilaginosus* 574.

Таблица 3 – Продукты метаболизма штамма *P. mucilaginosus* 574 при культивировании на питательной среде, содержащей мелассу

Время культивирования, ч	Содержание общего азота в КЖ, мг/л	Концентрация ИУК, мг/л	Содержание фосфора в КЖ, мг/л
24	11,62 ± 0,92	28,68 ± 1,72	0
48	5,77 ± 0,52	121,56 ± 6,07	107,44 ± 5,35
72	8,46 ± 0,50	144,06 ± 7,21	23,29 ± 1,12

Из результатов, представленных в таблице 3, видно, что содержание общего азота в культуральной жидкости изменяется с ростом бактерий при культивировании на питательной среде с мелассой. Повышение содержания общего азота в культуральной жидкости при выходе биомассы продуцента 0,85 г/л после 72 ч культивирования свидетельствует, что данный штамм способен фиксировать атмосферный азота на питательной среде с мелассой. По окончании культивирования содержание общего азота в среде и выход биомассы этого штамма при культивировании на питательной среде, содержащей мелассу, меньше в 2 раза по сравнению с культивированием на питательной среде, содержащей сахарозу (19,57 мгN/л, 1,93 г/л по биомассе, табл. 1).

Следует отметить, что штамм *P. mucilaginosus* 574 синтезировал ИУК на питательной среде с мелассой в 2,4 раза больше по сравнению с синтезом на питательной среде с сахарозой (60 мг/л, табл. 1). По-видимому, это связано с присутствием в мелассе витаминов, таких как пиридоксин и никотиновая кислота, которые играют роль кофактора ферментов, участвующих в триптофан-зависимых путях синтеза ИУК.

Показано, что из труднодоступного фосфата данный штамм способен освобождать фосфор, содержание которого в среде увеличивается по мере роста рассматриваемого штамма и достигает максимального значения 107,44 мг/л на начало стационарной фазы роста бактерий. Штамм *P. mucilaginosus* 574, также как и на питательной среде с сахарозой, способен продуцировать фермент фитазу активностью 1,16 ед/мл после 48 ч культивирования на питательной среде с мелассой.

Интенсификация синтеза биомассы и экзополисахаридов штаммом *P.mucilaginosus* 574. Показано, что для биосинтеза ЭПС и биомассы культивирование штамма *P. mucilaginosus*

574 целесообразно проводить на питательной среде, содержащей 2 % мелассы без дополнительных источников солей и азота (среда 2, рис. 2). При этом культивирование рассматриваемого штамма на питательной среде с мелассой без дополнительных источников солей и азота позволяет достигнуть эффективности синтеза биомассы и ЭПС, соответствующую культивированию этого штамма на питательной среде с сахарозой (табл. 2).

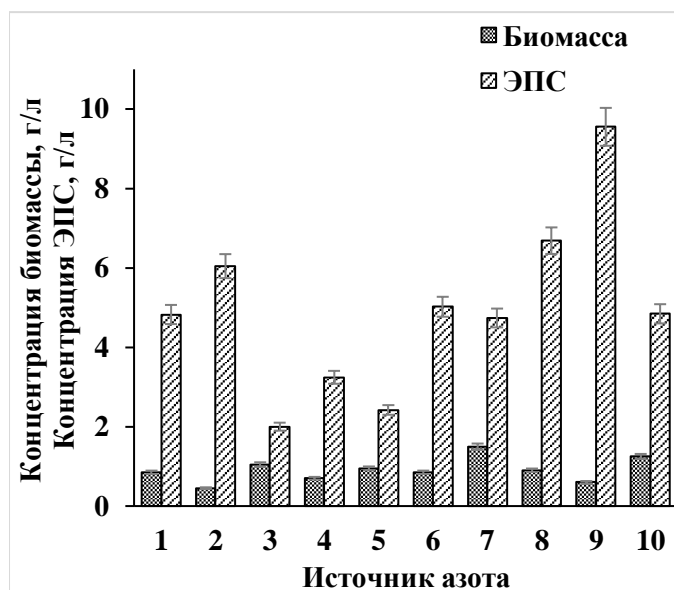


Рисунок 2 – Влияние источника азота на синтез биомассы и ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574: 1 – без азота (контроль), 2 – без минеральных солей и азота, 3 – NH_4NO_3 , 4 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 – дрожжевой экстракт, 6 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и дрожжевой экстракт, 7 – пептон, 8 – бетафин, 9 – кукурузный экстракт, 10 – карбамид

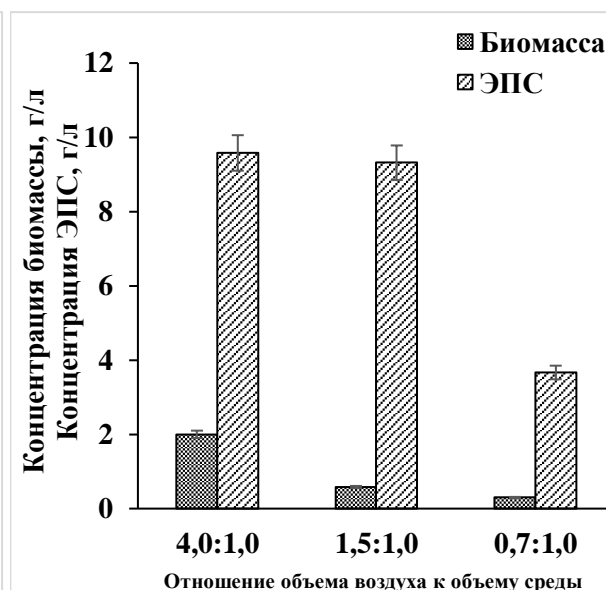


Рисунок 3 – Влияние соотношения объема воздуха к объему питательной среды на синтез биомассы и ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574 (механическое перемешивание)

Для интенсификации биосинтеза биомассы и ЭПС рекомендуется культивирование штамма *P. mucilaginosus* 574 на питательной среде, содержащей 2 % мелассы, при температуре 30 ± 1 °C и pH $6,0 \pm 0,2$. Проведенными экспериментами установлено, что внесение в среду 0,1% кукурузного экстракта вызывает увеличение выхода ЭПС в 2 раза по сравнению с контролем, при этом концентрация биомассы практически не изменяется (среда 9, рис. 2). По-видимому, это связано с содержанием в кукурузном экстракте индукторов синтеза ЭПС. При дальнейшем повышении содержания кукурузного экстракта в среде создаются благоприятные условия для роста продуцента, в результате которого концентрация биомассы увеличивается, а синтез ЭПС снижается. Следует отметить, что максимальная концентрация биомассы (2 г/л) и ЭПС (9,6 г/л), синтезируемых продуцентом *P. mucilaginosus* 574, наблюдается в условиях аэрации, при которых отношение объема воздуха к объему среды составляет 4,0 : 1,0 (рис. 3). В указанных условиях аэрации среды рассматриваемый штамм может утилизировать до 96 % углеводов мелассы и при этом число жизнеспособных клеток в среде достигает 6×10^8 КОЕ/мл.

ГЛАВА 5. Оценка эффективности утилизации углеводов клетчатки однолетних и многолетних растений бактериями *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*. Возможность утилизации клетчатки однолетних и многолетних растений является важным признаком пригодности микроорганизмов к использованию в качестве микробиологических удобрений и кормовых добавок. В этой связи изучалась ферментативная активность бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* по отношению к углеводам ферментолизата рисовой шелухи. Установлено, что для получения ферментолизата предобработку клетчатки рисовой шелухи целесообразно проводить гидроксидом натрия с концентрацией 2,5 % при температуре 120 °C в течение 20 мин. Затем

необходимо промыть клетчатку водой и далее обработать ферментным препаратом Accellerase 1500 в течение 24 ч при температуре 55 °С, рН 5,0-5,5. Полученный указанным способом ферментолитат содержал около 90 % РВ от общей массы абсолютно сухого вещества (АСВ), в том числе 46 % ксилозы, 34 % глюкозы и 10 % других сахаров (табл. 4).

Таблица 4 – Углеводный состав ферментолитата клетчатки рисовой шелухи после ферментативного гидролиза (по данным ГЖХ)

Углеводы (время выхода, мин)	мг/л	% от АСВ
Ксилоза (31,1/32,6)	918,58	46,58
Глюкоза (36,0/38,3)	676,52	33,57
Арабиноза (28,6/29,5)	76,28	3,79
Фруктоза (33,8/34,0/34,1)	54,80	2,72
Мальтоза (52,8/53,6)	33,90	1,68
Целлобиоза (54,5/54,7)	31,41	1,56
Сорбоза (35,3)	4,88	0,24
Галактоза (35,2/36,3)	3,62	0,18
2-Деоксиглюкоза (33,4)	1,68	0,08

Культивирование *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательной среде, приготовленной на основе ферментолитата клетчатки рисовой шелухи. При глубинном культивировании использованных в экспериментах штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательной среде с ферментолитатом клетчатки рисовой шелухи при рН 6,0 ± 0,2 установлено, что рассматриваемые штаммы бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* проявляют целлюлазную, целлобиазную и ксиланазную активности, наличие которых способствует ферментативному гидролизу олигомерных соединений, присутствующих в ферментолитате, до простых сахаров (табл. 5). При этом активность ксиланазы выше, чем активность целлюлазы и целлобиазы, что согласуется с преобладанием в субстрате ксилозы в соответствии с данными ГЖХ в таблице 4.

По удельной скорости роста, времени генерации, выходу биомассы, а также по активности внеклеточных ферментов установлено, что перспективным штаммом для глубинного культивирования на питательной среде, содержащей ферментолитат клетчатки рисовой шелухи, является штамм *P. mucilaginosus* 560. Учитывая высокую активность ксиланазы по сравнению с другими ферментами, дальнейшие исследования были направлены на поиск условий культивирования штамма *P. mucilaginosus* 560, обеспечивающих максимальную активность ксиланазы.

Таблица 5 – Активность ферментов, синтезируемых штаммами бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательной среде с ферментолитатом клетчатки рисовой шелухи

Продуценты	Целлюлаза, ед/мл*	Ксиланаза, ед/мл**	Целлобиаза, ед/мл***
<i>P. mucilaginosus</i> 560	2,03 ± 0,12	7,09 ± 0,55	0,63 ± 0,05
<i>P. mucilaginosus</i> 563	1,48 ± 0,11	6,91 ± 0,44	0,51 ± 0,04
<i>P. mucilaginosus</i> 567	1,27 ± 0,10	4,82 ± 0,35	не обнаружена
<i>P. mucilaginosus</i> 568	1,84 ± 0,13	2,61 ± 0,18	не обнаружена
<i>P. mucilaginosus</i> 572	1,38 ± 0,11	3,16 ± 0,16	0,12 ± 0,01
<i>P. mucilaginosus</i> 574	1,09 ± 0,09	3,77 ± 0,26	не обнаружена
<i>P. mucilaginosus</i> 17-2	1,22 ± 0,09	3,16 ± 0,19	0,43 ± 0,04
<i>P. salinicaeni</i> 17-6	1,34 ± 0,11	4,62 ± 0,28	не обнаружена

«*» - после 24 ч культивирования, «**» - после 48 ч культивирования, «***» - после 72 ч культивирования

Влияние условий культивирования на рост и синтез ксиланазы штаммом *P. mucilaginosus* 560. Показано, что присутствие в питательной среде кальция положительно влияет на рост рассматриваемого штамма и биосинтез ксиланазы. Установлено существенное влияние природы субстрата (источники ксилана) на рост и синтез ксиланазы исследуемым штаммом. Максимальное накопление биомассы наблюдается при использовании в питательной

среде в качестве субстрата экстракта ксилана из бука. Однако активность ксиланазы, синтезируемой на питательной среде, содержащей ферментолизат клетчатки рисовой шелухи, больше, чем активность ксиланазы, синтезируемой на питательных средах, содержащих экстракты ксилана березы и бука. Это связано с тем, что ферментолизат является продуктом неполного гидролиза клетчатки рисовой шелухи, содержащим специфический индуктор – ксилозу, способную значительно влиять на синтез ксиланазы.

Культивирование штамма *P. mucilaginosus* 560 как продуцента ксиланазы рекомендуется проводить на питательной среде, приготовленной на основе ферментолизата клетчатки рисовой шелухи концентрацией углерода по общему количеству РВ 0,5 %. В качестве источника азота целесообразно использовать карбамид с концентрацией в питательной среде 0,2 %, корректировка рН среды до $6,0 \pm 0,2$ гидроксидом кальция, температура культивирования 30 ± 1 °С. В этих условиях культивирования максимальная активность синтезируемой ксиланазы достигает значения 20 ед/мл или 10702 ед/г белка по удельной активности, соответственно, в стационарной фазе.

Исследование характеристик полученной ксиланазы. Установлено, что ксиланаза, секретируемая штаммом *P. mucilaginosus* 560 на питательной среде с ферментолизатом клетчатки рисовой шелухи, имела высокую удельную активность при оптимальном значении рН 5,0 – 6,0 и температуре 50 ± 1 °С. Показано, что полученная ксиланаза сохраняла более 50% активности в диапазоне рН от 3,8 до 8,0, температуре от 30 °С до 70 °С и при инкубации в течение 60 мин. Эти данные дают основание утверждать, что полученная ксиланаза и в целом биомасса штамма *P. mucilaginosus* 560 потенциально могут быть использованы в качестве микробиологических удобрений для утилизации пожнивных остатков и в качестве кормовых добавок.

ГЛАВА 6. Разработка технологии получения биопрепаратов сельскохозяйственного назначения. Полученные результаты исследования использованы в создании технологии производства микробиологических удобрений. Технология производства биоудобрения на основе штамма *P. mucilaginosus* 574 бактерий состоит из следующих стадий: культивирование штамма *P. mucilaginosus* 574 на питательной среде с мелассой с получением титра бактерий 10^8 и ЭПС вязкостью 50 – 60 мПа*s с последующим осаждением бактериальных суспензий на носителе – дефекате в соотношении культуральная жидкость : дефекат 3 : 4. Принципиальная технологическая схема получения биоудобрений на основе штамма *P. mucilaginosus* 574 и дефеката представлена на рисунке 4, линия 1.

В полученном продукте концентрация жизнеспособных клеток достигала 10^7 КОЕ/г. Периодический контроль жизнеспособности исследуемого штамма при хранении показал стабильность показателя КОЕ/г штамма *P. mucilaginosus* 574, иммобилизованных на дефекате, после 3 месяцев хранения. Влажность продукта составила не более 5,0 %.

Применение биоудобрения положительно повлияло на урожайность при выращивании сои и овса в Самарской и Ленинградской областях: урожайность сои и овса увеличилось на 19,1% и 20,8 %, соответственно, по сравнению с контролем при оптимальной дозировке 150 кг/га (акт прилагается).

По данной технологической схеме (линия 1, рис. 4) предлагается также получать кормовую добавку с использованием штамма *P. mucilaginosus* 574 в качестве продуцента синтеза ЭПС и бентонита в качестве носителя. Присутствие в кормовой добавке ЭПС и бентонита позволяет решить проблему детоксикации кормов от микотоксинов (акт прилагается).

Разработана принципиальная технологическая схема получения кормовой добавки как источника ферментов, способствующих утилизации клетчатки в желудочно-кишечном тракте жвачных животных с использованием в качестве продуцента ферментов штамма *P. mucilaginosus* 560 (линия 2, рис. 4). Схемой предусмотрено получение ферментолизата клетчатки рисовой шелухи в качестве основы питательной среды. В качестве носителя использовали шрот клетчатки рисовой шелухи, который получен после ферментативной

обработки. Присутствие в кормовой добавке шрота клетчатки рисовой шелухи позволяет решить проблемы детоксикации кормов от микотоксинов (акт прилагается).

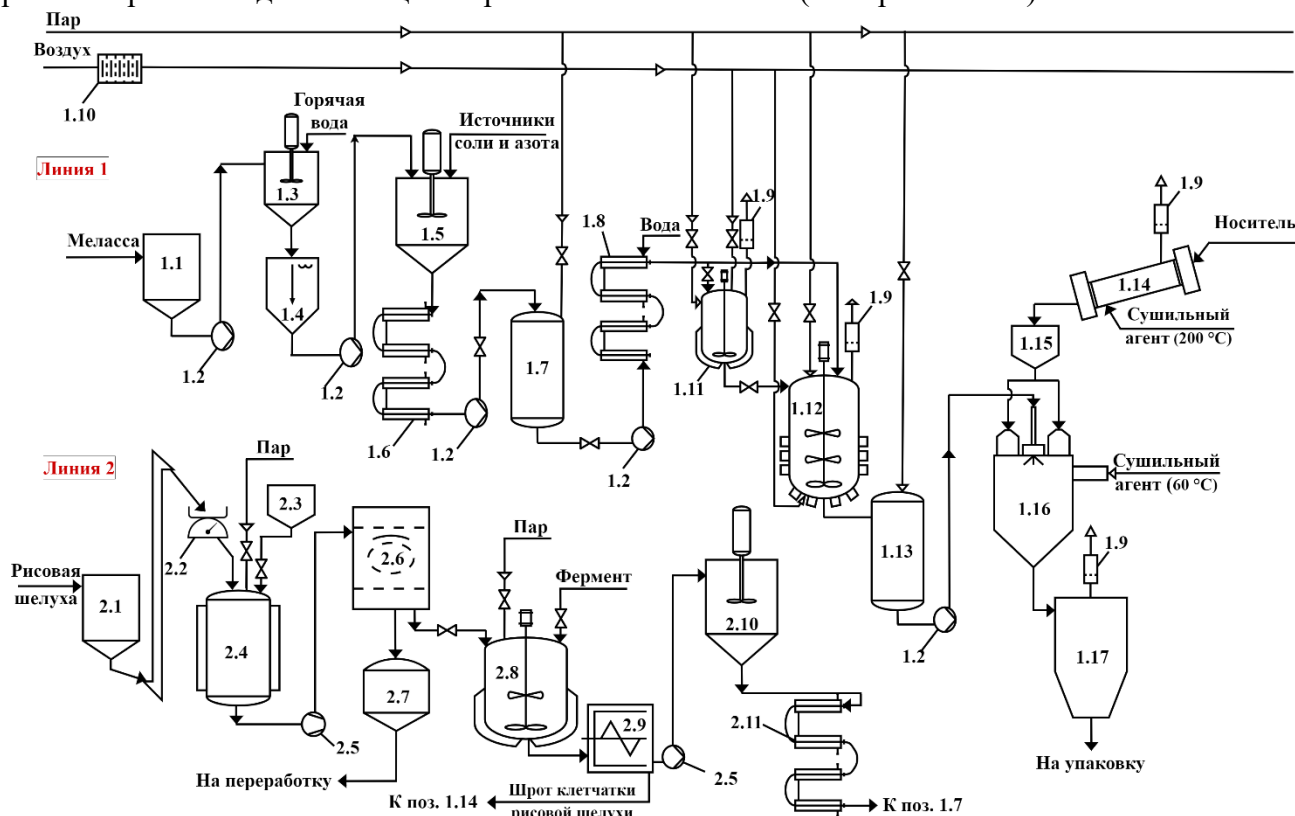


Рисунок 4 – Принципиальная технологическая схема производства биоудобрений и кормовых добавок: 1.1 – сборник для мелассы, 1.2, 2.5 – насосы, 1.3 – рассиропник, 1.4 – кларификатор, 1.5 – реактор для приготовления питательной среды, 1.6, 2.11 – стерилизаторы, 1.7 и 1.13 – сборники, 1.8 – охладитель для питательной среды, 1.9 – фильтры для очистки отходящего воздуха, 1.10 – фильтр для очистки и стерилизации воздуха, 1.11 – инокулятор, 1.12 – ферментер, 1.14 – барабанные сушилки, 1.15 – охладитель для носителя, 1.16 – сушилка для биопрепаратов, 1.17 – циклонный аппарат, 2.1 – бункер для рисовой шелухи, 2.2 – весы, 2.3 – емкость для приготовления щелочи, 2.4 – реактор для щелочной обработки рисовой шелухи, 2.6 – барабанный фильтр, 2.7 – сборник для щелока, 2.8 – биореактор для ферментативной обработки клетчатки рисовой шелухи, 2.9 – центрифуга, 2.10 – емкость для приготовления питательной среды

Представленную технологическую схему также рекомендуется использовать при получении биопрепарата в жидком виде для утилизации пожнивных остатков на полях с использованием в качестве стабилизатора раствора сорбитола концентрацией 2 М (линия 2, рис. 4).

Учитывая multifunctional свойства и положительные результаты при испытании полученных опытных образцов кормовых добавок и их специфичность по составу, рекомендуется изготавливать комбинированную кормовую добавку на основе штамма *P.mucilagenosus* 574 с бентонитом и штамма *P.mucilagenosus* 560 с шротом клетчатки рисовой шелухи путем смешения в соотношении, регламентируемом потребителями кормов. Комбинированная кормовая добавка повысит детоксикацию кормов от микотоксинов и увеличит усвояемость кормов животными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что штамм *P. mucilagenosus* 574 при культивировании на питательной среде с сахарозой обладает наиболее эффективной азотфиксирующей способностью и является продуктивным продуцентом индолилуксусной кислоты, фермента β -фруктофуранозидазы и ЭПС по сравнению с другими исследованными в работе штаммами.

2. Показано, что эффективный синтез биомассы и ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574 проходит на питательной среде с мелассой без дополнительного внесения минеральных веществ и азота. При этом выход этих продуктов соответствует выходу при культивировании штамма *P. mucilaginosus* 574 на питательной среде, содержащей сахарозу. Это указывает на экономическую целесообразность использования мелассы без дополнительного внесения минеральных веществ и азота для культивирования штамма *P. mucilaginosus* 574.

3. Установлено, что для повышения продуктивности синтеза биомассы и ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574 рекомендуется культивирование проводить на питательной среде, содержащей 2 % мелассы с добавлением 0,1 % кукурузного экстракта в качестве индуктора ЭПС, при температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$ и pH $6,0 \pm 0,2$. В этих условиях указанный штамм достигает концентрации 10^8 КОЕ/мл жизнеспособных клеток и синтезирует 9,6 г/л экзополисахаридов.

4. Установлено, что ферментолитат клетчатки рисовой шелухи может быть использован в качестве основного субстрата для синтеза ферментов ксиланазы, целлюлазы и целлобиазы штаммами бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*. Наиболее эффективным продуцентом ксиланазы является штамм *P. mucilaginosus* 560, который при культивировании на питательной среде с ферментолитатом клетчатки рисовой шелухи с концентрацией РВ 0,5% при внесении 0,2 % карбамида при pH $6,0 \pm 0,2$ и температуре культивирования $30 \pm 1^\circ\text{C}$ синтезирует ксиланазу с активностью 20 ед/мл.

5. Разработаны принципиальные технологические схемы производства биопрепаратов на основе штамма бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 для стимулирования роста растений, утилизации пожнивных остатков, детоксикации кормов от микотоксинов и усвоения клетчатки животными.

6. Получены биоудобрения, содержащие 10^7 КОЕ/г жизнеспособных клеток штамма *P. mucilaginosus* 574, и испытаны в полевых условиях при выращивании сои и овса с увеличением урожайности на 19,1 % и 20,8 %, соответственно, по сравнению с контролем.

7. Получены кормовые добавки на основе штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 и показана эффективность их применения как адсорбента микотоксинов при Т-2 микотоксикозе животных. Полученные кормовые добавки безвредны при применении.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Ха, Т.З. Влияние источника углерода на синтез биомассы и экзополисахаридов бактериями *Paenibacillus mucilaginosus* / Т.З. Ха, З.А. Канарская, А.В. Канарский, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2019. – Т. 9. – № 3. – С. 509-518.

2. Ха, Т.З. Эффективность культивирования бактерий рода *Paenibacillus mucilaginosus* на питательной среде на основе сахарозы / Т.З. Ха, А.В. Канарский, З.А. Канарская, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». – 2019. – № 3. – С. 62–72.

3. Ха, Т.З. Эффективность культивирования бактерий *Paenibacillus* на ферментолитах клетчатки рисовой шелухи / Т.З. Ха, А.В. Канарский, З.А. Канарская, И.В. Кручина-Богданов, А. В. Щербаков, Е. Н. Щербакова // Химия растительного сырья. – 2020. – № 2. – Р. 271-282.

4. Ха, Т.З. Влияние условий культивирования на продуцирование ксиланазы и рост бактерий *Paenibacillus mucilaginosus* / Т.З. Ха, А.В. Канарский, З.А. Канарская, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова, А.В. Пранович // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2020. – Т. 10. – № 3. – С. 459-469.

5. Ха, Т.З. Биосинтез экзополисахаридов почвенными бактериями *Paenibacillus mucilaginosus* на питательной среде с мелассой / Т.З. Ха, А.В. Канарский, З.А. Канарская, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2020. – Т. 10. – № 4. – С. 708-718.

6. Ха, Т.З. Ключевой стимулятор роста растений – ризобактерии / Т.З. Ха, А.В. Канарский, З.А. Канарская, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование. – 2020. – Т. 3. – № 47. – Р. 58-73.

7. Ха, Т.З. Перспектива применения бактерий рода *Paenibacillus* в промышленной биотехнологии для получения биопрепаратов сельскохозяйственного назначения / Т.З. Ха, А.В. Канарский, З.А. Канарская, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование. – 2020. – Т. 3. – № 47. – С. 74-84.

Публикации в других изданиях

8. Ха, Т.З. Влияние источника углерода на рост культуры *Paenibacillus mucilaginosus* / Т.З. Ха, А.В. Канарский, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова // Актуальная биотехнология. – 2018. – № 1. – С. 8-11.

9. Ха, Т.З. Интенсификация биокаталитических методов получения питательных сред для культивирования микроорганизмов на основе вторичных ресурсов переработки растительного сырья / Т.З. Ха, И.А. Хусаинов, З.А. Канарская, А.В. Канарский // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы международного форума (23-25 мая 2018 г.). – Москва, 2018. – С. 719-720.

10. Ха, Т.З. Толерантность *Paenibacillus mucilaginosus* к хлориду натрия / Т.З. Ха, З.А. Канарская // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием (19 по 24 ноября 2018 г.). Высшая Школа Биотехнологий и Пищевых Технологий. – СПб.: Политех-пресс, 2018. – С. 10-12.

11. Ха, Т.З. Влияния источников углерода на вязкость культуральной жидкости бактерий *Paenibacillus mucilaginosus* / Т.З. Ха, З.А. Канарская // Биомедицинская инженерия и биотехнология: сборник материалов XI Всероссийской научно-практической конференции (24-25 декабря 2018 г.). – Курск: Изд-во КГМУ, 2018. – С 35-37.

12. Лушникова, С.Р. Комплексная переработка рисовой шелухи / С.Р. Лушникова, Т.З. Ха, З.А. Канарская, А.В. Канарский // Актуальные вопросы в науке и практике: материалы XIV международной научно-практической конференции (04 февраля 2019 г.). – Самара, 2019. – С. 171-174.

13. Ха, Т.З. Характеристика роста бактерий *Paenibacillus mucilaginosus* на простых сахарах / Т.З. Ха, З.А. Канарская, А.В. Канарский, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова // Пищевые технологии и биотехнологии. XVI Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, посвященная 150-летию Периодической таблицы химических элементов (16-19 апреля 2019 г.): материалы конференции: в 3 ч. Ч. 1 / Минобрнауки России, Казан. нац. исслед. технол. ун-т. – Казань: Изд-во КНИТУ, 2019. – С. 507-511.

14. Канарский, А.В. Химия и биокаталитическая конверсия вторичных ресурсов переработки растительного сырья / А.В. Канарский, И.А. Хусаинов, Т.З. Ха, Л.А. Мингазова, З.А. Канарская, Е.Р. Якубов // Проблемы механики целлюлозно-бумажных материалов: материалы международной научно-технической конференции посвященной памяти профессоров В. И. Комарова (11-14 сентября 2019 г.). – Архангельск, 2019. – С. 172.

15. Коптяев, В.В. Комплексная переработка рисовой шелухи с получением волокнистых полуфабрикатов / В.В. Коптяев, Ю.В. Севастьянова, Д.А. Дулькин, А.В. Канарский, Т.З. Ха, З.А. Канарская, Е.Р. Якубов // Проблемы механики целлюлозно-бумажных материалов: материалы международной научно - технической конференции посвященной памяти профессоров В. И. Комарова (11-14 сентября 2019 г.). – Архангельск, 2019. – С. 341.

16. Ха, Т.З. Получение биоудобрения на основе почвенных бактерий *Paenibacillus mucilaginosus* / Т.З. Ха // Карды для АПК: сборник материалов международной научно-практической конференции по вопросам подготовки кадров для научного обеспечения АПК, включая ветеринарию (12-13 ноября 2020 г.). – Белгород, 2020. – С. 206-207.