



МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Казанский национальный исследовательский технологический университет»  
(ФГБОУ ВО «КНИТУ»)

На правах рукописи

**Ха Тхи Зунг**

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

Специальность – 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Научный руководитель  
д.т.н., профессор  
Канарский Альберт Владимирович

Казань - 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение .....	6
ГЛАВА 1. Обзор литературы .....	13
1.1 Сведения о ризобактериях .....	13
1.1.1 Прямой механизм положительного влияния ризосферных бактерий на растения .....	13
1.1.1.1 Фиксация молекулярного азота из атмосферы .....	13
1.1.1.2 Повышение биодоступности фосфора для растений .....	16
1.1.1.3 Синтез фитогормонов.....	18
1.1.2 Опосредованная стимуляция роста растений .....	20
1.1.2.1 Биоконтроль.....	20
1.1.2.2 Стрессовая устойчивость .....	21
1.2. Применение бактерий рода <i>Paenibacillus</i> в сельском хозяйстве .....	23
1.2.1 Применение бактерий рода <i>Paenibacillus</i> в растениеводстве .....	24
1.2.2 Применение бактерий рода <i>Paenibacillus</i> в животноводстве.....	28
1.3. Вторичные ресурсы переработки растительного сырья: состав и методы обработки.....	31
1.3.1 Химический состав вторичных ресурсов переработки растительного сырья .....	31
1.3.2 Предварительная обработка вторичных ресурсов переработки растительного сырья .....	33
1.3.3 Биоконверсия вторичных ресурсов переработки растительного сырья.....	36
1.4 Применение ферментации в производстве биопродуктов .....	39
1.5 Влияние условий культивирования на рост и продуцирование метаболитов ризобактерий рода <i>Paenibacillus</i> .....	40
Заключение по обзору литературы .....	47
ГЛАВА 2. Методическая часть .....	48
2.1 Материалы, использованные в исследовании .....	48
2.2 Культуры бактерий, использованные в исследовании.....	48

2.3	Определение морфологии и размера бактерий.....	48
2.4	Обработка вторичных ресурсов переработки растительного сырья для приготовления питательных сред .....	49
2.4.1	Получение ксилана из древесины березы .....	49
2.4.2	Технологическая схема комплексной переработки рисовой шелухи.....	49
2.5	Определение минеральных веществ в щелоке и состава клетчатки рисовой шелухи .....	51
2.6	Определение состава ферментолизата клетчатки рисовой шелухи .....	51
2.7	Приготовление питательных сред для культивирования бактерий.....	52
2.8	Определение содержания редуцирующих веществ в питательной среде и культуральной жидкости .....	53
2.9	Определение азотфиксирующей способности.....	53
2.10	Определение калиймобилизующей и фосфатсольбилизующей активностей бактерий.....	54
2.11	Определение концентрации индолилуксусной кислоты в культуральной жидкости.....	55
2.12	Определение характеристик роста бактерий .....	55
2.13	Метод определения и выделения экзополисахаридов.....	56
2.14	Определение ферментативной активности бактерий.....	56
2.15	Определение технологических характеристик ксиланазы.....	58
2.16	Методы определения влияния условий культивирования на рост бактерий и синтез продуктов метаболизма.....	59
2.17	Обработка результатов экспериментов .....	60
ГЛАВА 3. Исследование биотехнологических характеристик бактерий <i>P. mucilaginosus</i> и <i>P. salinicaeni</i> .....		61
3.1	Исследование способности азотфиксации бактерий <i>P. mucilaginosus</i> и <i>P. salinicaeni</i> .....	62
3.2	Исследование эффективности мобилизации фосфатов и калия бактерий <i>P. mucilaginosus</i> и <i>P. salinicaeni</i> .....	63

3.3 Исследование способности синтеза индолилуксусной кислоты бактерий <i>P.mucilaginosus</i> и <i>P. salinicaeni</i> .....	65
3.4 Исследование влияния солей на рост бактерий <i>P. mucilaginosus</i> и <i>P. salinicaeni</i> .....	66
3.5 Исследование влияния моно- и дисахаридов на рост и синтез ЭПС бактерий <i>P.mucilaginosus</i> и <i>P. salinicaeni</i> .....	68
ГЛАВА 4. Оценка эффективности культивирования бактерий <i>P. mucilaginosus</i> на питательной среде, приготовленной на основе мелассы .....	78
4.1 Выбор эффективного продуцента биомассы и ЭПС при культивировании на питательной среде с мелассой .....	78
4.2 Исследование биотехнологической активности штамма <i>P.mucilaginosus</i> 574 при культивировании на питательной среде с мелассой .....	80
4.3 Влияние содержания мелассы в питательной среде на синтез биомассы и ЭПС штамма <i>P. mucilaginosus</i> 574 .....	82
4.4 Влияние температуры культивирования и pH питательной среды на синтез биомассы и ЭПС штаммом <i>P. mucilaginosus</i> 574 .....	83
4.5 Влияние источника и содержания азота на синтез биомассы и ЭПС штаммом <i>P. mucilaginosus</i> 574 .....	85
4.6 Влияние возраста и дозы инокулята на синтез биомассы и ЭПС штаммом <i>P.mucilaginosus</i> 574 .....	87
4.7 Влияние аэрации на синтез биомассы и ЭПС штаммом <i>P.mucilaginosus</i> 574	88
ГЛАВА 5. Оценка эффективности утилизации углеводов клетчатки однолетних и многолетних растений бактериями <i>P. mucilaginosus</i> и <i>P. salinicaeni</i> .....	91
5.1 Получение ферментолизата клетчатки рисовой шелухи .....	91
5.2 Культивирование бактерий <i>P. mucilaginosus</i> и <i>P. salinicaeni</i> на питательной среде с ферментоллизатом клетчатки рисовой шелухи .....	96
5.3 Определение влияния условий культивирования на синтез ксиланазы штаммом <i>P. mucilaginosus</i> 560.....	102
5.3.1 Влияние содержания РВ в ферментоллизате клетчатки рисовой шелухи на рост и синтез ксиланазы штаммом <i>P.mucilaginosus</i> 560 .....	102

5.3.2 Влияние температуры культивирования на рост и синтез ксиланазы штаммом <i>P. mucilaginosus</i> 560.....	103
5.3.3 Влияние pH среды на рост и синтез ксиланазы штаммом <i>P.mucilaginosus</i> 560 .....	104
5.3.4 Влияние источника углерода на рост и синтез ксиланазы штаммом <i>P.mucilaginosus</i> 560 .....	107
5.3.5 Влияние возраста инокулята на рост и синтез ксиланазы штаммом <i>P.mucilaginosus</i> 560 .....	108
5.3.6 Влияние источника и содержания азота на рост и синтез ксиланазы штаммом <i>P. mucilaginosus</i> 560 .....	109
5.4 Технологические характеристики ксиланазы, синтезируемой штаммом <i>P.mucilaginosus</i> 560 .....	111
ГЛАВА 6. Разработка технологии получения биопрепаратов сельскохозяйственного назначения .....	115
6.1 Разработка технологии и получение биопрепаратов на основе штамма <i>P.mucilaginosus</i> 574 .....	115
6.2 Разработка технологии и получение биопрепаратов на основе штамма <i>P.mucilaginosus</i> 560 .....	119
Заключение.....	124
Рекомендации для промышленности.....	126
Перечень сокращений и условных обозначений.....	127
Список использованной литературы.....	128
Приложение 1 .....	161
Приложение 2 .....	163
Приложение 3 .....	165
Приложение 4.....	168

## ВВЕДЕНИЕ

**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 [1], в том числе Байкал ЭМ-1, Экстагран, Ризобакт, Эктрасол, Эффект био и др., которые изготовлены на основе *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Rhizobium sp.*, *Azotobacte 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,  $\beta$ -фруктофуразидазной, нитрогеназной, фитазной, целлюлазной, целлобиазной 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 целлобиаз, 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 ферментолизатов 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 ферментолизата с минимальными потерями простых сахаров.

2. Определены технологические параметры культивирования для синтеза ксиланаз штаммом *P. mucilaginosus* 560 на основе ферментализата 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 ферментализата 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, ферментолизата 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» (Санкт-Петербург, 2018), XVI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, посвященная 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., заведующему кафедрой пищевой биотехнологии д.х.н., проф. 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Сведения о ризобактериях

В ризосфере микроорганизмы играют важную роль в превращении органических веществ и биогеохимических циклах питательных веществ. Значительная часть бактерий в почве, в том числе, в корневой зоне растений взаимодействует с растениями-хозяевами и может оказывать положительное влияние на рост и питание растений и подавление болезней [2]. В настоящее время наблюдается тенденция увеличения мирового объема производства микробиологических удобрений на основе ризобактерий, способствующих росту растений (PGPR - Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Благодаря применению ризобактерий в воспроизводстве сельскохозяйственных растений появляется возможность существенно увеличить урожайность зерновых, бобовых, декоративных растений, овощей, плантационных культур и т.п [3].

Ризобактерии могут влиять на рост растений прямыми и косвенными механизмами [4]. Прямое воздействие ризобактерий связано с увеличением поглощения питательных веществ растениями, синтезом фитогормонов, сидерофоров и ферментов, а также снижением уровня этилена в растении. В ризосфере высока частота встречаемости бактерий, стимулирующих поглощение питательных веществ корнями растений. Представителями таких бактерий являются *Azospirillum*, *Bacillus* и *Rhizobium* [5]. Опосредованное (косвенное) благотворное воздействие этих бактерий вызывает подавление болезней и повышение устойчивости растений к стрессовым факторам [6]. Эти механизмы могут быть одновременно или последовательно влиять на разных этапах развития растений.

#### 1.1.1 Прямой механизм положительного влияния ризосферных бактерий на растения

##### 1.1.1.1 Фиксация молекулярного азота из атмосферы

Азот (N) является наиболее важным питательным элементом для роста и развития растений. Атмосферный азот химически инертен, но может

фиксироваться некоторыми бактериями – азотфиксаторами в доступной форме для усвоения растениями. Способность фиксации атмосферного азота микроорганизмами определяется активностью нитрогеназы при их культивировании на питательной среде без добавления азота. Метод основан на восстановлении ацетилена ( $C_2H_2$ ) в этилен ( $C_2H_4$ ), который достаточно легко определить методом газовой хроматографии [7].

Азотфиксирующие бактерии фиксируют атмосферный азот с помощью фермента нитрогеназы (*nif*), состоящего из субъединиц – металлопротеинов. Первая субъединица – динитрогеназа содержит активный сайт для связывания азота воздуха и состоит из двух гетеродимеров, кодируемых *nifD* и *nifK* генами. Вторая субъединица – редуктаза динитрогеназы содержит в качестве кофактора металл [8].

В процессах образования узелков или клубеньков у растений (нодуляции) происходят:

- взаимодействие *Rhizobia* с лектинами растений-хозяина и привязанностью к клеткам корней;
- под воздействием *Rhizobia* корневые волоски скручиваются;
- *Rhizobia* проникают в клетки корневых волосков, где образуют инфекционные нити, через которые оформляют бактериоидные состояния, и далее образуются узелки.

Азотфиксирующие бактерии подразделяют на следующие группы:

- симбиотические – бактерии, включая членов семейства ризобиевых, которые усваивают азот атмосферы только находясь в симбиозе с бобовыми растениями (например, *Rhizobia spp.*) [9] и актиноризными растениями (например, бактерия рода *Frankia*);
- несимбиотические (свободноживущие) – бактерии, свободно живущие в почве и усваивающие азот воздуха, такие как цианобактерии (*Anabaena*, *Nostoc*), *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* и *Azocarus* и др. [10].

Однако, несимбиотические азотфиксаторы фиксируют лишь небольшое количество азота из атмосферы, менее потребности растения-хозяина в ассоциации бактерий – растений [11]. Прямое положительное влияние на растения оказывают симбиотические азотфиксаторы, живущие в клубеньках корней бобовых растений (клубеньковые бактерии), относящиеся к семейству *Rhizobiaceae*. Корневые узелки образуются при симбиотической ассоциации бобовых растений с клубеньковыми бактериями, которые снабжают растения соединениями азота в условиях дефицита азота.

В процессе фиксации азота требуется большое количество АТФ, поэтому вместо синтеза гликогена для резерва энергии выгоднее проводить окислительное фосфорилирование углеводов, которое приводит к синтезу АТФ. Делеция (удаление) гена синтеза гликогена проведена бактериями *R. tropici* [12]. Обработка бобов этим мутантным штаммом бактерий привела к значительному увеличению числа образующихся клубеньков, а также сухой массы растения по сравнению с результатом при обработке бобов со штаммом дикого рода.

Кислород является ингибирующим фактором нитрогеназы и негативным регулятором экспрессии гена *nif*, однако, кислород необходим для дыхания бактерий *Rhizobia spp.* Эта задача может быть решена путем введения леггемоглобина, который осуществляет необходимую регуляцию распределения кислорода внутри клубеньков. Он связывается с молекулярным кислородом, так что нитрогеназа не ингибируется, но связанный кислород может быть доступным в дыхательных центрах в цитоплазме хозяина. Гем для этой молекулы, по-видимому, синтезируется бактериями, а глобин – растением-хозяином. Трансформация штаммов кодированием генов бактериального гемоглобина способствует повышению синтеза гемоглобина бактериями *Rhizobium spp* [13]. Показано, что трансформированный (мутагенный) штамм *Rhizobia etli* с плазмидой, несущей ген гемоглобина грамотрицательных бактерий *Vitreoscilla sp.*, в условиях низкого уровня растворенного кислорода в среде способствует улучшению частоты дыхания ризобияльных клеток в 2 – 3 раза больше по сравнению с частотой дыхания нетрансформированных штаммов бактерий.

В ряде экспериментов в тепличных условиях сравнивались результаты, когда бобовые культуры были инокулированы нетрансформированными и были инокулированы гемоглобинсодержащими штаммами *R. etli*. Инокуляция бобовых растений гемоглобинсодержащими штаммами *R. etli* увеличила нитрогеназную активность на 68 %. Это различие в активности нитрогеназы приводит к увеличению содержания азота в листьях на 25 – 30 % и повышению содержания азота в семенах на 16 % [13].

Таким образом, сегодня в мире вместо химических удобрений значительное внимание уделяют применению биоудобрения для повышения содержания связанного азота в почве, что способствует повышению урожайности растений [14]. В работе [15] показано, что биоудобрение на основе сочетания двух видов бактерий *Anabaena* и *Azolla* способствует фиксированию большого количества азота (до 50 кг/га почвы), снижает потери азота путем сокращения улетучивания аммиака из почвы и стимулирует рост риса.

### **1.1.1.2 Повышение биодоступности фосфора для растений**

Кроме азота, фосфор также является одним из важнейших макроэлементов для роста растений. Однако биодоступность фосфора ограничена и при его недостатке происходит ингибирование развития растения [16]. В почве фосфор присутствует в нерастворимой минеральной форме (апатит, гидроксиапатит и оксиапатит) и органической форме (инозитолфосфат (фитат почвы), фосфомоноэфиры, фосфодиэфиры и фосфотриэфиры) [17].

Солюбилизация и минерализация фосфора фосфат-солюбилизирующими бактериями считаются одним из наиболее важных признаков, связанных с фосфатным питанием растений в биогеохимическом цикле фосфора в почве [18], а также в стимулировании роста растений ризобактериями [19]. Как правило, солюбилизация неорганического фосфора происходит под действием низкомолекулярных органических кислот. Важную роль играет в организме фитаза, которая синтезируется различными почвенными бактериями [20]. Показан синтез фермента фитазы бактериями родов *Bacillus*, *Enterobacter*,



*Klebsiella* и *Pseudomonas* [20]. Механизм солюбилизации неорганического фосфора выделяемыми органическими кислотами, такими как уксусная, лимонная, щавелевая, обнаружен у бактерий родов *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* и *Serratia* [21]. При этом гидроксильные и карбоксильные группы этих органических кислот взаимодействуют с фосфатами в почве, что приводит к образованию катионов и подкислению почвы, вследствие чего выделяется растворимый фосфат, доступный для растений [22]. Следует отметить, что минерализация органических фосфоров происходит под воздействием различных фосфатаз, включая фосфомоноэстеразы, фосфодиэстеразы и фосфотриэстеразы, катализирующих гидролиз сложных эфиров фосфорной кислоты [19]. Отмечено, что фосфатсолюбилизация и минерализация могут осуществляться одним и тем же штаммом бактерий [23]. Помимо обеспечения фосфора для растений фосфатсолюбилизирующие бактерии также стимулируют эффективность азотфиксации, повышают доступность других микроэлементов (например, железо, цинк) и синтезируют важные стимулирующие рост растений вещества [24]. В ризосфере способность фосфатсолюбилизации играет специфичную роль для конкретного растения-хозяина или типа почвы. Отмечено высокое количество растворимого фосфора, высвобождающегося в известковых почвах [25]. Физиологические свойства ризобактерий определяют эффективность высвобождения растворимого фосфора, а количество высвобождающегося фосфора зависит от количества биомассы этих бактерий в почве. Поэтому для решения этой проблемы проводят инокуляцию растений фосфатсолюбилизирующими бактериями и тем самым увеличивают количество этих бактерий в почве. Для сохранения выживаемости фосфатсолюбилизирующих бактерий в почве в течение длительного времени можно инкапсулировать их клетки в нетоксичных полимерах, например, в альгинате, который позволяет увеличить срок годности бактерий, защитить их от воздействий окружающей среды и обеспечить их постепенное поступление в почву [26]. Наилучшая эффективность в стимулировании роста растений наблюдается при совместной инокуляции фосфатсолюбилизирующих бактерий с

бактериями, способными к фиксации азота [27, 29] или микоризными грибами [28]. Установлено, что при обработке древостоев мангров смесью азотфиксирующих бактерий *Phyllobacterium sp.* и фосфатсольюбилизирующих бактерий *Bacillus licheniformis* уровень азотфиксация и фосфатсольюбилизация повышается по сравнению с растениями, обработанными отдельными культурами. Показано взаимное влияние на метаболизм в условиях *in vitro* при совместной инокуляции двух родов рассматриваемых бактерий. При этом повышается способность азотфиксации бактерий *Phyllobacterium sp.* и усиливается высвобождение растворимого фосфора в почве бактериями *B.licheniformis* [29]. Таким образом, фосфатсольюбилизирующие бактерии играют важную роль в сельском хозяйстве.

### 1.1.1.3 Синтез фитогормонов

Фитогормоны – низкомолекулярные органические вещества, вырабатываемые растениями, и являющиеся регуляторами роста и развития растений. Наряду с биологической фиксацией азота, стимулирующей рост растений, таких как кукуруза, пшеница и сахарный тростник, *Azospirillum* синтезируют ряд фитогормонов, которые способствуют поглощению растениями из почвы фосфора, калия, азота, железа [30]. При низких концентрациях фитогормоны оказывают влияние на биохимические, физиологические и морфологические процессы в растениях и применяются в сельском хозяйстве для повышения урожайности растений. Фитогормоны активно синтезируются в клетках верхушек корней и стеблей растений. Известно, что на развитие растений могут существенно и всестороннее влиять фитогормоны: ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая кислота и этилен.

Ауксин является наиболее важным фитогормонам, прямо или косвенно стимулирующим развитие корневой системы растений [31]. К синтезу ауксина способны бактерии родов *Azospirillum*, *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Pseudomonas*. Среди них наиболее распространенным гормоном в растениях является индолилуксусная кислота (ИУК) [32]. Согласно результатам, полученным в

работе [33], экзогенные ИУК контролируют большинство процессов развития и роста растений. ИУК в небольшой концентрации может стимулировать удлинение первичного корешка. Высокая концентрация ИУК также способствует увеличению образования корневых волосков и стимулированию образования боковых корней, но не способствует увеличению длины первичного корешка. Благодаря бактериальной ИУК площадь поверхности и длина корня растений увеличиваются, доступ питательных веществ в растение повышается.

Гиббереллины участвуют в процессах прорастания семян, индукции цветения, развития цветов, плодов и листьев [34]. Наиболее ярким проявлением физиологического действия гиббереллинов является удлинение побега [35]. Гиббереллины интенсивно синтезируются бактериями рода *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Herbaspirillum* и *Rhizobium* [36]. Установлено, что при обработке растения томата гиббереллином, продуцируемого штаммом LK11 бактерий *Sphingomonas sp.*, рост их значительно увеличивается [37].

Цитокинины стимулируют деление клеток растения, повышают чувствительность сосудистого камбия, а также дифференцирование сосудов и пролиферацию корневых волосков, однако подавляют образование боковых корней и рост первичного корешка [38]. Доказано, что саженцы туи восточной при инокуляции цитокинином, продуцируемым штаммами *Bacillus subtilis*, были более устойчивы к стрессу [39].

Этилен, также являющийся важным растительным гормоном, регулирует многие процессы в растениях, в частности, опадание листьев или созревание плодов [40]. Для защиты от действия стрессовых факторов, таких как холода, засуха, обводнение, инфекции патогенными микроорганизмами и действия тяжелых металлов, растения синтезируют 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АЦК), который является предшественником этилена [11]. В стрессовых условиях в растениях синтезируется высокая концентрация этилена [41]. Высокая концентрация этилена вызывает дефолиацию клеточных процессов, сопровождающиеся опадением листьев, угнетение роста корня, стебля и преждевременное старение растения, что приводят к снижению урожайности

растений [42]. Исследования [43] показали, что ризобактерии способны продуцировать фермент АЦК-деаминазу и фитогормоны ИУК, и этим стимулируют рост растений. Известно, что фермент АЦК-деаминаза в основном участвует в разложении этилена ризобактериями [43]. В исследовании [41] установлено, что бактерии родов *Rhizobium* и *Pseudomonas*, способные продуцировать АЦК-деаминазу, позволяют улучшить рост, физиологию и качество фасоли золотистой на засоленных почвах.

### 1.1.2 Опосредованная стимуляция роста растений

Косвенный механизм предполагает способность ризобактерий (PGPR) снижать вредное воздействие патогенов на рост растений.

#### 1.1.2.1 Биоконтроль

Биоконтроль является экологически чистым подходом применения микроорганизмов для борьбы с болезнями растений. Биоконтроль роста растений основан на колонизации корней растений ризобактериями, конкуренции за питательные вещества, синтез антибиотиков и литических ферментов, индукцию системной резистентности против патогенов [44].

Колонизация корневой системы и/или конкуренция за питательные вещества PGPR играют важную роль в ризосфере и определяют эффективность биоконтроля. Доказано [45], что бактерии *B. megaterium* способны колонизировать как корни, так и регулировать жизнедеятельность патогенного гриба *Rhizoctonia solani*.

Более того, синтез антибиотиков и литических ферментов ризобактериями является основным механизмом подавления патогенов и опосредованно стимулирует рост растений [46]. Обнаружена способность синтеза противогрибковых метаболитов, в том числе, антибиотиков ряда феназинов, пирролнитринов, 2,4-диацетилфлороглюцинолов, пиолетеоринов, вискозинамидов и тензинов многими ризобактериями [10], а также возможность синтеза литических ферментов, таких как хитиназа, целлюлаза,  $\beta$ -1,3-глюканаза,

протеаза и липаза, которые вызывают лизис клеточной стенки фитопатогенных грибов [47]. В частности, хитиназа считается важным ферментом для подавления фитопатогенных грибов, например, *Botrytis cinerea* [48], *Sclerotium rolfsii* [49], *Fusarium oxysporum f.sp. cucumerinum* [50] и *Phytophthora* [51]. Фермент  $\beta$ -глюканаза позволяет разрушить клеточные стенки грибов рода *Rhizoctonia solani* и рода *Pythium ultimum* [48, 49].

В растении существуют естественные защитные системы против фитопатогенов, которые повышают устойчивость растений к грибной, бактериальной и вирусной инфекции. [52]. Системная приобретенная устойчивость и системная индуцированная устойчивость являются двумя известными защитными механизмами в растении. При этом системная приобретенная устойчивость возникает, когда растения активируют свой защитный механизм в ответ на первичное заражение патогеном [53]. Системная приобретенная устойчивость сопровождается увеличением концентрации салициловой кислоты и накоплением белков, связанных с патогенезом белков (PR-белка), которые подавляют патогены и защищают растения [54]. Системная индуцированная устойчивость может быть вызвана непатогенными микроорганизмами в ризосфере и не основана на передаче сигналов путём синтеза салициловой кислоты или PR-белка, однако, механизм системной индуцированной устойчивости включает передачу сигналов фитогормона - жасмоната и этилена внутри растения [55]. Помимо жасмоната и этилена в качестве сигналов включаются и другие бактериальные молекулы, такие как O-антиген, являющийся боковой полисахаридной цепью липополисахаридов наружной мембраны [56], летучие органические соединения, например, бутандиол и ацетоин, высвобождающиеся при анаэробной ферментации [57], циклические липопептиды - поверхностно-активные вещества [58].

### 1.1.2.2 Стрессовая устойчивость

При исследовании основных путей метаболизма ризобактериями установлено, что метаболические процессы связаны с синтезом фитогормонов в

ризосфере растений [59] и индукцией устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам растений [4].

Накопление осмопротектора пролина в растениях позволяет поддерживать потенциал воды в условиях ее дефицита и интенсифицирует поглощение воды из почвы [60]. Отмечено [61] влияние ризобактерий на накопление пролина в сахарном тростнике. При инокуляции растения ризобактериями и в условиях водного стресса концентрация пролина в листьях в 2,2 раза больше по сравнению с такими растениями при условии отсутствия стресса.

В растениях происходит синтез ряда антиоксидантных ферментов, таких как каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы, участвующие в нейтрализации свободных радикалов [62]. Ризобактерии PGPR в ризосфере могут значительно способствовать синтезу антиоксидантных ферментов в растениях. При инокуляции бактериями *Bacillus subtilis* в растениях наблюдали увеличение концентрации антиоксидантных ферментов [63]. Так, инокуляция бактериями *B.subtilis* томата увеличивала активность пероксидазы [64]. Аналогично в кукурузе, инокулированной бактериями *Piriformospora indica*, активность каталазы и супероксиддисмутазы были увеличены, а влияние биотического стресса снижено [65]. Антиоксиданты являются нутрицевтическими молекулярными компонентами функциональных продуктов, поэтому наличие в пище антиоксидантных ферментов полезно для здоровья человека [66].

Накопление экзополисахаридов (ЭПС) как вторичных метаболитов некоторыми бактериями оказывает значительное влияние на различные свойства почвы и урожайность растений. Продуцентами ЭПС являются ризобактерии вида *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Paenibacillus* и др. [67]. ЭПС обладают уникальными влагоудерживающими и цементирующими свойствами. Поэтому они играют жизненно важную роль в формировании и стабилизации почвенных агрегатов и регулировании питательных веществ и потока воды через корни растений [68], что обуславливает последующее увеличение роста растений. Аналогично, ЭПС защищают нитрогеназы против воздействия высокой концентрации кислорода и участвуют во взаимодействии бактерий с растениями

[69]. Бактериальные ЭПС способствуют снижению солевого стресса растений благодаря связыванию ионами  $\text{Na}^+$  в корне, при этом накопление в растительных клетках ионов  $\text{Na}^+$  уменьшается [70]. В растениях, посеянных с ЭПС, продуцированными бактериями, наблюдали большее накопление пролина, сахаров и свободных аминокислот в условиях дефицита воды [71]. Обработка посевного материала ЭПС, продуцированными бактериями *Azospirillum*, показало, что растения более устойчивы к водному стрессу благодаря улучшению структуры почвы и агрегации почвы [72].

Основываясь на механизме действия, PGPR можно применять в трех основных биопродуктах сельскохозяйственного назначения:

- биоудобрение, в котором содержатся живые микроорганизмы с биологической азотфиксацией и растворимостью фосфора;
- фитостимулятор, в котором микроорганизмы способны продуцировать фитогормоны;
- биопестициды, в которых микроорганизмы способны стимулировать рост растений в результате контроля фитопатогенных агентов [10].

## 1.2. Применение бактерий рода *Paenibacillus* в сельском хозяйстве

Род *Paenibacillus* обособлен от рода *Bacillus* в 1993 году на основании идентификации последовательности гена 16S рРНК [73]. Название рода на латыни «*paene*» означает «почти» и, следовательно, *Paenibacillus* можно перевести как «почти бациллы», что отражает сходство с родом *Bacillus*. Бактерии рода *Paenibacillus* являются палочковидными, аэробными или факультативно анаэробными, в неблагоприятных условиях образуют эндоспоры. Однако они отличаются от других представителей рода *Bacillus* морфологически. Это стержнеобразные бактериальные клетки с жгутиками, которые продуцируют эллипсоидальные споры с вздутыми спорангиями. Биохимические признаки: каталазоположительные;  $\text{H}_2\text{S}$  не продуцируют, оксидазоположительные, G-C состав на уровне 45 – 54 %, C anteiso-C15:0 в качестве основной клеточной жирной кислоты, мезодиаминопипи-мелиновой кислоты в качестве диагностической

диаминокислоты. Анализ последовательностей 16S рРНК показал, что штаммы *Paenibacillus* имеют различие в обобщенной нуклеотидной последовательности области 16S рРНК по сравнению со штаммами *Bacillus*. Степень внутривидового сходства в последовательности гена 16S рРНК – 89,6 % [73].

Бактерии рода *Paenibacillus* были выделены из различных источников: организма человека, животных, растений и окружающей среды. Большинство этих бактерий находятся в почве и часто находятся на корнях растений. Более того, виды бактерий рода *Paenibacillus* идентичны бактериям *Bacillus* в их взаимодействии с растениями как ризобактерии, стимулирующие рост растений (PGPR). При этом способность к фиксации молекулярного азота, проявляющаяся некоторыми штаммами бактерий рода *Paenibacillus*, обеспечивает их превосходство перед бактериями рода *Bacillus*. *Paenibacillus* рекомендуется использовать как стимулирующие препараты в сельском хозяйстве в виде биоудобрения для растений, в животноводстве в виде кормовых добавок и т.п. [74, 75].

### **1.2.1 Применение бактерий рода *Paenibacillus* в растениеводстве**

В настоящее время применение бактериальных препаратов для повышения плодородия почвы является одним из приемов агротехнологии, альтернативой возрастающему использованию минеральных удобрений. Это особенно актуально в условиях необходимости экологической безопасности.

Биодобавки ускоряют процесс высвобождения питательных веществ из органоминерального удобрения, а также процесс усвоения высвобожденных веществ растениями. Кроме того, биодобавки способствуют дополнительному накоплению питательных веществ в почве в легкоусвояемой растениями форме. Применяемые бактериальные удобрения изготавливают на основе различных штаммов микроорганизмов или их метаболитов, в частности, бактерий рода *Paenibacillus*.

Бактерии рода *Paenibacillus* известны как ризобактерии, способствующие росту растений (PGPR), в том числе, кукурузы [76], огурца [77], тыквы [78], риса [79], проса [80] и других. *Paenibacillus* способны напрямую стимулировать рост



сельскохозяйственных растений за счет способности к азотфиксации, солюбилизации фосфата, синтезу фитогормона ауксина и выделению сидерофоров, которые облегчают ассимиляцию железа [81-83].

Азот считается важным элементом для синтеза аминокислот, белков и гормонов, которые влияют на развитие площади листьев и эффективность фотосинтеза растений. Установлено, что более 20 видов *Paenibacillus* могут фиксировать азот, являющийся лимитирующим фактором роста растений, в том числе *P. polymyxa*, *P. macerans*, *P. durus*, *P. peoriae*, *P. borealis*, *P. brasilensis*, *P. graminis*, *P. odorifer*, *P. wynnii*, *P. massiliensis* и *P. sabinae* [84, 85].

Помимо азота, фосфор также является наиболее важным питательным веществом, необходимым для роста растений. Растения могут поглощать только моно и двухосновный фосфат, которые являются растворимой формой фосфата. Растения обеспечиваются фосфором в доступной форме следующими бактериями: *P. elgii* [86], *P. kribbensis* [87], *P. macerans* [88], *P. mucilaginosus* [89], *P. polymyxa* [88], *P. xylanilyticus* [90].

Фитогормоны играют очень важную роль в развитии растений, стимулируя прорастание семян и клубней, образование корней и созревание плодов, входят в состав коммерческих биоудобрений для растений [91]. Обнаружен синтез ИУК, способствующий росту пшеницы бактериями *P. polymyxa* [92]. В пшенице наблюдалось выделение изопентениладенина и одного неизвестного цитокининподобного соединения в стационарной фазе роста, которые способствуют прорастанию семян, формированию почек, освобождению почек от апикального доминирования, стимуляции расширения листьев и репродуктивного развития и замедления старения [93-95]. Установлено влияние ризобактерий *P. polymyxa* на регуляцию активности ферментов и рост пшеницы и шпината. При этом в листьях пшеницы и шпината при инокуляции *P. polymyxa* находились следующие ферменты: глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа, глутатион-редуктаза и глутатион-S-трансфераза [96].

Кроме этого, эти бактерии обладают способностью к биосинтезу антибиотиков и литических ферментов, которые обеспечивают защиту растений

от насекомых, болезнетворных микроорганизмов, включая бактерии, грибы, нематоды и вирусы [97-99]. Было показано, что бактерии *P. polymyxa* обеспечивают биозащиту цветной капусты [100], гороха [101], женьшеня [102], огурца [103], нута [104], арахиса [105], сои [106], перца [97] и других. Другие бактерии вида *Paenibacillus*, тоже обладающие свойствами биоконтроля, включают *P. alvei* [107], *P. brasilensis* [108], *P. dendritiformis* [109], *P. ehimensis* [110], *P. elgii* [111], *P. kobensis* [112], *P. lentimorbus* [113], *P. macerans* [114], *P. peoriae* [115] и *P. thiaminolyticus* [116].

Таким образом, большинство бактерий рода *Paenibacillus* стимулируют развитие растений, защищают их от патогенов, что обуславливает их использование в качестве биоудобрения, биопестицидов и/или фитостимуляторов.

Показана эффективность применения биопрепаратов на основе штамма *P. mucilaginosus* 3016 на рост сои. При инокуляции сои бактериями *P. mucilaginosus* 3016 отмечено, что симбиотическая нодуляция (образование корневых клубеньков), параметры роста, содержание питательных веществ в сое и урожайность сои значительно улучшались. При этом урожайность сои достигала 3191,4 кг/га. Негативные воздействия на качество почвы также снижались. Доказано, что *P. mucilaginosus* 3016 являются перспективными штаммами для разработки технологии производства коммерческих биоудобрений [117].

При обработке зеленых бобовых семян биоудобрением на основе штамма *P. mucilaginosus* N3 после 15 дней роста было обнаружено увеличение общей высоты саженцев на 29,0 % и увеличение общей биомассы саженцев на 26,9 % по сравнению с необработанными саженцами в контроле [118].

На основе *P. polymyxa* биоудобрения с постепенным высвобождением бактерий показано, что способность поглощения азота корнями чая повышалась [119, 120]. Известно, что штаммы *P. polymyxa* имеют способность к синтезу ауксина и биологически активных соединений, таких как ЭПС, которые могут ингибировать чайные патогены *Cephaleuros parasiticaus* Karst и *Macrophoma* sp., вследствие чего происходит повышение урожайности чая [121, 122]. Применение с высоким и медленным высвобождением биоудобрения *P. polymyxa* способствует

увеличению выхода чая на 34,7 – 49,3 % и 27,5 – 43,6 %, соответственно, по сравнению с необработанным контролем [123]. Эти данные существенно не отличаются от результатов применения химических удобрений. Однако увеличение использования азотных удобрений в чайных садах привело к интенсивным выбросам закиси азота ( $N_2O$ ). По результатам испытания в искусственных условиях (горшках) показано, что применение *P. polymyxa* в дополнение к мочеvine выделение  $N_2O$  уменьшалось на 36,5 – 73,1%. Установлено, что биоудобрение *P. polymyxa* соответствует требованиям современного сельского хозяйства, направлено на увеличение выхода и качества продукции при одновременном снижении негативного воздействия на окружающую среду [124].

Значительный интерес представляют биоудобрения на основе комбинированных микроорганизмов. Обнаружено, что комбинированная инокуляция бактериями, растворяющими фосфаты и калий, *Bacillus megaterium var. phosphaticum* и *P. mucilaginosus*, способствовала увеличению общего растворимого Р и К как в почве, так и в перце (*Capsicum annum L.*), и в огурце (*Cucumis sativus L.*) [125]. Показано, что урожайность соломы и зерна значительно увеличилась после комбинированной инокуляции фосфатсольюбилизирующими бактериями (*Bacillus circulans* и *Cladosporium herbarum*) и грибами арбускулярной микоризы (*Glomus flaviculatum*) [126].

Проведено исследование влияния комбинированной инокуляции грибами арбускулярной микоризы (*Rhizophagus intraradices*) и ризобактериями, способствующими росту растений (*P. mucilaginosus*), на рост проростков цитрусовых в условиях дефицита фосфора. В данном исследовании показано повышение способности поглощения азота и фосфора растениями. Кроме этого, длина гифы грибов арбускулярной микоризы и популяция *P. mucilaginosus* значительно увеличились. Результатами экспериментов в искусственных условиях (горшках), в которых исследовался рост, морфология корня и другие физиологические переменные в растении, показано, что при комбинированной инокуляции грибами *R. intraradices* и ризобактериями *P. mucilaginosus* длина

корня тройчатых оранжевых значительно увеличивалась. Однако, длина корня была заметно уменьшена при инокуляции микоризой. В условиях дефицита фосфора в проростках, инокулированных ассоциацией *R. intraradices* и *P.mucilaginosus*, обнаружены высокая концентрация хлорофилла в листьях и незначительная корневая активность по сравнению с теми, которые не были инокулированы вообще, или инокулированы только одним из рассматриваемых микроорганизмов. Отмечено повышение концентрации антиоксидантных ферментов, но содержание малонового диальдегида в тройчатых оранжевых снижалось при комбинированной инокуляции и заметно при индивидуальной инокуляции грибами *R. intraradices*. Таким образом, комбинированная инокуляция грибами арбускулярной микоризы и ризобактериями может быть реальным, практическим способом смягчения стресса от низкого уровня фосфора в устойчивом воспроизводстве цитрусовых культур [127].

### 1.2.2 Применение бактерий рода *Paenibacillus* в животноводстве

Бактерии рода *Paenibacillus* благодаря своей мощной ферментативной системе и синтезу целлюлозолитических ферментов является хорошим консервантом кормов. В работе [128] предложено использовать биомассу штамма *P. mucilaginosus* (ранее *B. mucilagiosus*) ГЦ ВКМВ – 1452 Д в качестве закваски при силосовании растительного сырья в дозе 1 – 10 % от зеленой массы. Микробную суспензию приготавливают в физиологическом растворе концентрацией 0,5 – 2,0 %. При этом в силосе увеличивается содержание сырого и перевариваемого протеина на 20 – 28 %, содержание сырой клетчатки снижается на 11,7 – 23,3 %, содержание безазотистых экстрактивных веществ увеличивается в 1,5 – 2,0 раза по сравнению с контролем.

Помимо ферментов биомассу и продукты метаболизма бактерий рода *Paenibacillus* можно использовать в качестве кормовых добавок в рацион сельскохозяйственных животных и птиц для пополнения в нем дефицита биологических активных веществ и белка [72].

Рекомендовано добавление в рацион телят биомассы *P. mucilaginosus* для улучшения роста телят и экономии кормов. В состав биомассы входят 65 – 75 % белка, к которому 17 аминокислот, в частности, лизин, лейцин, валин, триптофан, тирозин и др., и 18 минеральных элементов. Кроме этого, *P. mucilaginosus* являются продуцентом многих ценных веществ, таких как витамин В1, экзоферменты, которые обеспечивают улучшение усвоения кормов. Благодаря этому при введении *P. mucilaginosus* в корма в количестве 0,15 – 0,50 г на кг массы животного два раз в сутки после 3 месяцев получен среднесуточный привес животного на 916 г больше, а расход кормов на 6,37 к.е. меньше по сравнению с контролем. Полученными результатами установлено, что применение биомассы *P. mucilaginosus* в качестве кормовых добавок оказывает благоприятное влияние на организм животных, способствует повышению их естественной резистентности [129].

Предполагается использование микробной кормовой добавки на основе штамма *P. ehimensis* IB 739, являющегося антагонистом некоторых фитопатогенных грибов. Штамм продуцирует глюканазы [130], протеазы, хитинолитические ферменты [131] и ЭПС [132], которые улучшают усвоение кормов и позволяют проводить профилактику заболеваний желудочно-кишечного тракта животных и птицы. Внесение в рацион кормления животных кормовой добавки снижает расход кормов при одновременном дополнительном приросте живой массы на 15,4 – 16,8 % у гусей, на 13 – 16 % у молодняка бройлерных цыплят кросса «Кобб 500» и на 6 – 9 % у молодняка уток. На гусях отмечено повышение общего уровня обмена веществ, что способствовало улучшению реализации их генетического потенциала, значительному снижению содержания кишечной палочки, энтерококков, стафилококков при сохранении базового уровня бифидобактерий, лактобацилл и клостридий, что благотворно улучшало деятельность сердечно-сосудистой системы птицы. За 10 недель применения яйценоскость кур-несушек увеличилась на 6,0 – 9,8 % и средняя масса одного яйца существенно увеличилась по сравнению с контролем, благодарно чему получено больше яиц первой категории [133].

Изучено влияние пальмового ядра, ферментированного (ФПЯ) целлюлолитическими бактериями *P. polymyxa* ATCC 842 на усвояемость питательных веществ, высоту кишечных ворсинок и кишечную микрофлору при кормлении 245 однодневных цыплят-бройлеров (Cobb500). Пальмовые ядра (ПЯ) являются агропромышленным отходом, полученным в процессе экстракции масла из плодов пальмы. Однако в пальмовом ядре высокое содержание сырой клетчатки [134, 135] и некрахмалистых полисахаридов, таких как маннан, ксилан и целлюлоза [135-137], которые оказывают неблагоприятное влияние на животных при кормлении. Твердофазная ферментация пальмового ядра целлюлолитическими ферментами не только улучшает питательную ценность этого сырья, но и экономически выгодна с точки зрения снижения затрат на кормление домашней птицы, увеличение интенсивности их роста [138]. Установлено, что при добавлении в рацион бройлеров до 15 % пальмового ядра, ферментированного бактериями *P. polymyxa* ATCC 842, не вызывает каких-либо неблагоприятных факторов на усвояемость питательных веществ. В кишечнике также не отмечено влияние на высоту ворсинок и глубину склепа, однако, количество молочнокислых бактерий увеличилось при добавлении 15 % ФПЯ в рацион бройлеров. Таким образом, при добавлении 15 % ФПЯ вместо 30 % жёлтой кукурузы в рацион кормления птиц позволяет снизить затраты на корма в птицеводстве [139].

В работе [140] показано положительное влияние бактерий *Paenibacillus* на рост молочнокислых бактерий за счет образования ксилоолигосахаридов при силосовании кукурузной соломы. При этом в процессе силосования кукурузной соломы штамм *P. panacisoli* SDMCC050309 интенсивно продуцирует как минимум 7 ферментов ксиланаз и другие ферменты, в том числе амилазу и целлюлазу, гидролизующие ксилан с образованием ксилоолигосахаридов, которые используются в качестве пребиотиков для стимулирования роста молочнокислых бактерий *Lactobacillus* и улучшения состояния кишечника.

Оценены иммуномодулирующие эффекты  $\beta$ -глюкана, продуцируемого бактериями *P. polymyxa*, и антиоксидантное влияние аминокислот L-теанина на иммунную систему при добавлении в рацион поросят в периоды отъема.

Исследования проводились на 40 поросятах-отъемышах путем введения в корма 400 мг/кг  $\beta$ -глюкана, 80 мг/кг L-теанина или комбинация  $\beta$ -глюкана с L-теанином указанными расходами. Отмечено, что при добавлении в рацион только  $\beta$ -глюкана или его комбинация с L-теанином позволяет снизить воспалительные реакции грамотрицательной бактериальной инфекции за счет ингибирования противовоспалительного цитокина и усиления синтеза противовоспалительных цитокинов. Помимо положительного влияния на иммунитет поросят-отъемышей, увеличивается среднесуточный прирост массы у всех вариантов по сравнению с контролем [141].

Для снижения инфекционных заболеваний, вызванных патогенными микроорганизмами рр. *Campylobacter* и *Samonela* у животных и птиц, рекомендовано применять препараты бактериоцины, являющиеся специфическими белками, вырабатываемыми некоторыми бактериями, и обладающие антибактериальным действием. Обнаружено совместное продуцирование полимиксина E1 и лантибиотика штаммом *P. polymuxa* OSY-DF [142]. Показано, что внесение очищенного препарата бактериоцина, синтезируемого бактерией *P. polymuxa*, в корма цыплят приводит к резкому снижению патогенной кишечной микрофлоры, уменьшению или предотвращению заражения *Campylobacter jejuni* [143]. Биотериоцин на основе комбинированных бактерий *Bacillus circulans* и *P. polymuxa* при введении в рацион молодняка индеек значительно снижает инфицирование патогенными *Campylobacter coli* до низкого уровня [144]. Кормление бактериоцинами до убоя птицы обеспечит профилактику инфекций патогенными микроорганизмами *Campylobacter*.

### **1.3. Вторичные ресурсы переработки растительного сырья: состав и методы обработки**

#### **1.3.1 Химический состав вторичных ресурсов переработки растительного сырья**

В настоящее время все более актуальным становится использование вторичных ресурсов, образующихся при переработке сельскохозяйственных

растений. Вторичные ресурсы растительного происхождения относятся к побочным продуктам или отходам сельского хозяйства и лесоперерабатывающей промышленности. К этим растительным ресурсам относятся рисовая шелуха, кукурузная кочерыжка, подсолнечная лузга, гузапай (стебли хлопчатника), солома, оболочка какао-бобов, скорлупа кокосовых орехов, кожура фруктов, овощей, капустная и картофельная мезга, опилки, древесное волокно, листья, щепа, ветки, обрезки древесины и др.

Лигноцеллюлоза является основным компонентом растений. Лигноцеллюлоза состоит из целлюлозы (30 – 60 %), гемицеллюлозы (20 – 40 %), лигнина (5 – 25 %), экстрактивных веществ и других неорганических соединений [145]. Целлюлоза (клетчатка) - линейный полисахаридный полимер глюкозы, состоящий из целлобиозных единиц [146]. Цепочки целлюлозы упакованы водородными связями и называются «элементарные микрофибриллы» [147]. Эти фибриллы прикреплены друг к другу гемицеллюлозами, аморфными полимерами различных сахаров, а также другими полимерами, такими как пектин и покрыты лигнином. Микрофибриллы взаимодействуют между собой в пучках или макрофибриллах [146]. Эта специальная и сложная структура делает целлюлозу устойчивой к биологическим и химическим воздействиям. В растительных отходах целлюлоза присутствует совместно с лигнином, пектином, а в хлопке содержание целлюлозы достигает 97 – 99 %, лигнин отсутствует [148].

Доминирующими сахарами в гемицеллюлозах являются манноза в хвойных и ксилоза в лиственных и сельскохозяйственных остатках [149]. Кроме того, эти гетерополимеры содержат галактозу, глюкозу, арабинозу и небольшие количества рамнозы, глюкуроновой кислоты, метилглюкуроновой кислоты и галактуроновой кислоты. В отличие от целлюлозы, которая является кристаллической и прочной, гемицеллюлозы имеют неопределенную аморфную и разветвленную структуру с небольшой устойчивостью к гидролизу и они легче гидролизуются кислотами до мономерных компонентов [145, 150].

Лигнин состоит из фенилпропановых звеньев, связанных в трехмерные структуры. Лигнин является наиболее невосприимчивым компонентом клеточной



стенки растений. Чем выше содержание лигнина, тем выше устойчивость к химической и ферментативной деградации.

При анализе углеродного состава однолетних и многолетних растений установлено, что содержание целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина в однолетних растениях, таких как рис, пшеница, кукуруза и др. выше по сравнению с содержанием в многолетних растениях, таких как лиственные и хвойные породы [151, 152]. Кроме того, показано, что древесина хвойных пород содержит больше лигнина, чем древесина лиственных пород и растительные отходы сельского хозяйства. Существенны химические связи между лигнином, гемицеллюлозой и целлюлозой [153]. Кристаллическая сложная структура целлюлозы, защищенная лигнином и гемицеллюлозой, усложняет деполимеризацию этого природного полимера.

### **1.3.2 Предварительная обработка вторичных ресурсов переработки растительного сырья**

Вторичные ресурсы растительного происхождения с высоким содержанием углерода (лигнин, целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал и пектин) и азота в клетках ткани растений являются перспективным подходом для рентабельного производства различных ценных промышленных продуктов.

Однако, основной проблемой использования отходов и/или побочных продуктов переработки растительного сырья является предварительная обработка лигноцеллюлозной биомассы. С помощью предварительной обработки матрица из целлюлозы и лигнина, связанная гемицеллюлозой, должна быть разрушена, что позволяет уменьшить кристалличность целлюлозы и увеличить содержание фракции аморфной целлюлозы, наиболее подходящей формы для ферментативного гидролиза. Теоретически выход гидролизата целлюлозы после предварительной обработки может достигать 90 % по сравнению с выходом 20 % при отсутствии предварительной обработки [153]. К предварительной обработке лигноцеллюлозы относят физические, физико-химические и биологические

методы, которые улучшают доступность лигноцеллюлозы для ферментативной обработки [154].

К физическим методам обработки лигноцеллюлозы относятся механическое измельчение и пиролиз. За счет сокращения размер частиц механическое измельчение сырья позволяет повысить доступность целлюлозы и снизить степень кристаллизации лигноцеллюлозы. Однако это метод имеет ряд недостатков, в частности, значительные затраты энергии, неспособен удалять лигнин, который ограничивает доступ к ферментации [154].

При применении пиролиза сырья с температурой больше 600 °С со последующим охлаждением и конденсацией можно получить 80 – 85 % редуцирующих сахаров (в том числе, не менее 50 % глюкозы). При пиролизе образуются летучие продукты и остатки полукокса [155].

Для разрыхления древесины тополя, осины, эвкалиптовых и хвойных пород, стебля кукурузы, пшеничной, рисовой, ячменной соломы и др. используют физико-химические методы, в том числе, паровой взрыв. Сырье обрабатывается насыщенным паром при избыточном давлении 0,69 – 4,85 МПа с температурой 160 – 290 °С в течение нескольких секунд или минут, затем декомпрессия давления, в результате происходит деполимеризация целлюлозы, высвобождение гемицеллюлозы до 80 – 100%, выход ксилозы достигает до 45 – 65 %. Паровой взрыв обеспечивает обработку твердого сырья высокой нагрузкой, способствует уменьшению размеров при меньшем потреблении энергии по сравнению с измельчением. Для улучшения эффективности дальнейшего ферментативного гидролиза можно добавлять  $H_2SO_4$ ,  $SO_2$  или  $CO_2$ , однако вследствие этого образуются ингибиторы [154].

Для исправления этого недостатка можно рекомендовать использование взрыва углекислого газа для предобработки сырья, в том числе, жмыха, люцерны, переработанной бумаги. Применение 4 кг  $CO_2$ /кг волокна при избыточном давлении 5,62 МПа позволяет повысить эффективность дальнейшей конверсии целлюлозы больше 75 %. Паровой взрыв или взрыв  $CO_2$  достаточно дорогой метод [154].

Одним из эффективных физико-химических методов предобработки лигноцеллюлозы, который повышает эффективность конверсии целлюлозы до 90 %, является разрушение целлюлозы аммиаком. При этом 1 кг сухого материала обрабатывают 1 кг аммиака при температуре 90 °С в течение 30 мин с последующим резким снижением избыточного давления 1,12 – 1,36 МПа. Этот метод применяется для материала с высоким содержанием лигнина (не более 50 %), обеспечивает солиubilization лигнина до 10 – 20 %, но требует восстановление аммиака до 60 % для гидролиза гемицеллюлозы [154].

Предобработку лигноцеллюлозного сырья горячей водой проводят под давлением более 5 МПа при температуре 170 – 230 °С в течение 1 – 46 мин. Метод эффективен для обработки сырья, содержащего лигнина не более 20 %. Предобработка горячей водой позволяет высвободить до 80 – 100 % гемицеллюлозы, выход ксилозы достигает до 88 – 98 %, конверсия целлюлозы не менее 90 % при отсутствии образования ингибиторов. Отмечено, что метод не эффективен для извлечения лигнина [156, 157].

Предобработка разбавленной кислотой концентрацией 0,75 – 5,00 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$  или  $\text{HNO}_3$  под высокой температурой от 120 до 200 °С и давлении 1 Мпа способствует высвобождению гемицеллюлозы до 80 – 100 %, извлечению ксилозы до 75 – 90 % и дальнейшему гидролизу целлюлозы [156, 157]. Недостатки метода: не эффективен для извлечения лигнина, требует нейтрализацию рН, при которой образуется гипс в виде осадка.

Для усиления окисления лигнина применяется предобработка концентрированной кислотой 10 – 30 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  при температуре 170 – 190 °С с добавлением раствора перуксусной кислоты 21 – 60 % в соотношении с твердым веществом 1,0:1,6, система силосного типа. По сравнению с разбавленным кислотным гидролизом продолжительность обработки этого метода больше и также требует нейтрализацию [154].

Кроме кислотного гидролиза, щелочная предобработка позволяет эффективно удалить 24 – 55 % лигнина из лиственного и хвойного растительного сырья, обеспечить высвобождение гемицеллюлозы более 50 % с выходом ксилозы

60 – 75 % при низком содержании ингибиторов и дальнейшая конверсия целлюлозы может достигать более 65 %. При этом затраты на реактивы ниже, чем при предварительной обработке кислотой [154, 157].

С экологической точки зрения в настоящее время внимание направлено на применение биологических методов с использованием микроорганизмов или ферментативных препаратов для обработки лигноцеллюлозных материалов, таких как кукурузная, пшеничная, рисовая солома, меласса и др. Твердофазная ферментация материалов лигнинолитическими грибами, молочнокислыми бактериями, целлюлолитическими бактериями улучшает пищевую ценность сырья [154, 158]. Кроме того, можно использовать фибролитические ферментные препараты, такие как целлюлаза, целлюло-ксилаза, амилаза, ферменты грибов *Trichoderma viride*, и др. в жидком виде, которые быстро и полностью растворяются в воде, имеют устойчивую, оптимальную активность, термостойкость, длительное хранение, безопасны для окружающей среды [159]. Преимущества биологических методов – экологически чистые процессы, снижение уровня загрязнения. Однако, все биологические процессы идут очень медленно.

Рассматриваемые методы предобработки лигноцеллюлозы имеют свои преимущества и недостатки. Выбор способа предобработки растительного сырья и комплекса ферментативных препаратов зависят от химического состава биомассы растений.

### **1.3.3 Биоконверсия вторичных ресурсов переработки растительного сырья**

Использование вторичных ресурсов переработки растительного сырья в качестве дешевого источника углерода (целлюлозы и гемицеллюлозы) позволит организовать экономически эффективное производство полезных биопрепаратов: ферментов с высокой активностью, белков, аминокислот, органических кислот и др., которые широко применяются в различных отраслях промышленности.

Под воздействием мультиферментативного комплекса целлюлаз происходит превращение целлюлозы в глюкозу. В комплекс ферментов для деполимеризации структуры целлюлозы включают эндоглюканазу, экзоглюканазу, целлобиазу. Эндоглюканаза гидролизует внутренние  $\beta$ -1,4-глюкозидные связи, удаленные от концов полимерной цепи целлюлозы, находящихся в ее аморфных участках, что приводит к снижению степени полимеризации и гидролитической деструкции целлюлозы, образуя короткие волокна целлюлозы и целлоолигосахариды. Экзоглюканаза отщепляет целлобиозу с конца целлоолигосахаарида. Целлобиаза или  $\beta$ -глюкозидаза гидролизует целлобиозу с образованием двух молекул глюкозы, тем самым завершая деполимеризацию целлюлозы [160].

Наиболее изученными продуцентами целлюлазы являются бактерии *Cellvibrio (Pseudomonas) fulvus*, *Pseudomonas fluorescense* [161]; базидиомицеты, *Coniophora cerebella* и *Sporotrichium pulverulentum*; аскомицеты, дейтеромицеты *Trichoderma viride* [162] *T. koningii*, [163], *Penicillium funiculosum* [164] и *Fusarium solani* [165].

Конверсия гемицеллюлозы в сбраживаемые сахара осуществляется гемицеллюлазами с различными каталитическими функциями. К ним относятся эндоксилаказы, экзоксилаказы и  $\beta$ -ксилозидазы наряду с эстеразами с выделением ацетила и феруловых кислотных групп. Эти ферменты демонстрируют значительный синергизм между собой, а также с другими деградирующими ферментами лигноцеллюлозы [166]. Некоторые микроорганизмы, обладающие целлюлитической активностью, также способны разлагать гемицеллюлозу. Известно, что штаммы *Trichoderma* и *Penicillium* обладают высокой гемицеллюлолитической активностью. Кроме того, было показано, что *Aspergillus spp.* также является продуцентом ферментов, разрушающих гемицеллюлозу. Под действием ксиланазы ксилоолигосахариды (КОС) образуются из ксилана и этим можно расширить перечень ценных продуктов, получаемых биоконверсией гемицеллюлоз. Наиболее популярно применение ксилоолигосахаридов в качестве диетических и функциональных

продуктов питания, поскольку они действуют как пребиотики, которые стимулируют рост и/или активность одних или нескольких бактерий в толстой кишке (*Bifidobacterium* и *Lactobacilli*), подавляя активность энтерогнилостных и патогенных организмов, а также облегчают поглощение питательных веществ. Помимо пребиотиков и наполнителей, КОС используются в косметике в качестве стабилизаторов, иммуностимуляторов и антиоксидантов и в фармацевтических препаратах. Предполагается, что эффективное извлечение и преобразование гемицеллюлозных сахаров является важной предпосылкой для разработки экономически целесообразной технологии биоконверсии биомассы [167].

Лигнин может быть деполимеризован до мономеров, которые могут использоваться в качестве предшественников широкого ассортимента продукции, включая топливо. Лигнин может быть выделен из биомассы ферментами микробиологического происхождения, которые превращают лигнин в различные химические вещества. Предварительно хорошо обработанная химическими методами лигноцеллюлоза деградируется ферментами, которые выделяются многими видами бактерий [168], что приводит к биоконверсии этого гетерогенного биополимера в более простые ароматические соединения, такие как фенол и углеводороды, например, циклогексан.

Утилизация лигнина в более ценные продукты еще находится в зачаточном состоянии из-за его сложной структуры. Сжигание лигнина является неэффективным источником энергии и неэкологическим методом для окружающей среды. Лигнин является самым распространенным источником углерода, доступным в природе, и, следовательно, повышение его ценности является необходимым для улучшения экономики конверсии биомассы. Лигнин используется в производстве клеев для древесины, ванилина, коричной кислоты, подсластителей и предшественников синтеза фармацевтических препаратов. Достижения в методах переработки лигнина, как источника ценных продуктов, должны активно продвигаться с учетом экономической целесообразности.

## 1.4 Применение ферментации в производстве биопродуктов

В биотехнологии существуют твердофазная и жидкофазная ферментации. Твердофазная ферментация (ТФФ) – метод культивирования микроорганизмов на твердых, влажных субстратах в отсутствие свободной влаги [169]. Это трехфазный гетерогенный процесс, включающий твердые, жидкие и газообразные фазы, что является большим преимуществом для микробных биологических процессов при получении биопродуктов [170]. Микроорганизмы, такие как грибы и дрожжи с низкими требованиями к активности воды ( $a_w = 0,5 - 0,6$ ), лучше приспособлены для ТФФ. Однако, бактерии с высокими требованиями к активности воды ( $a_w = 0,8 - 0,9$ ), как правило, менее пригодны для ТФФ. ТФФ в основном используется в пищевой промышленности и производстве ферментов с использованием мицелиальных микроорганизмов, таких как грибы. В процессе ТФФ почти отсутствует свободная вода, однако субстрат должен содержать достаточное количество влаги, чтобы поддерживать рост и метаболизм микроорганизмов [171, 172].

ТФФ микроорганизмов на субстратах из сельскохозяйственных отходов используют для синтеза ферментов, таких как  $\alpha$ -амилаза и фруктозилтрансфераза, которые широко применяют в пищевой промышленности: выпечка, пивоварение, приготовление пищеварительных добавок, производство уксуса, фруктовых соков, крахмальных сиропов и т. д. [171, 173]. Установлено, что использование пшеничных отрубей в качестве субстрата позволяет микроорганизмам максимально продуцировать ферменты для производства напитков в промышленных условиях [174, 175].

Недостатки ТФФ: трудно контролировать параметры процесса, такие как температура в лотковых реакторах, сложно выделять конечные продукты, длительный процесс культивирования. Поэтому ТФФ экономически не пригодна для культивирования микроорганизмов.

Жидкофазная ферментация (ЖФФ) - метод выращивания микроорганизмов в жидкой среде, которая интенсивно аэрируется кислородом, чем в основном и

отличается от ТФФ. В ЖФФ используются жидкие субстраты, такие как меласса и бульоны для достижения довольно быстрого процесса ферментации. Бактерии, которые требуют значительное содержание влаги для их роста, более приспособлены для ЖФФ [176]. Выбор субстратов чрезвычайно важен, так как разные микроорганизмы специфично реагируют на каждый субстрат, что определяет скорость роста и накопление биомассы. В ЖФФ микроорганизмы могут расти на поверхности среды (поверхностная ферментация) или во всем объеме жидкости (глубинная ферментация). В качестве субстрата можно использовать растворимые ксилан, пектин, маннан или нерастворимые пшеничные и рисовые отруби, пшеничную солому, которые суспензированы в жидких средах. Путем ЖФФ *Bacillus cereus* синтезирует целлюлазу с использованием кукурузной соломы, являющейся сельскохозяйственным отходом, в качестве основного субстрата [177]. В работе [178] показано, что ЖФФ позволяет *Aspergillus sojae* продуцировать большое количество фермента экзополигалактуроназы с использованием апельсиновой корки в качестве субстрата.

В течение последних нескольких лет ЖФФ имеет огромное значение для производства ферментов и вторичных метаболитов в промышленном масштабе, благодаря строгому контролю параметров ферментации, высокой производительности и простоте последующей обработки культуральной жидкости и биомассы [179].

### **1.5 Влияние условий культивирования на рост и продуцирование метаболитов ризобактерий рода *Paenibacillus***

Микробные метаболиты – это низкомолекулярные соединения (молекулярная масса менее 1000 дальтон), образующиеся в результате обмена веществ в организме. В процессе нормальной жизнедеятельности бактерии синтезируют вещества, необходимые для роста микроорганизмов, называемые первичными метаболитами. К ним относятся аминокислоты, органические кислоты, нуклеотиды, витамины, ферменты и др. В отличие от первичных



метаболизм вторичные метаболиты не требуются для нормального роста и развития продуцента [180]. Они играют важную роль в улучшение поглощения доступных питательных веществ в клетки или защиты продуцента от неблагоприятных факторов [181]. Среди наиболее важных для промышленности вторичных метаболитов ризобактерий можно выделить антибиотики, ЭПС, фитогормоны и т.д.

На продуцирование метаболитов оказывает влияние условия культивирования продуцентов. В зависимости от условий окружающей среды образуются различные продукты по разным метаболическим путям [182]. К факторам окружающей среды, оказывающим влияние на продуцирование метаболитов микроорганизмами, относятся источники углерода и азота, их концентрация, макро-, микроэлементы, температура, pH среды, качество и количество посевного материала и др. [183]. Для эффективности роста и максимального синтеза метаболитов необходимо оптимизировать параметры культивирования продуцентов и важно, чтобы эти параметры окружающей среды оставались стабильными [182].

**Источник углерода.** К источникам углерода относятся углеводы, органические кислоты, многоатомные спирты и др. Углеводы являются наиболее важным питательным веществом и источником энергии для роста клеток. При этом синтез вторичных метаболитов при использовании различных источников углерода идет разными путями [180]. При избытке углеводов в среде или при неблагоприятных условиях для роста продуцента происходит синтез микробных полисахаридов, являющихся вторичными метаболитами. Синтез ЭПС бактериями рода *Paenibacillus* начинается с логарифмической фазы и достигает максимума в позднюю стационарную фазу роста бактерий [184]. Наиболее часто используемыми источниками углерода для синтеза ЭПС являются сахара, в частности, глюкоза и сахароза [185-188]. Так, показано, что сахароза является наилучшим субстратом для синтеза ЭПС штаммами *P. polymyxa* (ранее *B. polymyxa*) КСТС 8648Р [184], *P. polymyxa* EJS-3 [186], *P. elgii* B69 [187], *P. polymyxa* JB115 [185]. Внесение сахарозы в среду приводит к высоким выходам

ЭПС левана [186]. Выделение левансукказы вместе с  $\beta$ -фруктофуранозидазами и инуло-сукказой с высокой активностью большинства штаммов *P. polymyxa* для гидролиза сахарозы, способно обеспечить получение высокого выхода ЭПС [184]. Однако высокая стоимость этих источников углерода имеет прямое влияние на себестоимость продукции, что ограничивает рыночный потенциал этих биополимеров. Поэтому в промышленных условиях для снижения затрат на производство ЭПС вместо этих дорогих субстратов предлагали использовать отходы или побочные продукты различных отраслей [189].

Показано перспективное использование вторичных ресурсов, в том числе, порошок хорды кальмара (ПХК) в качестве единственного источника углерода и азота для продуцирования ЭПС и антиоксидантов штаммом *Paenibacillus sp.* TKU023. Культивирование на питательной среде, содержащей 1,5 % ПХК, в оптимальных условиях обеспечивало получение высокой продуктивности ЭПС (4,55 г/л). Кроме того, проведение культивирования в колбах с перегородками показал, что после четырех дней культивирования культуральная жидкость содержит высокую концентрацию фенола с высокой антиоксидантной активностью [190].

Побочный продукт сахарного производства – меласса – является одним из наиболее доступных, эффективных углеводных субстратов в России. В мелассе присутствует значительное количество сахарозы (около 50 %), которая используется для синтеза ЭПС бактериями рода *Paenibacillus* [191]. Было обнаружено, что меласса служит наиболее эффективным субстратом для синтеза ЭПС бактериями *P. ehimensis* 739 [192], *P. mucilaginosus* PM13 [193] и *P. mucilaginosus* (ранее *B. mucilaginosus*) ВКМ В 1446Д [194]. Исследование [194] показало, что при содержании в питательной среде 16 % мелассы максимальный выход ЭПС достигает 2,83 г/л, что в 1,6 раза больше по сравнению с выходом на питательной среде, приготовленной на основе сахарозы (1,82 гЭПС/л).

Мелассу свекловичного жома также рекомендуется использовать в питательных средах в концентрации 2 % при культивировании штамма *P. chitinolyticus* SKS1 для синтеза  $\beta$ -амилазы. Указывается на целесообразность

использования в качестве источника сахаров свекловичного жома, который предварительно обрабатывают гидроксидом натрия [195]. Предобработка свекловичного жома щёлочью позволяет разрушить кристаллическую структуру клетчатки, растворить лигнин и последующей промывкой водой разделить клетчатку и лигнин, что обеспечивает эффективность ферментативного гидролиза клетчатки микроорганизмами [196]. Максимальная активность  $\beta$ -амилазы может достигать 2,24 ед/мл при внесении 3 % свекловичного жома и 10 % инокулята в среде после 83 ч культивирования этого продуцента. Обнаружен синтез  $\beta$ -амилазы *P. amylolyticus* путем твердой ферментации на питательной среде, приготовленной на основе пшеничных отрубей [197] и *P. polymyxa* NRRL B-367 на солевой среде, приготовленной на основе кукурузного крахмала с внесением минеральных добавок [198].

Кроме получения  $\beta$ -амилазы, свекловичный жом, который предварительно обработан гидроксидом натрия, перспективно использовать для синтеза ксиланазы штаммами бактерий *Paenibacillus* AR489 и AR247. При культивировании этого штамма на питательной среде, содержащей 1 % обработанного свекловичного жома в течение 96 ч, синтезируется ксиланаза, активность которой достигает 1,7 ед/мл [199]. Упоминается, что для синтеза ксиланазы экономически целесообразно использовать в качестве сырья для подготовки питательной среды при культивировании штамма *P. campinasensis* BL11, рисовую шелуху и солому [200], ксилан, выделенный из березы, при культивировании штамма *Paenibacillus* sp. DG 22 [201] и другие побочные продукты. Наилучшим источником углерода для синтеза глюкоамилазы штаммом *P. amylolyticus* NEO03 являются рисовые отруби [202].

**Источник азота.** Как известно, на синтез продуктов метаболизма микроорганизмами влияют источники азота. В качестве источника азота применяют как неорганические соли, так и органические вещества. Lee и соавторы [184] показали, что наилучшим источником азота для синтеза ЭПС штаммом *P. polymyxa* КСТС 8648Р являются неорганические нитратные соли, в том числе нитрат натрия. Известно, что соли аммония повышают скорость роста,

улучшают экспрессию белка путем ассимиляции связанных форм аммония с участием ферментов [204]. С применением неорганической соли  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  максимально синтезировалась ксиланаза (48,0 ед/мл) штаммом *Paenibacillus* sp. N1 [203]. Наблюдалась максимальная активность целлюлазы, синтезируемой штаммом *P. terrae* ME27-1, при использовании  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в качестве единственного источника азота с оптимальной концентрацией 3 г/л [204].

По сравнению с результатами применения неорганических источников азота обнаружено, что для роста и продуцирования метаболитов с применением органических источников азота наблюдается лучший эффект. Дрожжевой экстракт является наилучшим источником азота для роста и синтеза ЭПС штаммами *P. polymyxa* EJS-3 [186], *Paenibacillus* sp. NBR-10 [205], *P. polymyxa* ATCC 21830 [185], *P. polymyxa* SQR-21 [206], для синтеза ксиланазы штаммом *Paenibacillus* sp. DG 22 [201], глюкоамилазы штаммом *P. amylolyticus* NEO03 [202]. Это связано с содержанием в нем белков, аминокислот и витаминов, способствующих росту и их метаболизму. Максимальная активность ксиланазы, синтезируемой штаммом *P. campinasensis* BL11, наблюдалась при использовании казеина в качестве источника азота [200]. Для синтеза арабинофуранозидазы штаммом *P. polymyxa* KF-1 целесообразно применять соевый шрот как недорогой и эффективной источник азота (14,72 ед/мл) [207].

**рН среды.** Значение рН среды является важным фактором, который может влиять на клеточную мембрану, морфологию и структуру бактерий, а также на усвоение различных питательных веществ и биосинтез метаболитов. Оптимальное значение рН для синтеза метаболитических продуктов бактериями *Paenibacillus spp.* находится в диапазоне от 6,5 до 7,2 [185, 190, 207]. Rafiqh и соавторы [185] обнаружили, что во время культивирования с увеличением значения рН среды с 5,5 до 7,0 наблюдалось увеличение количества синтезируемого ЭПС курдлана и биомассы на 39,3 % и 4,8 %, соответственно. Однако высокие значения рН среды (больше 8,5) вызывали снижение синтеза ЭПС этими продуцентами. Обнаружено, что рН среды около 7,0 является оптимальным значением не только для роста и синтеза ЭПС штаммами *P. polymyxa*

КСТС 8648P [184], *Paenibacillus sp.* TKU023 [190], *Paenibacillus sp.* NBR-10 [205], *P. mucilaginosus* TKU032 [208], но и для синтеза ферментов целлюлазы штаммом *Paenibacillus sp.*, выделенным из мелассы [209], ксиланазы штаммами *P. campinasensis* BL11 [200], *Paenibacillus sp.* AR247 [199], арабинофуранозидазы штаммом *P. polymyxa* KF-1 [207], глюкоамилазы штаммом *P. amylolyticus* NEO03 [202]. Однако, некоторые штаммы бактерий рода *Paenibacillus* лучше продуцируют продукты метаболизма в слабощелочной среде. Liu и соавторы [187] показали максимальное количество синтезируемых ЭПС было достигнуто при pH среды 8 после 60 ч культивирования, по-видимому, это связано со специфическим свойством эпифитных бактерий *P. polymyxa* EJS-3, выделенных из корневых тканей *Stemona japonica* (Blume) Miquel, которые используют в традиционной китайской медицине.

**Температура культивирования.** Отмечено влияние температуры культивирования на рост и синтез метаболитических продуктов бактерий *Paenibacillus*. Rafigh и соавторы [185] показали, что с ростом температуры от 30 до 40 °C выход ЭПС курдлана интенсивно увеличивался, при дальнейшем увеличении температуры от 40 до 50 °C выход ЭПС курдлана слегка повышался. Синтез ЭПС курдлана тормозился при температуре 25 °C или выше 50 °C. Оптимальной температурой для синтеза курдлана штаммом *Paenibacillus sp.* NBR-10 является 35 °C [205]. Liu и соавторы [186] показали, что у штаммов *P. polymyxa* EJS-3 оптимальными температурами для роста и синтеза ЭПС являются 27 °C и 24 °C, соответственно. По сравнению с штаммом *Paenibacillus sp.* NBR-10, *P. polymyxa* EJS-3 лучше синтезирует ЭПС при более низкой температуре.

Целлюлаза лучше синтезируется при температуре 40 °C штаммом *Paenibacillus sp.*, выделенным из мелассы. Температура 37 °C является оптимальной для синтеза ксиланазы штаммом *P. campinasensis* BL11 (11,2 ед/мл) [200] и глюкоамилазы штаммом *P. amylolyticus* NEO03 (242,62 ед/мл) [202]. Синтез ксиланазы уменьшался при снижении температуры культивирования этих бактерий до 25 °C. Максимальная активность арабинофуранозидазы наблюдалась

при температуре культивирования штамма *P. polymyxa* KF-1 33 °C и снижалась при повышении температуры до 38 °C [207].

**Аэрация.** Кроме описанных выше факторов, аэрация тоже играет важную роль в жизнедеятельности и продуцировании метаболитов *Paenibacillus spp.* [185, 190]. Установлено, что с уменьшением объема среды концентрация растворенного кислорода повышается при постоянной скорости перемешивания. В связи с этим рекомендуются в экспериментальных условиях при культивировании штамма *Paenibacillus sp.* TKU023 аэрацию среды проводит при соотношении объема воздуха к объему среды 4,0:1,0 [190] и при культивировании штамма *P. macerans* TKU029 - 1,5:1,0 [209]. Показано, что при условии интенсивной аэрации бактерии *Paenibacillus* быстро растут и значительно синтезируют метаболиты. Многие исследователи утверждают, что перемешивание обеспечит улучшение роста и метаболизма микроорганизмов за счет интенсификации массопереноса кислорода по отношению к субстратам и продуктам [210]. Установлено, что с увеличением скорости перемешивания со 120 до 150 об/мин рост и синтез ЭПС и других метаболитов значительно улучшаются. При перемешивании со скоростью 150 об/мин наблюдался максимальный синтез ЭПС штаммами *P. polymyxa* ATCC 21830 [185] и *Paenibacillus sp.* TKU023 [190] и также максимальное продуцирование целлюлазы штаммом *Paenibacillus sp.* SKS1 [211]. При скорости перемешивания ниже 120 об/мин выход ЭПС штамма *P. polymyxa* ATCC 21830 уменьшается [185] и при скорости перемешивания ниже 50 об/мин синтез ЭПС штаммом *Paenibacillus sp.* TKU023 не происходит [190], по-видимому, это связано с ограничением переноса кислорода. При скорости перемешивания 180 об/мин и выше происходит бактериальная фрагментация, что снижает выход биомассы и ЭПС курдлана штамма *P. polymyxa* ATCC 21830 [185]. Однако некоторые штаммы могут синтезировать ЭПС при перемешивании со скоростью выше 180 об/мин, например, штамм *P. elgii* B69 (220 об/мин) [187] и штамм *P. polymyxa* EJS-3 (200 об/мин) [186].

### Заключение по обзору литературы

Анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что ризобактерии, в том числе рода *Paenibacillus*, способны фиксировать атмосферный азот, синтезировать фитогормоны, антибиотики, ферменты, превращать неорганические фосфаты в доступные формы для растений, в результате чего стимулируется рост растений и защита их от болезней и других неблагоприятных факторов. В связи с этим в растениеводстве используют эти бактерии в качестве как биоудобрения, так и биопестицидов и фитостимуляторов для сельскохозяйственных растений, а также в животноводстве в качестве кормовых добавок для животных [212]. Для повышения эффективности применения возможно использовать комбинированные биопрепараты сельскохозяйственного назначения.

Для решения экологических и экономических проблем в производстве биопродуктов на основе бактерий рода *Paenibacillus* в качестве сырьевого источника для приготовления питательных сред возможно использовать вторичные ресурсы переработки растительного сырья. Для ферментативного гидролиза этого сырья с прочной структурой необходимо подбирать метод предварительной обработки в зависимости от их состава.

Помимо источника углерода к наиболее значимым факторам, влияющим на метаболизм исследуемых бактерий, относятся: источник азота, рН среды, температура культивирования, аэрация питательной среды. Интенсификация роста и синтеза метаболитов путем глубинного культивирования бактерий рода *Paenibacillus* с регулированием этих факторов перспективно для создания технологии разработки биопродуктов сельскохозяйственного назначения [213].

## ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Материалы, использованные в исследовании

В работе использовали следующее сырьё:

Рисовая шелуха, полученная при переработке риса сорта рапан белый (ООО ПФ Радуга, Краснодарский край). Состав рисовой шелухи: 1,81 % сырого белка, 0,39 % сырого жира, 24,81 % безазотистых экстрактивных веществ, 38,71 % целлюлозы, 18,94 % гемицеллюлозы, 13,17 % золы, 19,40 % лигнин, влажность 11,65 %. Удельная поверхность, определенная методом БЭТ, 0,30 м<sup>2</sup>/г.

Меласса свекловичная по ГОСТ Р 52304-2005, предназначенная для производства этилового спирта из пищевого сырья, пищевой лимонной кислоты, хлебопекарных, кормовых дрожжей и для использования в корм сельскохозяйственным животным. Мелассу предоставил Заинский сахарный завод (Республика Татарстан). Массовая доля сухих веществ в мелассе 75,0 %, массовая доля сахара при прямой поляризации 44,0 %, массовая доля РВ 4,9 %, массовая доля суммы сбраживаемых сахаров 47,0 %, массовая доля солей кальция в пересчете на СаО 1,4 %, рН 6,5.

### 2.2 Культуры бактерий, использованные в исследовании

В работе использованы штаммы бактерий *P. mucilaginosus*: 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 и *P. salinicaeni* 17-6, предоставленных Ведомственной коллекцией непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург).

### 2.3 Определение морфологии и размера бактерий

Клетки окрашивали по Грамму, используя стандартную методику [214]. Микроскопирование клеток проводили на видеомикроскопе МС 100 LCD РС (фирма Micros, Austria) после 72 ч инкубирования при температуре 30 ± 1 °С на питательной среде с агаром. Размеры бактериальных клеток определялись с



использованием программы Fiji. При обработке результатов измерения 60 пикселей на изображении соответствовали 10 мкм [83].

## **2.4 Обработка вторичных ресурсов переработки растительного сырья для приготовления питательных сред**

### **2.4.1 Получение ксилана из древесины березы**

Ксилан получали из щепы березы (*Betula pendula*) экстрагированием под давлением горячей водой (максимум 150 °С) в бескислородной среде. Из водного экстракта ксилан осаждали при интенсивном перемешивании в смеси этанол: вода (85 : 15 v/v) и оставляли на 12 ч для его полной коагуляции. После декантирования осажденный ксилан фильтровали на бумажном фильтре (Black ribbon) под вакуумом водоструйного насоса и промывали тремя объемами этанола для удаления воды и низкомолекулярных продуктов из древесины. Полученный ксилан сушили в вакуумном шкафу при температуре 40 °С в течение 48 ч [215].

### **2.4.2 Технологическая схема комплексной переработки рисовой шелухи**

Схема комплексной переработки рисовой шелухи для приготовления питательной среды представлена на рисунке 2.1.

Для отделения оксида кремния от рисовой шелухи использовали растворы NaOH с концентрацией 2,5, 5,0 и 10,0 %, гидромодуль обработки составил 1:8, температура  $120 \pm 1$  °С, продолжительность обработки 20 мин. Щелок, содержащий оксид кремния, отделялся от клетчатки отжимом и дальнейшим промыванием водопроводной водой. Промывку клетчатки водой заканчивали до нейтральной реакции.

Ферментативный гидролиз клетчатки рисовой шелухи осуществляли с использованием ферментных препаратов Accellerase XY и Accellerase 1500, содержащие целлюлазы и гемицеллюлазы, полученные при глубинном культивировании гриба *Trichoderma reesei* (компания Dupon, USA). В соответствии с рекомендациями расход ферментов Accellerase в экспериментах составил  $0,20 \pm$

0,05 мл на 1 грамм абсолютного сухого вещества (АСВ) клетчатки (активность Accellerase XY 20000 – 30000 АВХУ/г, активность Accellerase 1500 2200 – 2800 СМС/г). Ферментативный гидролиз проводили при pH 5,0 - 5,5 в ацетатном буфере при температуре  $50 \pm 1$  °С и непрерывном перемешивании со скоростью 130 об/мин в течение 24 ч на шейкере инкубаторе IST-3075R (производитель Jeiotech, Korea). Ферментолитат концентрировали выпариванием и определяли содержание РВ [216].

Для культивирования бактерий приготавливали питательную среду, содержащую 0,5 % по РВ ферментолита, полученного по ниже представленной технологической схеме.



Рисунок 2.1 – Технологическая схема комплексной переработки рисовой шелухи с получением биопродукта

Для полной утилизации рисовой шелухи твердую часть клетчатки после ферментативного гидролиза высушили до постоянной массы, стерилизовали и

далее применили в качестве носителя для получения кормовой добавки. Применение шрот клетчатки рисовой шелухи возможно в производстве бумаги и картона [217].

## **2.5 Определение минеральных веществ в щелоке и состава клетчатки рисовой шелухи**

В щелоке после щелочной обработки рисовой шелухи (рис. 2.1\*) определяли минеральные вещества рентгенофлуоресцентным методом (РФА). С помощью автоматической микропипетки последовательно отбирали 10 мкл раствора образца и помещали на специальную закрепленную в кювете пленку для РФА с внешней стороны. Далее каплю высушивали с помощью теплого воздушного потока по методике, изложенной в работе [218]. После высушивания образец анализировали на рентгенофлуоресцентном спектрометре марки Clever в вакуумной среде. Параметры рентгеновской трубки с анодом из молибдена:  $E = 45$  кВ,  $I = 200$  мкА, площадь облучения  $36$  мм<sup>2</sup>. Время измерения каждого образца составляло 50 с. Расчет концентраций производится по методу фундаментальных параметров с учетом поправок по данным спектров эталонных образцов.

Анализ клетчатки рисовой шелухи после выделения диоксида кремния проводили по методикам: содержание целлюлозы (по Кюшнеру), содержание гемицеллюлозы (ГОСТ 9002), содержание лигнина (ГОСТ 11960), удельная площадь поверхности (метод БЭТ).

## **2.6 Определение состава ферментолизата клетчатки рисовой шелухи**

Состав ферментолизата рисовой шелухи определяли методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) триметилсилильных производных [219]. Подготовка пробы: экстракт образца обрабатывали 50 % этанолом (1:15 вес/объем), высушивали в вакууме при температуре  $38 \pm 1$  °С, далее обрабатывали 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисилазаном в смеси с 1 мл пиридина и 1 мл ацетонитрила в присутствии трифторуксусной кислоты при  $60 \pm 1$  °С в течение 1 ч. Полученный раствор помещали в пробозадатчик хроматографа. Условия анализа: колонка

SBP5-25 (25 м x 0,25 мм x 0,2 мкм), газ-носитель N<sub>2</sub>, 20 мл/с, программа температур – 1 мин при 70 °С, подъем 4 °С/мин до 320 °С, 5 мин при 320 °С, температура ввода пробы 240 °С, делитель потока 1 : 20, объем пробы 2 мкл (автоматический пробозадатчик АОС-20i); детектор пламенно-ионизационный, температура 325 °С, скорость подачи водорода 40 мл/мин, азота 25 мл/мин, кислорода 250 мл/мин. Отнесение пиков осуществляли по времени удерживания после серии калибровочных анализов модельных смесей заданного состава. Расчет содержания компонентов по усредненной площади пиков проводили после калибровки по внешнему стандарту.

## 2.7 Приготовление питательных сред для культивирования бактерий

Музейные культуры хранились на плотной питательной среде Эшби без азота следующего состава (%): сахароза – 2,00, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O – 0,02, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,02, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,02, CaCO<sub>3</sub> – 0,50, агар – 2,00. На этой среде культуры хранились до 6 месяцев [220].

Глубинное культивирование культуры осуществляли на жидкой питательной среде Александра следующего состава (%): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O – 0,20, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,05, CaCO<sub>3</sub> – 0,01, NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> – 0,02-0,40, дрожжевой экстракт – 0,10 [221, 222].

В качестве источника углеводов использовались моносахариды (глюкоза (ГОСТ 6038-79), фруктоза (ТУ 6-09-1979-72), дисахариды (сахароза ГОСТ 5833-75) и олигосахариды (экстракт ксилана из бука – компания Cath Roth, Germany).

В качестве источника углерода были использованы вторичные ресурсы переработки растительного сырья, такие как ферментолитат клетчатки рисовой шелухи, экстракт ксилана, выделенного из березы, меласса свекловичная.

Стерилизация питательных сред проводилась в автоклаве при 120 ± 1 °С в течение 20 минут.

Глубинное культивирование бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* проводилось в колбах Эрленмейера объемом 100 – 250 мл при температуре культивирования от 25 до 35 °С при непрерывном перемешивании со скоростью

150 – 220 об/мин на шейкере инкубатора IST-3075R (производитель Jeiotech, Korea) в течение 3 суток. Колбы засеивали от 5 до 10 % инокулятом от объема питательной среды.

## **2.8 Определение содержания редуцирующих веществ в питательной среде и культуральной жидкости**

Определение редуцирующих веществ (РВ) в питательной среде и культуральной жидкости проводили по методике, приведенной в работе [216].

К 120 мкл исследуемой пробы добавляли 1200 мкл дистиллированной воды и 600 мкл 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНСК-реагент). Выдерживали пробы 10 минут при 100 °С, затем 5 мин. при 0 °С. Далее добавляли во все пробы по 6 мл дистиллированной воды и измеряли оптическую плотность при длине волны 540 нм в кювете шириной 5 мм. В контрольный опыт вместо пробы добавляли 120 мкл дистиллированной воды. Содержание РВ в каждом образце определялось по калибровочному графику стандартного раствора глюкозы в диапазоне от 2 до 10 г/л.

Определяли начальное содержание РВ в питательной среде и содержание РВ после кислотной инверсии углеводов. Для этого проводили гидролиз всех углеводов питательной среды в закрытых пробирках концентрированной серной кислотой при рН 1-2 в течение 10 мин.

## **2.9 Определение азотфиксирующей способности**

Азотфиксирующую способность бактерий определяли косвенно по количеству синтезируемой биомассы на безазотистой питательной среде и накоплению общего азота в культуральной жидкости. Содержание общего азота определяли в супернатанте, полученном после центрифугирования 15000 об/мин в течение 15 мин, с применением реактива Несслера по методике [223] и построением калибровочного графика при использовании раствора серно – кислого аммония концентрацией 0,5 мг/мл в качестве стандарта.

Содержание азота в исследуемой пробе определялось по уравнению (2.1):

$$y = 58,48 \cdot x - 0,16 \quad (2.1)$$

где  $y$  – содержание азота в исследуемой пробе, мкг/мл,  $x$  – оптическая плотность.

Коэффициент корреляции  $R^2 = 0,9993$

## 2.10 Определение калиймобилизующей и фосфатсолобилизующей активностей бактерий

Для определения калиймобилизующих и фосфатсолобилизующих активностей исследуемые штаммы бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* выращивали на жидкой питательной среде Александра следующего состава (%): сахара – 1,00,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,05,  $CaCO_3$  – 0,01, слюда – 0,20,  $Ca_3(PO_4)_2$  – 0,20 [221, 222].

По окончании культивирования пробу центрифугировали на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5418R в течение 15 мин при скорости вращения 15000 об/мин. В полученном супернатанте количество растворенного фосфора определяли методом Грайнера [224], основанным на измерении интенсивности окраски молибденового комплекса при длине волны 355 нм в кювете шириной 5 мм на спектрофотометре ПЭ-5300ВИ (ООО «Экросхим», Россия). Содержание фосфора в образце определялось по калибровочному графику с использованием 5 мкмоль/мл раствора  $Na_3PO_4$  в качестве стандарта и рассчитывалось по уравнению (2.2):

$$y = 8,08 \cdot x + 1,13 \quad (2.2)$$

где  $y$  – содержание фосфора в исследуемой пробе, мкг/мл,  $x$  – оптическая плотность. Коэффициент корреляции  $R^2 = 0,9927$

Количественное содержание калия в среде определяли на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой iCAP 6300 DUO (фирма Thermo Scientific, USA). Стандартные калибровочные растворы готовили смешиванием и разбавлением стандартного образца, содержащего 10 г/л калия, в деионизированной воде, подкисленной 0,5 %  $HNO_3$  и 1,0 %  $HCl$ . Последовательно построение градуировочного графика, связывающего содержание аналита в плазме с инструментальным откликом, линейны в интервале пяти порядков величины концентрации. Выбор спектральных линий обуславливался максимальной интенсивностью, малыми шумами и отсутствием спектральных наложений. Стандартизация проводилась с помощью изготовленных стандартов по 3 точкам, соответствующим концентрациям 0, 2,5 и 10,0 мг/л. Содержание калия в пробе

определяли при длине волны 766,49 нм с помощью детектора нового поколения CID86 с разрешением 0,007 нм в течение нескольких секунд. Относительная ошибка измерений, состоящая из случайных ошибок при разбавлении образцов, стандартов и ошибки прибора, не превышает 10 % [225, 226].

### **2.11 Определение концентрации индолилуксусной кислоты в культуральной жидкости**

Концентрация индолилуксусной кислоты (ИУК), синтезированной штаммами бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательной среде с добавлением 0,1 % L-триптофана, определяли методом, описанным в работе [227]. Культуральную жидкость отбирали через 24, 48 и 72 ч культивирования и отделяли клетки центрифугированием при 15000 об/мин в течение 15 минут. Далее в 1 мл полученного супернатанта вносили 1 мл реагента Сальковского (1 мл 0,5 М FeCl<sub>3</sub> в 50 мл 35 % HClO<sub>4</sub>) с последующим добавлением двух капель ортофосфорной кислоты. Пробу выдерживали в темноте при 37 ± 1 °С в течение 30 мин до появления розового цвета. Оптическая плотность раствора измерялась на спектрофотометре при длине волны 535 нм. Концентрация ИУК в пробах определялась по калибровочному графику с использованием 100 мкг/мл раствора ИУК в качестве стандарта. Содержание ИУК в исследуемой пробе определялось по уравнению (2.3):

$$y = 121,44 \cdot x + 2,32 \quad (2.3)$$

где  $y$  – содержание ИУК в исследуемой пробе, мкг/мл,  $x$  – оптическая плотность. Коэффициент корреляции  $R^2 = 0,9982$

### **2.12 Определение характеристик роста бактерий**

Рост исследуемых бактерий оценивали по кинетическим показателям, таким как удельная скорость роста и время генерации, которые рассчитывали согласно рекомендациям в работе [228].

Подсчет количества бактериальных клеток в культуральной жидкости определяли косвенным методом – турбидиметрией. Оптическую плотность культуральной жидкости определяли на спектрофотометре при длине волны 540

нм ( $OD_{540}$ ) с использованием кюветы шириной 5 мм. Подсчет выросших колоний проводили на чашках Петри с десятикратными разведениями культуральной жидкости.

Биомассу отделяли центрифугированием на лабораторной центрифуге Eppendorf Centrifuge 5418R (фирма Eppendorf, Germany) при 15000 об/мин в течение 15 минут при температуре  $5 \pm 1$  °С. Биомассу бактерий определяли гравиметрическим методом после высушивания на влагомере «МХ-50» (компания AND, Japan).

Водородный показатель в культуральной жидкости определяли потенциометрически на рН метре 150 МИ.

### **2.13 Метод определения и выделения экзополисахаридов**

О синтезе ЭПС можно судить косвенно по значению вязкости культуральной жидкости. Вязкость культуральной жидкости определяли на вискозиметре Vibro SV-10A (компания AND, Japan).

Содержание полисахаридов определяли двумя методами.

Первый метод. Полисахариды отделяли центрифугированием на лабораторной центрифуге Eppendorf Centrifuge 5418R (фирма Eppendorf, Germany) при 15000 об/мин в течение 10 минут при температуре  $5 \pm 1$  °С. Выделение и очистку ЭПС проводили путем осаждения трехкратным объемом изопропанола и пробу выдерживали при температуре  $4 \pm 1$  °С в течение 24 ч. Затем осадок отделяли центрифугированием и определяли массу гравиметрическим методом после высушивания в термостате при температуре  $105 \pm 1$  °С до постоянной массы.

Второй метод. После центрифугирования количество ЭПС определяли по количеству РВ, образующихся при их гидролизе 2 н соляной кислотой при кипячении в течение 30 мин на водяной бане.

### **2.14 Определение ферментативной активности бактерий**

-  *$\beta$ -фруктофуранозидазную активность* определяли в трех повторностях по количеству образовавшегося РВ при гидролизе сахарозы [229].



- *Определение ксиланазной и целлюлазной активностей* проводили в трех повторностях методом, основанным на определении содержания РВ, образовавшихся при ферментативном гидролизе Na-КМЦ 1 % (1 г Na-КМЦ в 100 мл ацетатного буфера, рН 6) и ксилана 1 % (1 грамм ксилана в 100 мл ацетатного буфера, рН 6) [230, 231].

- *Определение целлюбиазной активности* проводили в трех повторностях, используя в качестве субстрата раствор 0,2 % целлюбиозы (0,2 г целлюбиозы в 100 мл ацетатного буфера, рН 6), с последующим определением РВ. Расчеты активности проводили по формуле, приведенной в работе [229].

Указанные выше ферментативные активности оценивали по количеству образовавшихся РВ. Методика определения активности ферментов следующая: к 1,20 мл субстрата добавляли 0,12 мл супернатанта, затем инкубировали в термостате в течение 60 мин при температуре  $50 \pm 1$  °С (для целлюлазы и ксиланазы) и  $30 \pm 1$  °С (для  $\beta$ -фруктофуранозидазы и целлюбиозы), затем добавляли 0,60 мл ДНСК-реагента. В контрольном опыте 1,20 мл субстрата смешивали с 0,60 мл ДНСК-реагентом и 0,12 мл супернатанта без инкубации. Опытные и контрольные пробирки с субстратом, культуральной жидкостью и ДНСК-реагентом помещали на водяную баню, жидкость доводили до кипения и выдерживали 10 мин. Затем охлаждали, добавляли 6 мл дистиллированной воды и измеряли оптическую плотность при длине волны 540 нм. За единицу активности фермента ( $\beta$ -фруктофуранозидазы, целлюлазы, целлюбиозы и ксиланазы) принимается такое количество фермента, под воздействием которого в принятых условиях рН и температуры, за 60 мин проходит гидролиз до моносахаров 1 г субстрата.

- *Определение фитазной активности.* Определение содержания свободных фосфатов с образованием фосфорномолибденовокислого аммония проводилось по методу Грайнера [224]. Реакционная смесь содержала 100 мкл 10 мМ фитата натрия, 250 мкл 100 мМ Na-ацетатного буфера, рН 4,5, 50 мкл супернатанта, полученного центрифугированием культуральной жидкости, содержащего фермент. Смесь инкубировали в течении 30 мин при 37 °С, реакцию

останавливали добавлением 1,5 мл свежеприготовленного реагента следующего состава: 10 мМ гептамолибдат аммония, раствор 5 н  $H_2SO_4$  и ацетон в соотношении 1:1:2. Оптическую плотность опытной пробы измеряли на спектрофотометре ПЭ-5300ВИ (ООО «Экротхим», Россия) против контрольной при длине волны 355 нм в кювете шириной 5 мм. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего фитат натрия с образованием 1 мкмоль неорганического фосфата за одну минуту.

- *Удельная активность ферментов* принято выражать числом единиц ферментативной активности на 1 мг белка. Содержание белка определялось методом Бредфорда [232]. В каждую лунку планшета вносили 120 мкл реагента Coomassie, добавляли 60 мкл супернатанта, полученного центрифугированием образцов культуральной жидкости, отбираемой при культивировании через 12, 24, 48, 72 ч. В качестве контроля использовали 60 мкл дистиллированной воды. Помещали планшет в спектрофотометре Tecan infinite M200 Pro (компания Tecan, Switzerland), встряхивали 20 сек и инкубировали 5 мин при комнатной температуре, затем измерялась оптическая плотность раствора при длине волны 595 нм. Содержание белка определялось по калибровочному графику стандартного раствора альбумина с концентрацией от 25 до 1000 мг/л и рассчитывалось по уравнению (2.4):

$$y = 814,29 \cdot x - 14,26 \quad (2.4)$$

где  $y$  – содержание белка в исследуемой пробе, мг/л,  $x$  – оптическая плотность. Коэффициент корреляции  $R^2 = 0,9815$ .

### 2.15 Определение технологических характеристик ксиланазы

Для определения технологических характеристик ксиланазы использовали культуральную жидкость, содержащую ксиланазу и в качестве субстрата ксилан бука.

*Определение влияния pH на активность ксиланазы* проводилось с использованием буферных растворов. В качестве буфера использованы 0,15 М

фосфатно-цитратный раствор (рН 2,2-8,0) и 0,1 М фосфатно-боратный раствор (рН 5,8-9,2), приготовленные по ГОСТ 4919.2-77.

*Определение влияния температуры на активность ксиланазы* проводили в диапазоне температур 20 - 70 °С.

*Термостабильность* ксиланазы определяли измерением остаточной активности ферментов после инкубации при 70, 80 и 90 °С в течение 15 мин. Остаточная активность измерялась вышеописанным методом.

*Субстратную специфичность* определяли измерением активности ксиланазы с использованием в качестве субстрата ксилана березы, ксилана бука, арабиногалактана и карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ).

## **2.16 Методы определения влияния условий культивирования на рост бактерий и синтез продуктов метаболизма**

Для изучения влияния условий культивирования (концентрация субстрата, рН среды, температура, продолжительность инкубации посевного материала, источник азота, концентрация источника азота, источник углерода) на рост и синтез продуктов метаболизма бактериями *P. mucilaginosus*, использовали метод - один фактор за один раз (или one factor at a time - OFAT). В основу метода положено изучение одного фактора, при этом другие факторы были постоянными [233].

Определялось влияние содержания мелассы (1, 2, 3 и 4 %) в питательной среде на синтез биомассы и продуктов метаболизма бактериями *P. mucilaginosus*. При синтезе ксиланазы использовался ферментолизат клетчатки рисовой шелухи с концентрацией 0,25, 0,50, 0,75 и 1,00 %.

Определение влияния гидроксида натрия, гидроксида кальция и раствора щелока, содержащего кремний, который получен при обработке рисовой шелухи, на рН среды. Значения рН среды варьировались от 6,0 до 9,0.

Определение влияния температуры культивирования на синтез биомассы и продуктов метаболизма при культивировании бактерий *P. mucilaginosus* на

питательной среде (меласса или ферментолитат рисовой шелухи), корректировали рН среды до оптимального значения и инкубировали при температуре 25, 30 и 35 °С.

Определение влияния источников азота на синтез биомассы и продуктов метаболизма при культивировании бактерий *P. mucilaginosus* вносили в питательные среды 0,1 % неорганических ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) и органических источников азота (дрожжевой экстракт, кукурузный экстракт, пептон, бетафин, карбамид). Дальнейшее культивирование бактерий проводили на питательной среде с добавлением 0,02, 0,10, 0,20, 0,30 и 0,40 % наиболее эффективного источника азота. В контрольных опытах азотсодержащие вещества в питательные среды не вносили.

Исследование влияния возраста и дозы посевного материала проводили на инокулятах, полученных при культивировании в течение 12, 24, 36, 48 ч, которые вносили в колбы по 2, 5, 7 и 10 % от объема питательной среды.

### **2.17 Обработка результатов экспериментов**

Статистическую обработку результатов экспериментов, полученных в трех повторностях, проводили с использованием стандартного пакета программы Microsoft Excel и программы Prism 7, а также в соответствии требованиями стандартов на использованные в работе методы исследования.

### ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК БАКТЕРИЙ *P. MUCILAGINOSUS* И *P. SALINICAENI*

Обоснование технологии получения биопрепаратов сельскохозяйственного назначения основано 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 ниже.

При изучении морфологических характеристик исследуемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* показано, что на плотной среде бактерии формировали крупные, круглые колонии, поверхность колоний гладкая, профиль выпуклый. Колонии штаммов бактерий *P. mucilaginosus* более слизистые, прозрачнее, чем колонии штаммов бактерий *P. salinicaeni*. При культивировании на питательной среде, содержащей сахарозу, при температуре  $37 \pm 1$  °С бактерии *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* способны к спорообразованию. В зависимости от штамма размер бактериальных клеток варьировался от 6 до 13 мкм по длине (L) и от 1,5 до 2,8 мкм по условному диаметру ( $D_{\text{усл.}}$ ) (табл. 3.1).

Таблица 3.1 – Размеры бактериальных клеток *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* при культивировании на твердой питательной среде, содержащей сахарозу

Штаммы бактерий	Параметры клетки	
	L, мкм	$D_{\text{усл.}}$ , мкм
<i>P. mucilaginosus</i> 560	$8,16 \pm 0,54$	$2,77 \pm 0,12$
<i>P. mucilaginosus</i> 563	$6,77 \pm 0,39$	$1,88 \pm 0,18$
<i>P. mucilaginosus</i> 567	$7,54 \pm 0,64$	$1,79 \pm 0,22$
<i>P. mucilaginosus</i> 568	$10,69 \pm 0,64$	$1,57 \pm 0,05$
<i>P. mucilaginosus</i> 572	$9,92 \pm 1,06$	$1,67 \pm 0,11$
<i>P. mucilaginosus</i> 574	$6,98 \pm 0,31$	$2,01 \pm 0,11$
<i>P. mucilaginosus</i> 17-2	$13,02 \pm 1,20$	$3,50 \pm 3,18$
<i>P. salinicaeni</i> 17-6	$9,78 \pm 1,60$	$2,12 \pm 0,02$

Бактерии *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* относятся к грамположительными. Однако, в зависимости от фазы роста, условий культивирования и других факторов окраска клеток бактерий по Грамму может варьировать, в частности, в работах [220, 221] указано, что штаммы *Bacillus mucilaginosus* Bac-10 ВКПМ В-8966 и *P. mucilaginosus* ВКРМ В-7519 грамотрицательные.

Кроме того, показано, что все исследуемые штаммы бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* дают положительный эффект на каталазу, что обеспечивает эффективное разложение перекиси водорода.

### 3.1 Исследование способности азотфиксации бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*

Бактерии рода *Paenibacillus* характеризуются способностью фиксации азота, что позволяет применять их в сельском хозяйстве в качестве стимулятора роста растений. Способность азотфиксации определяли косвенно по способности синтеза биомассы на безазотистой питательной среде и накоплению общего азота в культуральной жидкости, которое определяли с применением реактива Несслера (табл.3.2).

Таблица 3.2 – Биомасса и содержание общего азота в культуральной жидкости после 72 ч культивирования исследуемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на безазотистой питательной среде при температуре  $30 \pm 1$  °С

Штаммы бактерий	Содержание общего азота в КЖ, мг/л	Концентрация биомассы, г/л
<i>P. mucilaginosus</i> 560	14,89 ± 1,50	1,50 ± 0,20
<i>P. mucilaginosus</i> 563	11,97 ± 1,45	1,17 ± 0,15
<i>P. mucilaginosus</i> 567	10,21 ± 1,05	1,16 ± 0,15
<i>P. mucilaginosus</i> 568	4,66 ± 0,56	1,13 ± 0,13
<i>P. mucilaginosus</i> 572	11,38 ± 1,05	1,17 ± 0,10
<i>P. mucilaginosus</i> 574	19,57 ± 2,55	1,93 ± 0,22
<i>P. mucilaginosus</i> 17-2	0,86 ± 0,67	1,40 ± 0,15
<i>P. salinicaeni</i> 17-6	0,72 ± 0,65	0,62 ± 0,05

Показано, что на безазотистой среде происходит синтез биомассы всеми исследуемыми штаммами. Кроме того, в культуральной жидкости по окончании

культивирования (72 ч) содержание аммонийного азота варьируется от 0,86 до 19,57 мгN/л. Это позволяет сделать вывод, что все рассматриваемые штаммы способны фиксировать атмосферный азот. Наименьшую способность к фиксации атмосферного азота показал штамм *P. salinicaeni* 17-6. При этом установлено, что самыми эффективными азотфиксирующими штаммами являются штаммы бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574.

### **3.2 Исследование эффективности мобилизации фосфатов и калия бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni***

Кроме азота важную роль для развития живых организмов играют фосфор и калий. Однако фосфор и калий в почве в большинстве случаев находится в форме труднорастворимых солей, минеральных руд и коллоидов. В проведенных исследованиях изучены калиймобилизующие и фосфатслюбилизующие свойства бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* при внесении в жидкую среду ортофосфата кальция и слюды в качестве источников минеральных фосфатов и калия, соответственно.

Установлено, что активность фосфатслюбилизации коллекционных штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* варьировала в пределах 52-80 мг/л фосфора (табл. 3.3).

Отмечено, что за 72 ч культивирования исследуемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* среда подкислялась, рН среды снизился от 7,5 до 5,2, что свидетельствует об образовании кислых метаболитов, способных к растворению  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  [234]. По данным, представленным в таблице 3.3, наиболее высокая потенциальная способность к фосфатслюбилизации, на уровне 80 мг/л фосфора, отмечена у штамма *P. mucilaginosus* 17-2 при подкислении среды до рН 5,2.

При снижении рН среды за счет выделения в среду органических кислот происходит растворение слюды, как источника минерального нерастворимого калия [235]. Показано, что все рассматриваемые штаммы способны выделять из труднорастворимого субстрата (слюды) в среду от 4,2 до 8,6 мг/л калия, за

исключением штамма *P. mucilaginosus* 560. Максимальное количество калия, выделяемого из слюды в среду 8,6 мг/л, отмечено у штамма *P. salinicaeni* 17-6, что превышает в 2 раза количество калия, выделяемого штаммом *Bacillus mucilaginosus* MCRCp1 (4,29 мгК/л) [236].

При использовании фитата натрия в качестве субстрата определена фитазная активность всех рассматриваемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*. Показано, что исследуемые штаммы способны синтезировать фермент фитазу, который катализирует отщепление фосфатов от фитиновых кислот – основной запасной формы фосфора в растительном сырье: злаках, бобах орехах и в почве. Фитазная активность штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* находится на уровне 0,56 – 0,86 ед/мл, что превышает в 2 – 4 раза активность фитазы, синтезируемой бактериальной культурой *Bacillus ginsengihumi* M2.11 (0,21 – 0,24 ед/мл) [237]. Наибольшая активность фитазы обнаружена у штамма 17-2 бактерий *P. mucilaginosus*, что соответствует наибольшему накоплению фосфора в среде.

Таблица 3.3 – Оценка способности калиймобилизации, фосфатсолобилизации и фитазной активности штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 и *P. salinicaeni* 17-6 на питательной среде, содержащей сахарозу с добавлением 0,2 % ортофосфата кальция и 0,2 % слюды в качестве источника фосфора и калия при температуре культивирования  $30 \pm 1$  °С в течение 72 ч

Штаммы бактерий	рН среды	Количество растворенного фосфора в КЖ, мг/л	Количество калия в КЖ, мг/л	Фитазная активность, ед/мл
<i>P. mucilaginosus</i> 560	5,62	52,26 ± 2,50	0	0,56 ± 0,05
<i>P. mucilaginosus</i> 563	5,55	64,29 ± 3,25	4,20 ± 0,10	0,69 ± 0,05
<i>P. mucilaginosus</i> 567	5,48	66,54 ± 3,25	1,65 ± 0,10	0,72 ± 0,05
<i>P. mucilaginosus</i> 568	5,45	58,53 ± 3,00	6,10 ± 0,10	0,63 ± 0,05
<i>P. mucilaginosus</i> 572	6,20	58,53 ± 3,00	2,75 ± 0,10	0,63 ± 0,05
<i>P. mucilaginosus</i> 574	5,58	59,78 ± 3,00	2,00 ± 0,10	0,64 ± 0,05
<i>P. mucilaginosus</i> 17-2	5,20	80,32 ± 3,75	6,10 ± 0,10	0,86 ± 0,05
<i>P. salinicaeni</i> 17-6	5,35	68,04 ± 3,25	8,60 ± 0,10	0,73 ± 0,05



Таким образом, все исследуемые штаммы бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* обладают как азотфиксирующей, так и калиймобилизующей и фосфатсольмобилизующей способностью, что позволяет рекомендовать их для создания технологии получения биоудобрения для замены минеральных удобрений – источников азота, фосфора и калия.

### **3.3 Исследование способности синтеза индолилуксусной кислоты бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni***

Одной из типичных характеристик бактерий рода *Paenibacillus* является способность синтеза ауксина – гормона, который является важнейшим регулятором экспрессии и развития генов на протяжении всей жизни растения, участвующим в делении и удлинении клеток ткани растений, их старении и развитии плодов. Существует несколько классов ауксинов, но первым идентифицированным и наиболее распространенным в природе является ИУК [33]. Как правило, ризобактерии эффективно продуцируют ИУК в стационарной фазе роста.

Как видно из результатов, представленных на рисунке 3.1, при культивировании исследуемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательной среде Александра с добавлением триптофана концентрацией 0,1%, образование максимального количества ИУК наблюдается после 48 ч культивирования у штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560, 567, 568 и 572 и после 72 ч культивирования у штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 563, 574, 17-2 и *P. salinicaeni* 17-6.

Исследуемые бактерии могут синтезировать от 5 до 60 мг/л ИУК. Наиболее высокая концентрация ИУК синтезируется штаммом *P. mucilaginosus* 574 в стационарной фазе роста (60 мг/л). Наименее эффективным продуцентом ИУК является в этих условиях штамм *P. salinicaeni* 17-6 (5,35 мг/л). Во время стационарной фазы роста (после 72 ч) у штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560, 567, 568 и 572 наблюдается снижение концентрации ИУК, что, возможно, связано со способностью деградации ИУК этими штаммами для поддержания роста или конъюгирования ИУК с сахаром, аминокислотами или белками в питательной среде [238].

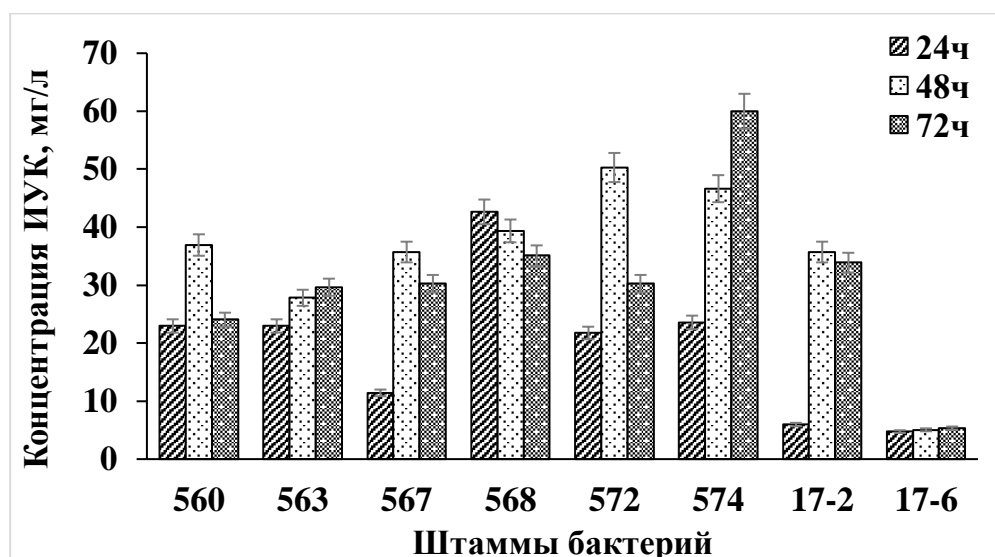


Рисунок 3.1 – Концентрация ИУК, продуцируемой исследуемыми штаммами бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* при культивировании на триптофан-содержащей питательной среде в зависимости от продолжительности культивирования при температуре  $30 \pm 1$  °С

### 3.4 Исследование влияния солей на рост бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*

При использовании бактерий в качестве биоудобрений необходимо учитывать влияние минеральных солей в почве, включая хлорид натрия, на рост бактерий. В качестве контроля использовали питательную среду без добавления хлорида натрия. Полученные результаты по количеству сухих веществ, в частности, биомасса и продукты метаболизма после 72 ч культивирования на питательной среде с сахарозой при добавлении хлорида натрия различных концентраций показывают, что штаммы бактерий *P. mucilaginosus* 560, 563, 567, 572, 574 и 17-2 способны расти в средах с концентрацией хлорида натрия до 1 % при температуре  $30 \pm 1$  °С (рис. 3.2а). Это свидетельствует о том, что эти штаммы относятся к негалофильным бактериям.

Влияние хлорида натрия на рост бактерий штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* взаимосвязано с температурой культивирования. В общем случае, понижение температуры культивирования приводит к снижению жизнеспособности у всех штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*.

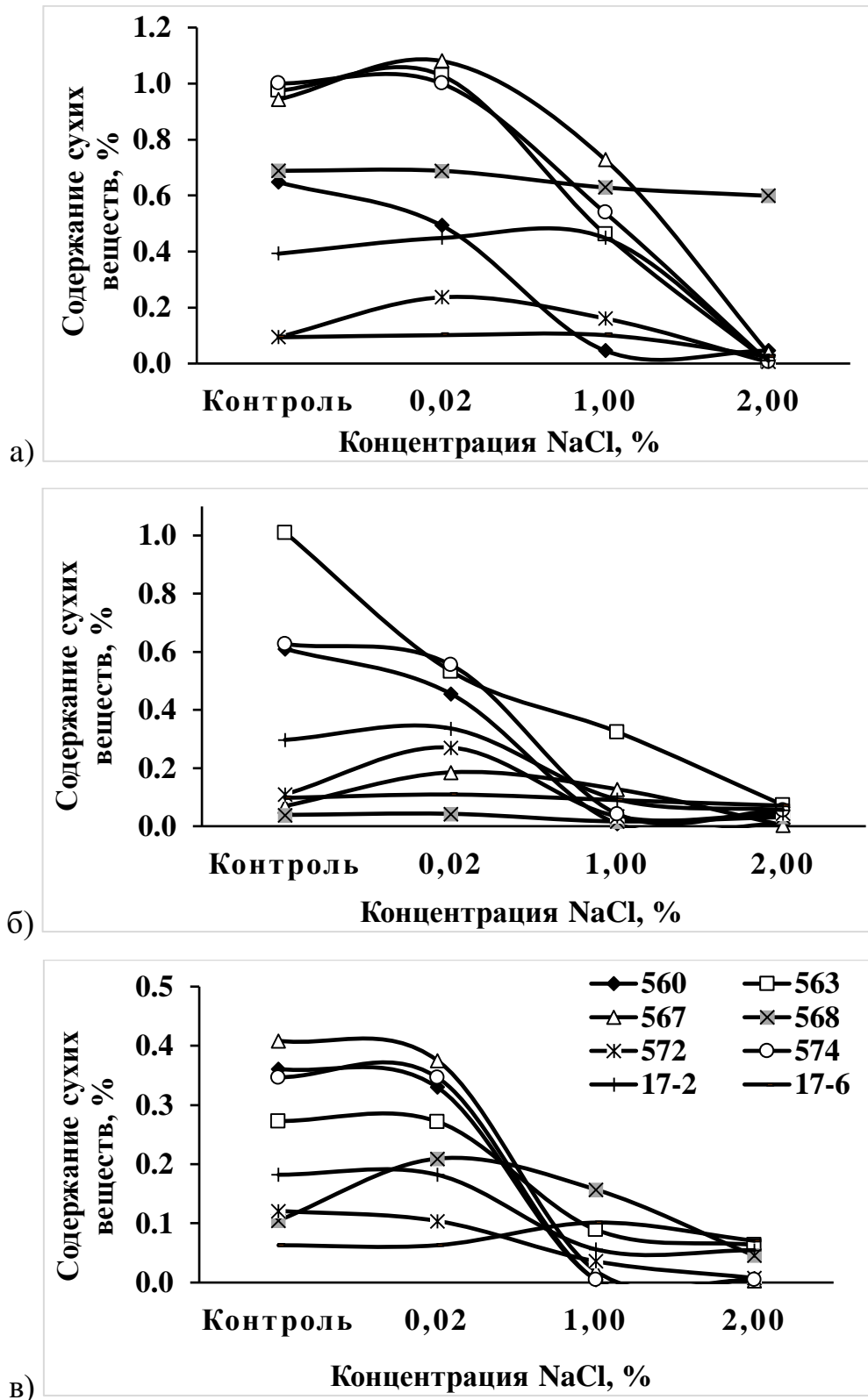


Рисунок 3.2 – Влияние температуры и концентрации хлорида натрия на продуктивность получения сухих веществ исследуемых штаммов бактерий *P.mucilaginosus* и *P. salinicaeni* при периодическом культивировании: а)  $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ; б)  $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ; в)  $10 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

При проведении исследований отмечено, что культивирование при температуре  $30 \pm 1$  °С концентрация хлорида натрия не оказывает влияния на рост штамма *P. mucilaginosus* 568 (рис. 3.2а), т.е., этот штамм более устойчив к солевому стрессу при культивировании в мезофильном режиме. В диапазоне температуры от 10 до 30 °С штамм *P. salinicaeni* 17-6 устойчив к солевому стрессу, что, по-видимому, связано со специфическим свойством штамма при его выделении из солевых источников.

Из результатов, представленных на рисунке 3.2б и 3.2в, видно, что для угнетения роста всех рассматриваемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* при температуре  $10 \pm 1$  °С и  $20 \pm 1$  °С достаточно 1 % хлорида натрия, а при  $30 \pm 1$  °С необходимо 2 % хлорида натрия. Увеличение концентрации хлорида натрия в среде вызывает повышение осмотического давления и оказывает токсическое действие на микроорганизмы: подавляются процессы дыхания, нарушаются функции клеточных мембран и др. В связи с этим рассматриваемые бактерии не рекомендуются к использованию в качестве биоудобрения для засоленных почв.

### **3.5 Исследование влияния моно- и дисахаридов на рост и синтез ЭПС бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni***

При применении в качестве источников углерода сахарозы, глюкозы и фруктозы установлено, что источники углерода существенно влияют на кинетику роста и синтез ЭПС исследуемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*.

Как видно из результатов, представленных на рисунках 3.3 и 3.4, полученных при культивировании рассматриваемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательных средах с сахарозой и при совместном присутствии глюкозы с фруктозой, наблюдается диауксия (двухфазный рост). До 12 ч культивирования бактерии размножаются экспоненциально, затем наступает небольшая пауза, после чего экспоненциальный рост возобновляется. При культивировании штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 568 и 17-2 и штамма *P. salinicaeni* 17-6 на питательных

средах с сахарозой и при совместном присутствии глюкозы и фруктозы диауксия не наблюдается.

Продолжительная лаг-фаза рассматриваемых штаммов на питательной среде с глюкозой, по-видимому, связана с системой транспорта глюкозы, которая ограничивает усвоение глюкозы этими штаммами (рис. 3.3 и 3.4). При этом продолжительность лаг-фазы исследуемых штаммов незначительна на питательных средах из сахарозы и при совместном присутствии глюкозы и фруктозы, за исключением штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 563 и 567. Возможно, это связано с усвоением фруктозы, в первую очередь, при диауксии, что согласуется с ранее опубликованными данными о росте бактерий *Rhodopseudomonas capsulata* [239].

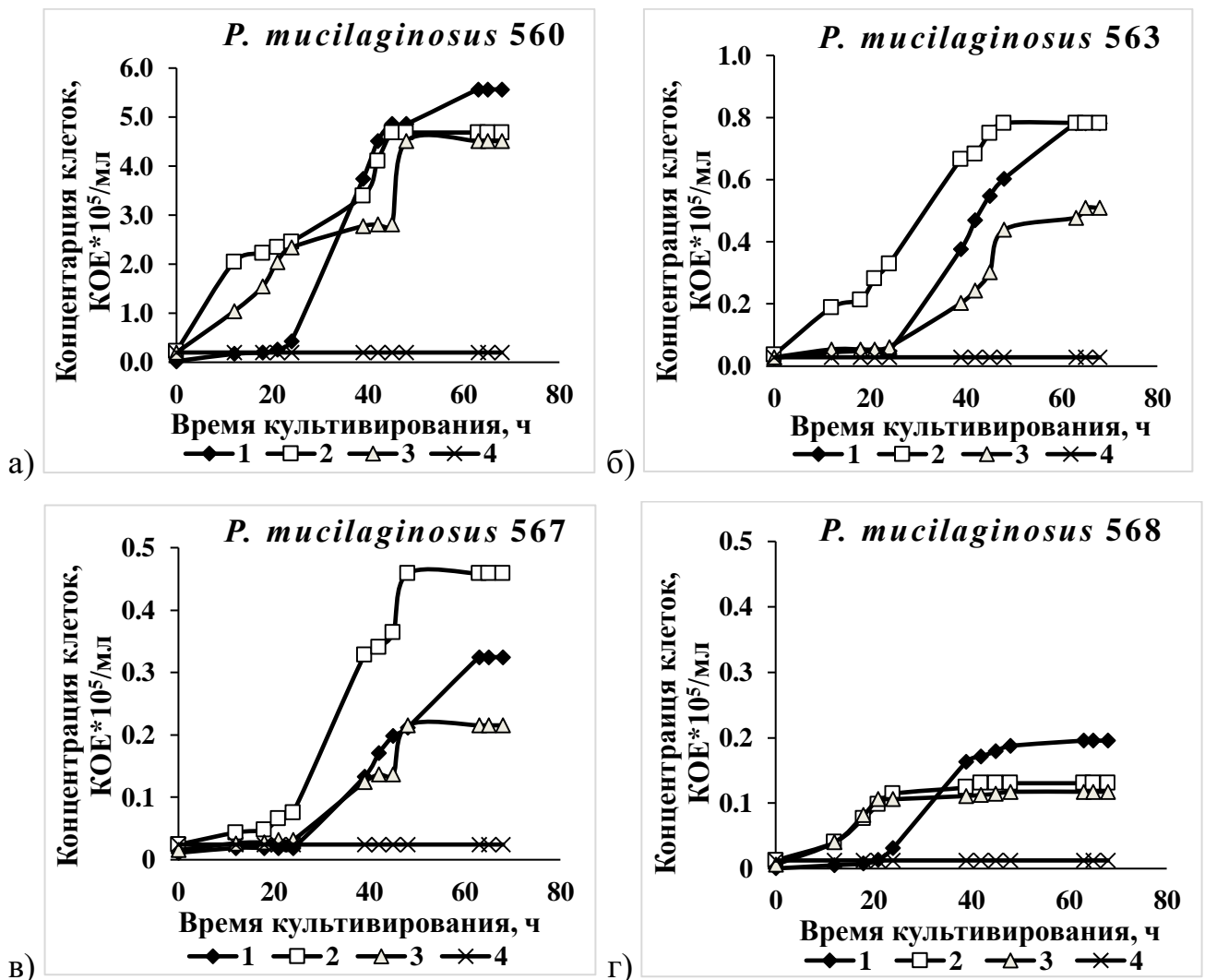


Рисунок 3.3 – Динамика роста штаммов бактерий *P. mucilaginosus* при культивировании на питательных средах, приготовленных на основе глюкозы (1), сахарозы (2), при совместном присутствии глюкозы-фруктозы (3) и фруктозы (4)

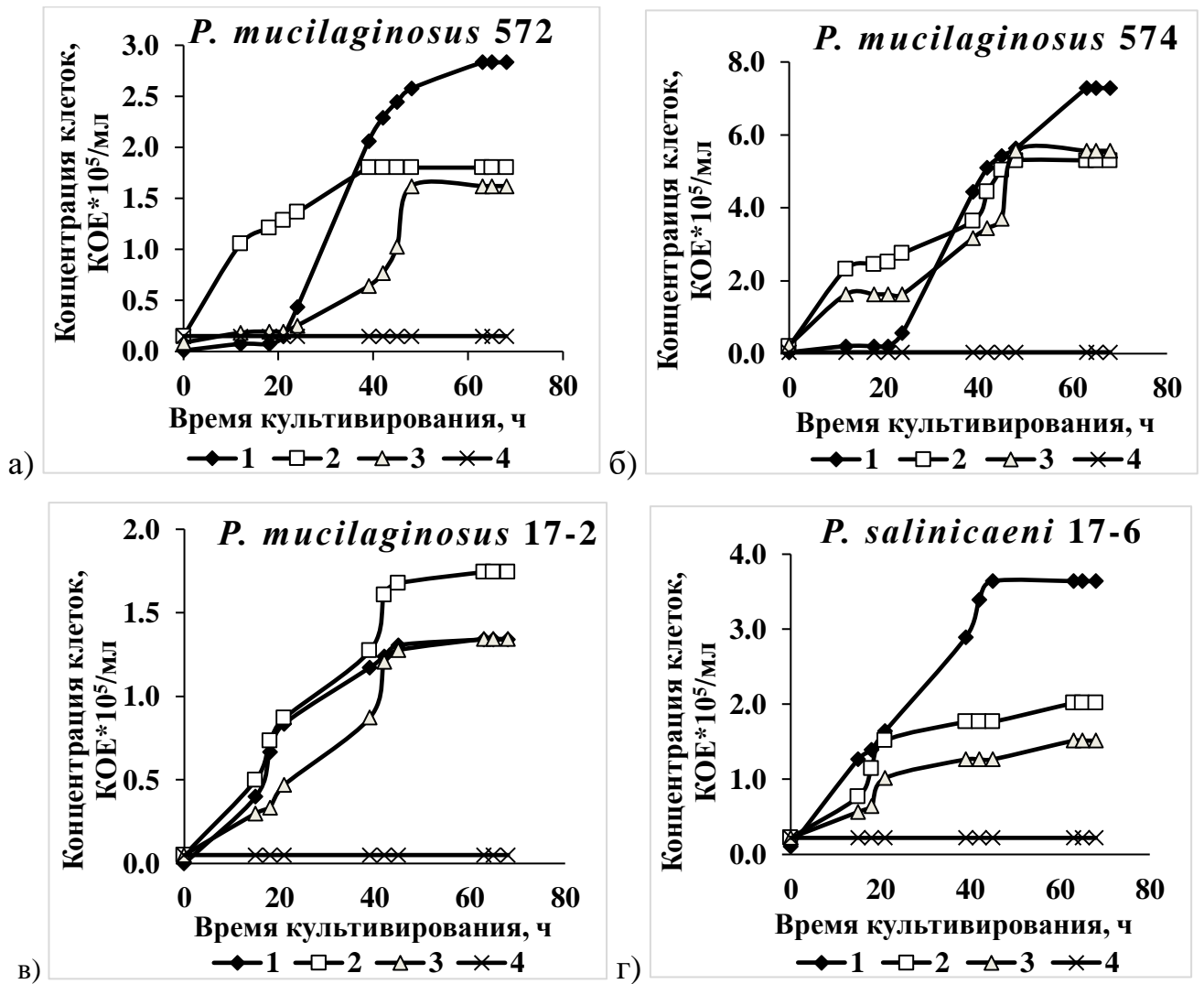


Рисунок 3.4 – Динамика роста штаммов бактерий *P. mucilagenosus* и *P. salinicaeni* при культивировании на питательных средах, приготовленных на основе глюкозы (1), сахарозы (2), при совместном присутствии глюкозы-фруктозы (3) и фруктозы (4)

Из динамики роста бактерий, представленной на рисунках 3.3 и 3.4, следует, что наилучшими субстратами для накопления биомассы исследуемых бактерий являются глюкоза и сахароза [75]. Показано, что при культивировании на питательных средах, приготовленных на основе глюкозы и сахарозы, перспективными являются штаммы бактерий *P. mucilagenosus* 560 и 574, у которых интенсивно нарастает показатель титра клеток (до  $6\text{-}7 \cdot 10^5$  КОЕ/мл), что в 32-34 раза больше по сравнению с наименьшим продуктивным штаммом *P. mucilagenosus* 568.

В таблице 3.4 представлены показатели удельной скорости роста и времени генерации при культивировании бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на рассматриваемых питательных средах.

Таблица 3.4 – Характеристики роста штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* при культивировании на питательных средах, приготовленных на основе сахарозы, глюкозы и при совместном присутствии глюкозы и фруктозы

Наименование штаммов	Источник углерода	Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>	Время генерации, ч
<i>P. mucilaginosus</i> 560	глюкоза	$0,137 \pm 0,030$	$5,24 \pm 1,11$
	сахароза	$0,184 \pm 0,015$	$3,79 \pm 0,31$
		$0,023 \pm 0,001$	$30,56 \pm 0,02$
	глюкоза и фруктоза (1:1)	$0,130 \pm 0,012$	$5,34 \pm 0,47$
		$0,031 \pm 0,003$	$22,43 \pm 0,22$
<i>P. mucilaginosus</i> 563	глюкоза	$0,116 \pm 0,018$	$5,98 \pm 0,04$
	сахароза	$0,127 \pm 0,010$	$5,47 \pm 0,42$
		$0,048 \pm 0,001$	$14,48 \pm 0,03$
	глюкоза и фруктоза (1:1)	$0,054 \pm 0,007$	$13,45 \pm 3,56$
		$0,052 \pm 0,001$	$13,35 \pm 0,02$
<i>P. mucilaginosus</i> 567	глюкоза	$0,135 \pm 0,015$	$5,15 \pm 0,06$
	сахароза	$0,098 \pm 0,009$	$7,08 \pm 0,03$
		$0,041 \pm 0,004$	$17,03 \pm 0,18$
	глюкоза и фруктоза (1:1)	$0,048 \pm 0,006$	$14,95 \pm 3,73$
		$0,033 \pm 0,004$	$21,24 \pm 0,25$
<i>P. mucilaginosus</i> 568	глюкоза	$0,151 \pm 0,020$	$4,64 \pm 0,64$
	сахароза	$0,152 \pm 0,017$	$4,57 \pm 0,22$
	глюкоза и фруктоза (1:1)	$0,161 \pm 0,016$	$4,35 \pm 0,43$
<i>P. mucilaginosus</i> 572	глюкоза	$0,143 \pm 0,031$	$4,99 \pm 1,04$
	сахароза	$0,162 \pm 0,070$	$4,29 \pm 0,26$
		$0,019 \pm 0,001$	$36,46 \pm 0,03$
	глюкоза и фруктоза (1:1)	$0,063 \pm 0,009$	$11,38 \pm 2,82$
		$0,039 \pm 0,001$	$17,89 \pm 0,06$
<i>P. mucilaginosus</i> 574	глюкоза	$0,131 \pm 0,032$	$5,48 \pm 1,23$
	сахароза	$0,204 \pm 0,019$	$3,42 \pm 0,32$
		$0,024 \pm 0,001$	$29,39 \pm 0,03$
	глюкоза и фруктоза (1:1)	$0,161 \pm 0,016$	$4,33 \pm 0,43$
		$0,034 \pm 0,002$	$20,18 \pm 0,13$
<i>P. mucilaginosus</i> 17-2	глюкоза	$0,166 \pm 0,016$	$4,19 \pm 0,65$
	сахароза	$0,149 \pm 0,097$	$4,56 \pm 0,26$
	глюкоза и фруктоза (1:1)	$0,136 \pm 0,085$	$5,11 \pm 0,25$
<i>P. salinicaeni</i> 17-6	глюкоза	$0,262 \pm 0,019$	$2,65 \pm 0,32$
	сахароза	$0,091 \pm 0,003$	$7,60 \pm 0,62$
	глюкоза и фруктоза (1:1)	$0,092 \pm 0,003$	$7,56 \pm 0,62$

\*в числителе – характеристики при ассимилировании фруктозы, в знаменателе - при ассимилировании глюкозы

Следует отметить, что удельная скорость роста бактерий при ассимилировании фруктозы выше, чем при ассимилировании глюкозы. Соответственно, время генерации рассматриваемых штаммов бактерий при ассимилировании фруктозы ниже, чем при ассимилировании глюкозы. Наиболее высокая удельная скорость роста на питательной среде с глюкозой отмечена у штамма *P. salinicaeni* 17-6 ( $0,26 \text{ ч}^{-1}$ ), на среде с сахарозой – *P. mucilaginosus* 574.

На рисунке 3.5 показано влияние различных источников углерода на изменение рН среды при культивировании бактерий.

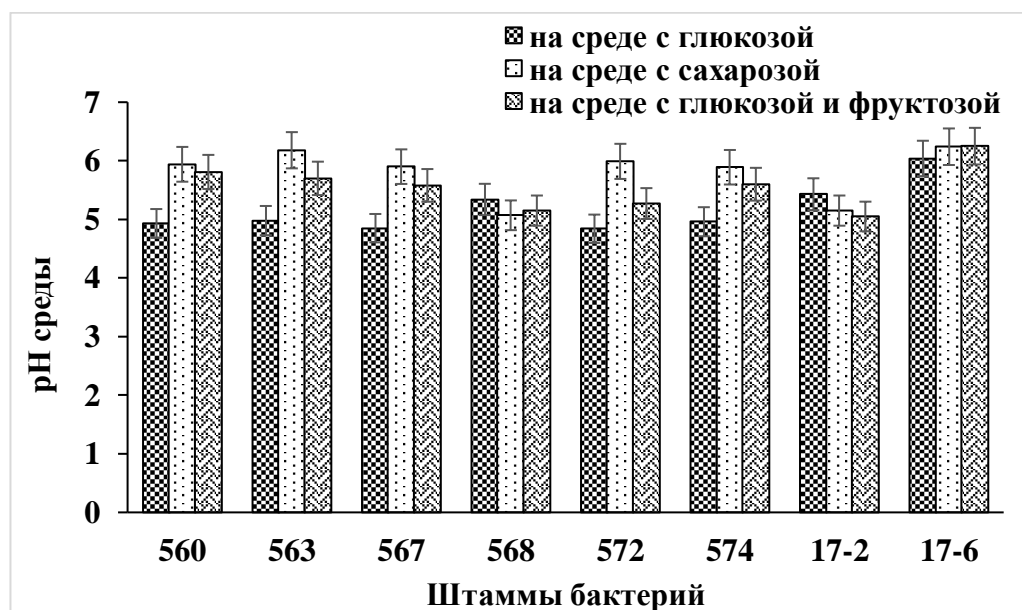


Рисунок 3.5 – Значение рН культуральной жидкости по окончании культивирования бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на различных источниках углерода: глюкоза, сахароза и глюкоза-фруктоза при начальном значении рН  $7,3 \pm 0,2$

При культивировании бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на рассматриваемых питательных средах наблюдается снижение рН культуральной жидкости за счет образования продуктов метаболизма, таких как органические кислоты: муравьиная, уксусная, щавелево-уксусная, щавелевая, янтарная, винная и т.д. [240]. Наибольшее снижение рН происходит при культивировании бактерий на питательной среде, содержащей глюкозу (до рН 4,8), и чем больше доля глюкозы в питательной среде, тем больше образуется органических кислот и ниже рН культуральной жидкости.



Следует отметить, что усвоение субстрата исследуемыми штаммами бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* идентично. О потреблении субстрата бактериями можно судить по изменению содержания РВ в питательной среде (табл. 3.5). Из представленных результатов видно, что на момент окончания культивирования бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательной среде с глюкозой, потребление РВ составляет 56 – 70 %, на питательной среде при совместном присутствии глюкозы-фруктозы потребление РВ – 76 – 78 % и на питательной среде с сахарозой доходит до 81 – 86 %. Это указывает на то, что происходит усвоение как глюкозы, так и фруктозы при культивировании бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательных средах с сахарозой и при совместном присутствии глюкозы и фруктозы.

При использовании фруктозы в качестве единственного источника углерода в питательной среде исследуемые штаммы бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* потребляли РВ, но рост исследуемых бактерий практически не наблюдался (рис. 3.3 и 3.4). Ниже представлены результаты, отражающие потребление РВ питательной среды штаммами рассматриваемых бактерий при температуре культивирования  $30 \pm 1$  °С, рН среды  $7,3 \pm 0,2$ , в течение 72 ч. Начальное содержание РВ в среде 1 %.

Штамм бактерий	РВ по окончанию культивирования, %
<i>P. mucilaginosus</i> 560	0,80 ± 0,06
<i>P. mucilaginosus</i> 563	0,63 ± 0,03
<i>P. mucilaginosus</i> 567	0,43 ± 0,02
<i>P. mucilaginosus</i> 568	0,55 ± 0,03
<i>P. mucilaginosus</i> 572	0,40 ± 0,02
<i>P. mucilaginosus</i> 574	0,46 ± 0,02
<i>P. mucilaginosus</i> 17-2	0,58 ± 0,03
<i>P. salinicaeni</i> 17-6	0,45 ± 0,02

Возможно, что большая часть фруктозы метаболизирует при гликолизе с образованием этанола и уксусной кислоты [241]. На питательной среде при совместном присутствии глюкозы и фруктозы соотношением 1:1

рассматриваемые штаммы больше усваивают субстрат, но выход биомассы и ЭПС меньше по сравнению с культивированием их на питательной среде с глюкозой (табл. 3.5). Это указывает на большое значение глюкозы для регулирования роста бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*, синтеза их биомассы и ЭПС.

Таблица 3.5 – Влияние источника углерода на потребление РВ и синтез биомассы и ЭПС штаммами бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*

Наименование штаммов	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	8,64 ± 0,50	86,30 ± 2,50
	Глюкоза и фруктоза (1:1)	2,72 ± 0,15	78,40 ± 2,50
<i>P. mucilaginosus</i> 563	Глюкоза	4,44 ± 0,25	61,78 ± 2,50
	Сахароза	7,50 ± 0,50	84,99 ± 2,50
	Глюкоза и фруктоза (1:1)	2,57 ± 0,15	79,18 ± 2,50
<i>P. mucilaginosus</i> 567	Глюкоза	4,99 ± 0,25	70,86 ± 2,50
	Сахароза	7,79 ± 0,50	84,99 ± 2,50
	Глюкоза и фруктоза (1:1)	2,81 ± 0,15	79,01 ± 2,50
<i>P. mucilaginosus</i> 568	Глюкоза	4,22 ± 0,25	64,81 ± 2,50
	Сахароза	2,19 ± 0,50	71,26 ± 2,50
	Глюкоза и фруктоза (1:1)	2,86 ± 0,15	78,80 ± 2,50
<i>P. mucilaginosus</i> 572	Глюкоза	5,68 ± 0,25	70,86 ± 2,50
	Сахароза	2,17 ± 0,50	80,84 ± 2,50
	Глюкоза и фруктоза (1:1)	2,41 ± 0,15	77,50 ± 2,50
<i>P. mucilaginosus</i> 574	Глюкоза	4,61 ± 0,25	57,25 ± 2,50
	Сахароза	8,02 ± 0,50	81,14 ± 2,50
	Глюкоза и фруктоза (1:1)	2,62 ± 0,15	77,70 ± 2,50
<i>P. mucilaginosus</i> 17-2	Глюкоза	1,95 ± 0,15	35,79 ± 2,50
	Сахароза	4,32 ± 0,50	83,99 ± 2,50
	Глюкоза и фруктоза (1:1)	1,53 ± 0,15	61,51 ± 2,50
<i>P. salinicaeni</i> 17-6	Глюкоза	2,87 ± 0,15	17,11 ± 2,50
	Сахароза	3,57 ± 0,50	83,59 ± 2,50
	Глюкоза и фруктоза (1:1)	1,67 ± 0,05	42,83 ± 2,50

Проведенными исследованиями показано, что все штаммы при культивировании на питательной среде с сахарозой обладают очень высоким выходом биомассы и ЭПС и выше, чем при культивировании на питательных средах с глюкозой и при совместном присутствии глюкозы и фруктозы.

Незначительная продолжительность лаг-фазы, эффективное усвоение, высокий выход биомассы и ЭПС позволяет рекомендовать применение сахарозы в питательной среде для культивирования всех рассмотренных штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*.

Культивирование бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательной среде, содержащей сахарозу, сопровождается синтезом этими бактериями внеклеточного фермента  $\beta$ -фруктофуранозидазы, который гидролизует сахарозу до глюкозы и фруктозы. Как видно из результатов, представленных на рисунке 3.6, штаммы *P. mucilaginosus* 563 и *P. salinicaeni* 17-6 имеют низкую активность  $\beta$ -фруктофуранозидазы ( $\sim 0,5$  ед/мл). Самым продуктивным продуцентом  $\beta$ -фруктофуранозидазы является штамм *P. mucilaginosus* 574 (больше 2 ед/мл).

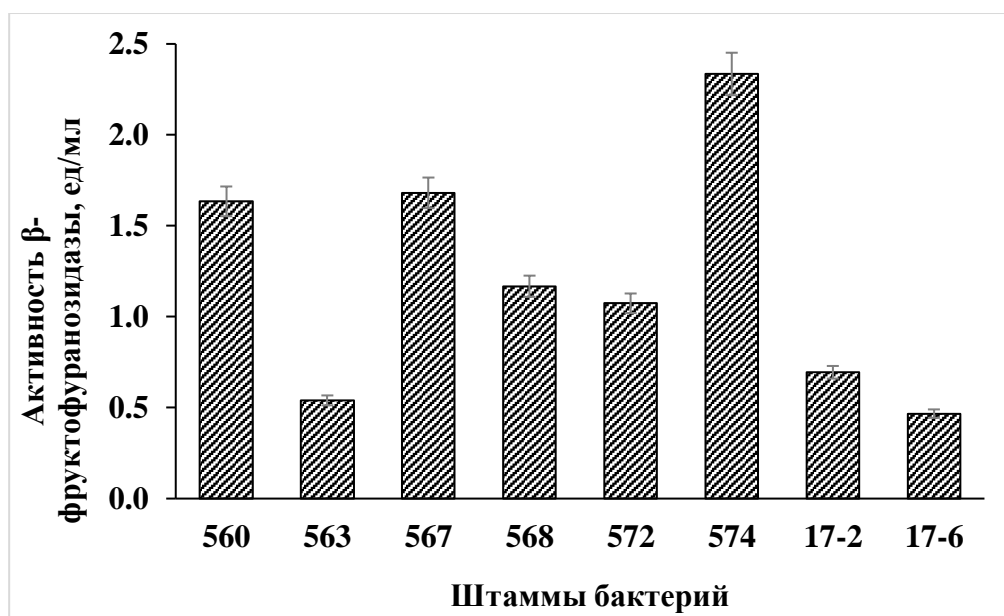


Рисунок 3.6 –  $\beta$ -фруктофуранозидазная активность бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* после 48 ч культивирования на питательной среде, содержащей сахарозу, при температуре  $30 \pm 1$  °C

Бактерии *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* синтезируют слизи или ЭПС как оболочку, защищающую клетки от неблагоприятных условий. В общем случае по мере увеличения продолжительности культивирования и увеличении числа КОЕ бактерий в культуральной жидкости накапливаются ЭПС и образуется вязкий раствор. Исследования показали, что природа источника углерода влияет на способность штаммов исследованных бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*

синтезировать ЭПС, что косвенно подтверждается значением показателя вязкости культуральной жидкости (рис. 3.7).

Из результатов, представленных на рисунке 3.7, видно, что вязкость культуральной жидкости с бактериями штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* при культивировании на питательной среде при совместном присутствии глюкозы и фруктозы ниже значений вязкости при культивировании этих штаммов на питательных средах с глюкозой и сахарозой. При этом высокая вязкость культуральной жидкости наблюдается у штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 при культивировании на питательных средах, приготовленных на основе сахарозы и глюкозы, что обусловлено эффективным синтезом внеклеточных полисахаридов.

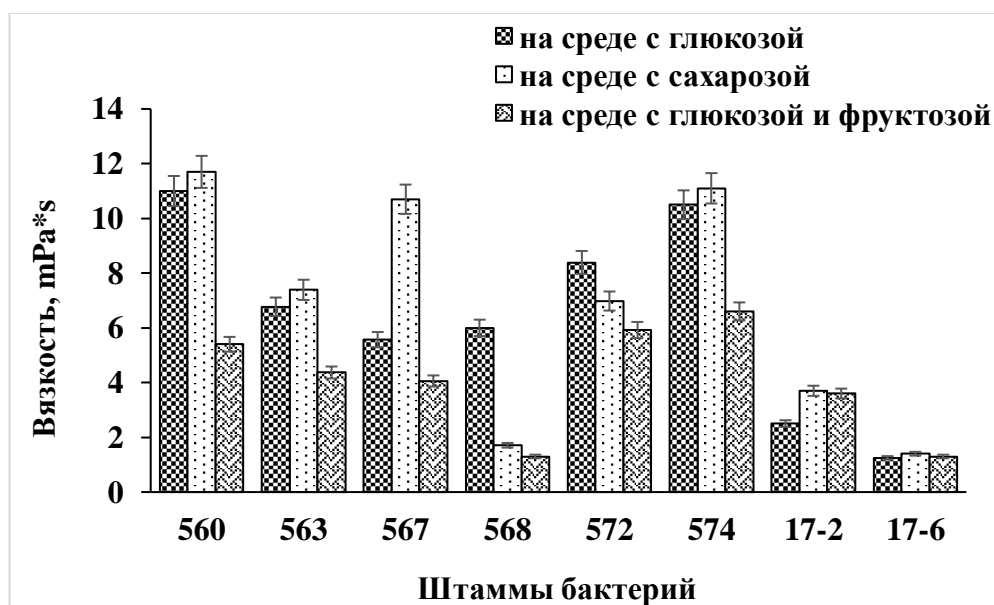


Рисунок 3.7 – Вязкость культуральной жидкости при культивировании бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательных средах, приготовленных на основе сахарозы, глюкозы и глюкозы-фруктозы, по окончании культивирования 72 ч

Значение вязкости культуральной жидкости бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* изменяется соответственно данным концентрации ЭПС в среде. Из представленных результатов на рисунке 3.8 следует, что на питательной среде, содержащей 1 % сахарозы, все штаммы бактерий *P. mucilaginosus* по мере их роста

интенсивно накапливают ЭПС. При этом штамм *P. salinicaeni* 17-6 не эффективно синтезирует ЭПС.

При культивировании до 24 ч концентрация синтезируемых ЭПС штаммами бактерий *P. mucilaginosus* незначительно, по истечению 48 ч культивирования достигает максимального значения. В этот период все штаммы бактерий *P. mucilaginosus* интенсивно растут и потребляют сахарозу из среды для синтеза ЭПС. К концу культивирования наблюдается снижение содержания сахарозы как источника углерода в питательной среде. Для этого периода характерно и снижение полисахаридов в культуральной жидкости. Можно полагать, что при недостатке источника углерода бактерии синтезируют гликолитические ферменты, которые гидролизуют частично ЭПС, и мономеры этого биополимера используют в качестве источника питания. Однако, эта закономерность не характерна для штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 563, 567 и 17-2.

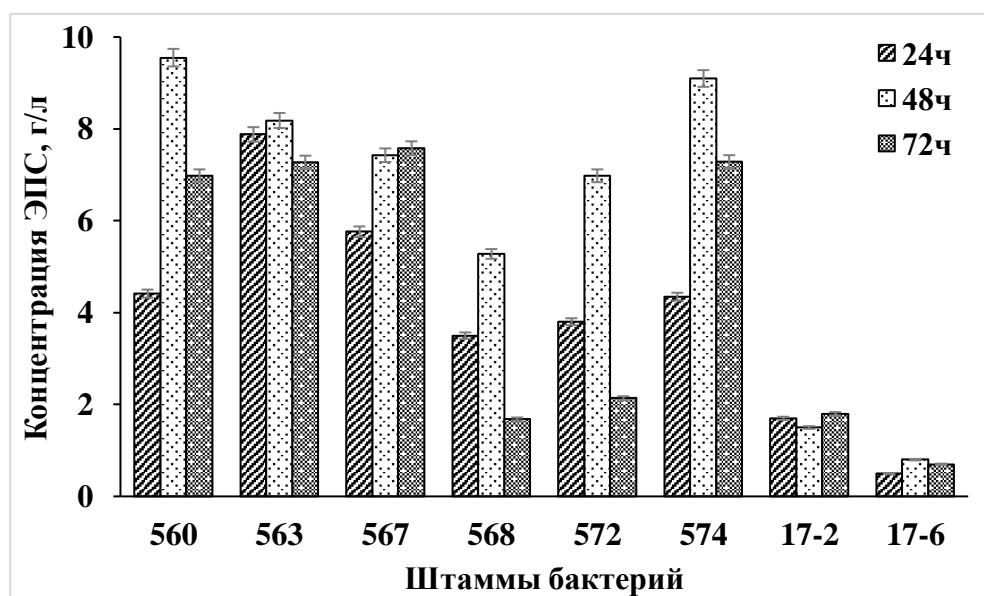


Рисунок 3.8 – Изменение концентрации ЭПС, синтезируемых бактериями *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* при культивировании на питательной среде, содержащей 1 % сахарозы

Установлено, что наилучшим источником углерода для роста и синтеза ЭПС является сахароза. На питательной среде с сахарозой синтез ЭПС интенсивно происходит в конце экспоненциальной фазы роста и максимально наблюдается у штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 [83].

## ГЛАВА 4. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ *P. MUCILAGINOSUS* НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ, ПРИГОТОВЛЕННОЙ НА ОСНОВЕ МЕЛАССЫ

### 4.1 Выбор эффективного продуцента биомассы и ЭПС при культивировании на питательной среде с мелассой

При получении биоудобрений и кормовых добавок путем микробиологического синтеза на питательных средах, приготовленных 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. Преимущества мелассы: низкая стоимость, простота хранения, помимо высокого содержания сахара в ней содержатся различные соли, микроэлементы, аминокислоты и витамины, которые обеспечивают рост микроорганизмов [242].

Из данных, представленных в таблице 4.1, следует, что при сопоставимых значениях времени генерации и удельной скорости роста концентрация биомассы и ЭПС, синтезируемых штаммом *P. mucilaginosus* 574, в 2 и 1,2 раза больше, соответственно, по сравнению с концентрацией биомассы и ЭПС, синтезируемых штаммом *P. mucilaginosus* 560. Это может быть связано со способностью синтеза культурами фермента  $\beta$ -фруктофуранозидазы, гидролизующей сахарозу в мелассе, и усвоением субстрата индивидуальными штаммами. Это подтверждается и более высокой активностью  $\beta$ -фруктофуранозидазы штамма *P. mucilaginosus* 574.

Продолжительность лаг-фазы для адаптации при культивировании обоих штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 на питательной среде с мелассой составляет 12 ч (рис. 4.1). Кроме продолжительной лаг-фазы установлено, что удельная скорость роста, выход биомассы и ЭПС при культивировании обоих

штаммов на питательной среде с мелассой, в которой содержится 1 % сахарозы, ниже, чем при культивировании на питательной среде с сахарозой при равном ее содержании (табл. 3.4 и 3.5).

Таблица 4.1 – Ростовые параметры и концентрация биомассы и ЭПС штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 при культивировании на питательной среде, содержащей 2 % мелассы

Показатели	<i>P.mucilaginosus</i> 560	<i>P.mucilaginosus</i> 574
Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>	0,13 ± 0,03	0,12 ± 0,03
Время генерации, ч	5,37 ± 1,33	5,84 ± 1,60
Концентрация биомассы, г/л	0,85 ± 0,02	1,71 ± 0,03
Концентрация ЭПС, г/л	4,20 ± 0,13	5,02 ± 0,15
Активность β-фруктофуранозидазы, ед/мл	0,33 ± 0,01	0,84 ± 0,01

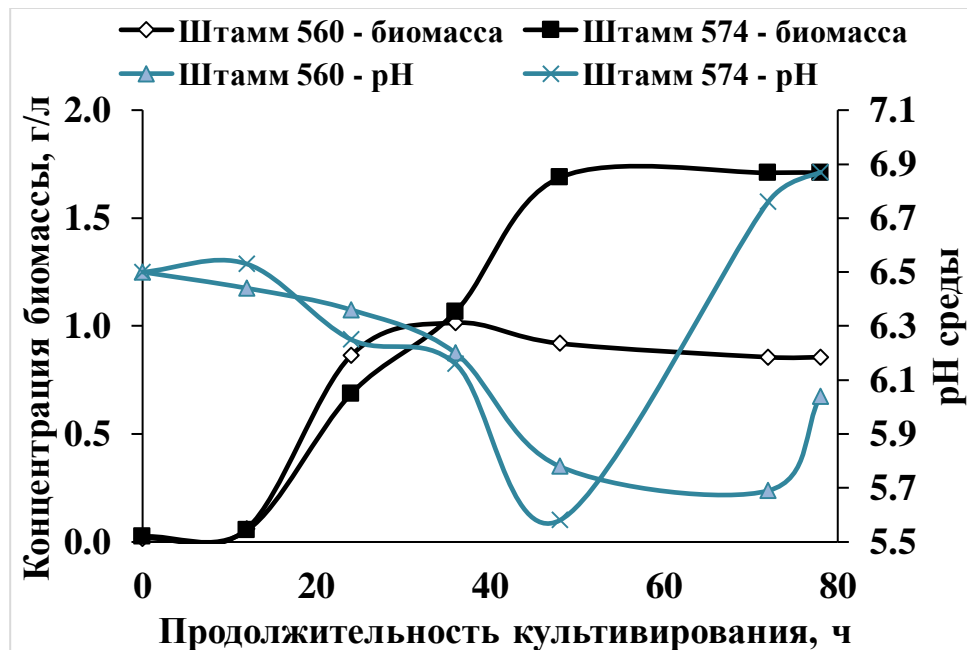


Рисунок 4.1 – Изменение концентрации биомассы и pH среды при культивировании бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 на питательной среде, содержащей 2 % мелассы

Следует отметить, что происходит изменение pH среды в первые 48 ч культивирования обоих рассматриваемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* в сторону подкисления среды из-за накопления органических кислот в среде. К концу культивирования штамма *P. mucilaginosus* 560 наблюдается незначительное

повышение pH среды (от 5,7 до 6,0). При этом pH среды интенсивно возрастает от 5,6 до 6,9 при культивировании штамма *P. mucilaginosus* 574. Увеличение pH среды может быть обусловлено изменением состава органических и неорганических веществ, присутствующих в мелассе, которые ассимилируются бактериями, а также продуктами метаболизма, синтезируемыми этими бактериями при культивировании [242] (рис. 4.1).

Таким образом, для дальнейших исследований рекомендуется использовать штамм *P. mucilaginosus* 574, который является перспективным продуцентом, обеспечивающий высокий выход биомассы и ЭПС при культивировании на питательной среде с мелассой.

#### **4.2 Исследование биотехнологической активности штамма *P. mucilaginosus* 574 при культивировании на питательной среде с мелассой**

Проведено исследование способности азотфиксации, калиймобилизации и фосфатсольюбилизации штаммом *P. mucilaginosus* 574 при культивировании на питательной среде с мелассой. Из результатов, представленных в таблице 4.2, 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 исследуемого штамма 0,85 г/л (среда 1, рис. 4.4) после 72 ч культивирования свидетельствует о том, что данный штамм способен фиксировать атмосферный азот на питательной среде с мелассой. По окончании культивирования содержание общего азота в среде и выход биомассы этого штамма при культивировании на питательной среде с мелассой меньше в 2 раза по сравнению с культивированием на питательной среде с сахарозой (19,57 мгN/л, 1,93 г/л по биомассе, табл. 3.2).

Следует отметить, что штамм *P. mucilaginosus* 574 интенсивно синтезировал ИУК до 144 мг/л на питательной среде с мелассой (табл. 4.2), что в 2,4 раза больше по сравнению с синтезом на питательной среде с сахарозой (60 мг/л, рис. 3.1). 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 [243]. Эффективный синтез бактериями ИУК из триптофана приходится на стационарную фазу роста микроорганизмов (табл. 4.2, рис. 4.1), что соответствует опубликованным результатам других исследований [244, 245].

Установлено, 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 (табл. 4.2). При этом рН среды поднимается от 6,5 до 7,4 в отличие от изменения рН при культивировании этого штамма на питательной среде с сахарозой до кислотных значений (табл. 3.3). В работах [246, 247] показано, что ЭПС играют важную роль в мобилизации фосфора. При этом ЭПС в определенном количестве позволяют удерживать свободные анионы фосфора ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), вызывая несбалансированное содержание фосфора в среде, что в результате приводит к большему высвобождению фосфора ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) из нерастворимого фосфата. Поэтому было высказано предположение, что ЭПС со способностью удержания растворенных фосфатов могут служить дополнительным фактором в растворении нерастворимых минеральных фосфатов микробами помимо органических кислот и ионов  $\text{H}^+$ .

Таблица 4.2 – Продукты метаболизма штамма *P. mucilaginosus* 574 при культивировании на питательной среде, содержащей мелассу, в течение 72 ч при температуре  $30 \pm 1$  °С

τ, ч	рН среды	Содержание общего азота в КЖ, мг/л	Количество ИУК в КЖ, мг/л	Количество фосфора в КЖ, мг/л	Фитаза, ед/мл
24	$7,32 \pm 0,20$	$11,62 \pm 0,92$	$28,68 \pm 1,72$	0	0
48	$7,41 \pm 0,20$	$5,77 \pm 0,52$	$121,56 \pm 6,07$	$107,44 \pm 5,35$	$1,16 \pm 0,10$
72	$7,43 \pm 0,20$	$8,46 \pm 0,50$	$144,06 \pm 7,21$	$23,29 \pm 1,12$	$0,29 \pm 0,02$

Штамм *P. mucilaginosus* 574, также как и на питательной среде с сахарозой, способен продуцировать фермент фитазу с активностью 1,16 ед/мл после 48 ч культивирования на питательной среде, содержащей фитат натрия (табл. 4.2).

Таким образом, использование мелассы в питательной среде вместо сахарозы сохраняет у штамма *P. mucilaginosus* 574 способность фиксировать атмосферный азот и фосфатсольюбилизацию, а также повысить синтез ИУК и фитазную активность.

#### **4.3 Влияние содержания мелассы в питательной среде на синтез биомассы и ЭПС штамма *P. mucilaginosus* 574**

Учитывая важную роль бактериальных ЭПС не только в стимулировании фосфатсольюбилизации, снижении солевого стресса, стимулировании роста растений, но и в способности адсорбции микотоксинов в корме для животных, дальнейшие исследования были направлены на интенсификацию синтеза ЭПС и биомассы штаммом *P. mucilaginosus* 574 на питательной среде, приготовленной на основе мелассы.

Для роста микроорганизмов концентрация субстрата является одним из лимитирующих факторов роста. В данной работе исследовали влияние концентрации мелассы на рост и синтез ЭПС штамма *P. mucilaginosus* 574. Содержание мелассы в среде варьировалось от 1 до 4 %. Как видно из представленных данных на рисунке 4.2а, максимальная удельная скорость роста достигалась 0,12 ч<sup>-1</sup> при содержании мелассы 1 % и в дальнейшем незначительно снижалась в рассматриваемом диапазоне содержания мелассы в питательной среде.

Увеличение содержания мелассы в питательной среде закономерно привело к увеличению биомассы бактерий. Максимальная концентрация биомассы бактерий 4 г/л достигалось при культивировании штамма *P. mucilaginosus* 574 на питательной среде, содержащей 4 % мелассы. Максимальная концентрация ЭПС (5,0 г/л) и максимальная вязкость культуральной жидкости наблюдались при культивировании на среде с содержанием 2 % мелассы. Повышение содержания в питательной среде мелассы более 2 % ингибирует синтез ЭПС (рис. 4.2б). Возможно, это связано с увеличением содержания компонентов мелассы в питательной среде, являющихся ингибиторами синтеза ЭПС. Полученные результаты сопоставимы с данными, представленными в работах [248, 249], в

которых установлено, что содержание 2 % мелассы в питательной среде является оптимальным для синтеза ЭПС бактериями *Azotobacter* с получением 7,5 гЭПС/л, *Bacillus subtilis* с получением 4,86 гЭПС/л.

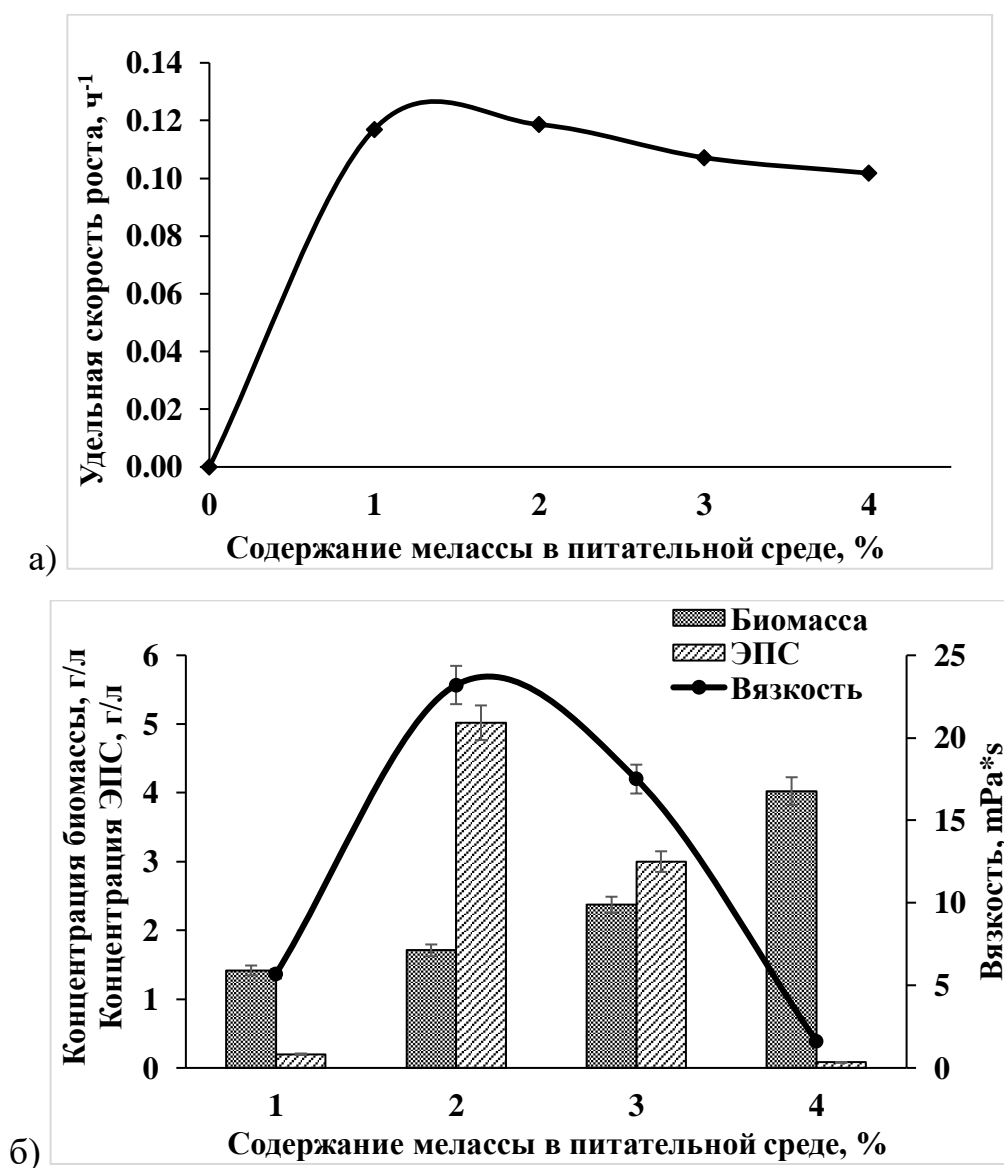


Рисунок 4.2 – Влияние содержания мелассы в питательной среде на кинетику роста (а) и выход биомассы и ЭПС (б) штамма *P. mucilaginosus* 574

#### 4.4 Влияние температуры культивирования и рН питательной среды на синтез биомассы и ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574

Исследования влияния температуры на синтез биомассы и ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574 проводили на питательной среде, содержащей 2 % мелассы. При этом температура культивирования варьировалась в диапазоне от 25 до 35 °С с интервалом в 5 °С. Установлено, что оптимальной температурой для синтеза

ЭПС является  $30 \pm 1$  °С, на это указывает высокая вязкость культуральной жидкости. Эта температура соответствует и наилучшему росту исследуемых бактерий. При повышении температуры до  $35 \pm 1$  °С происходит снижение синтеза биомассы в 2,3 раза и ЭПС в 8,6 раз по сравнению с оптимальной температурой  $30 \pm 1$  °С. Аналогично при снижении температуры культивирования до  $25 \pm 1$  °С уменьшается синтез биомассы в 1,7 раза и ЭПС в 1,9 раза по сравнению с оптимальной температурой культивирования (рис. 4.3а).

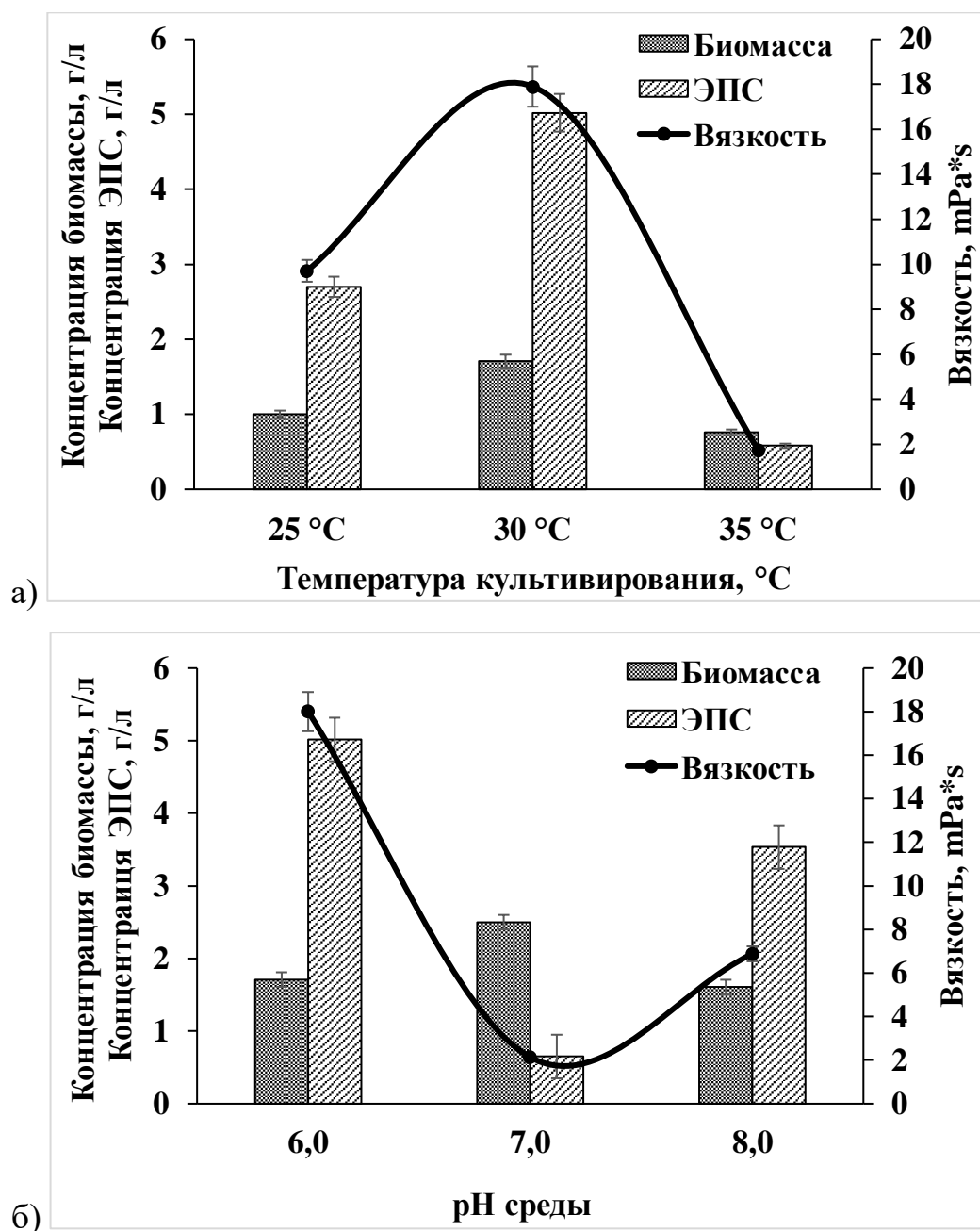


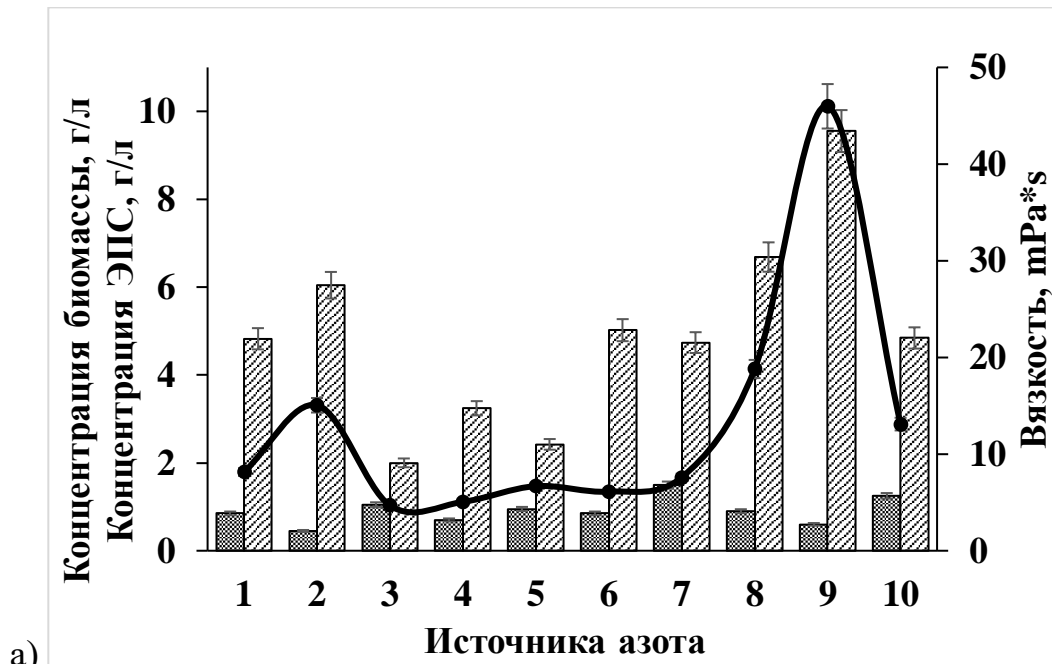
Рисунок 4.3 – Влияние температуры культивирования (а) и рН среды (б) на синтез биомассы и ЭПС штамма *P. mucilaginosus* 574

Кроме температуры, pH среды также значительно влияет на синтез биомассы и ЭПС штамма *P. mucilaginosus* 574. Исследование проводилось при оптимальной температуре  $30 \pm 1$  °C с корректировкой pH питательной среды от 6,0 до 8,0 гидроксидом кальция. В качестве контроля использовали питательную среду с pH  $6,0 \pm 0,2$ . Установлено, что при pH более 8,0 рост рассматриваемых штаммов не наблюдается. В диапазоне pH от 6,0 до 8,0 штамм *P. mucilaginosus* 574 эффективно растет при культивировании на питательной среде с мелассой до нейтрального значения pH. Однако эффективный синтез ЭПС происходит при изменении pH среды в более кислые или щелочные значения. В частности, максимальная концентрация ЭПС синтезировалась в слабокислой питательной среде при pH 6,0 (рис.4.3б).

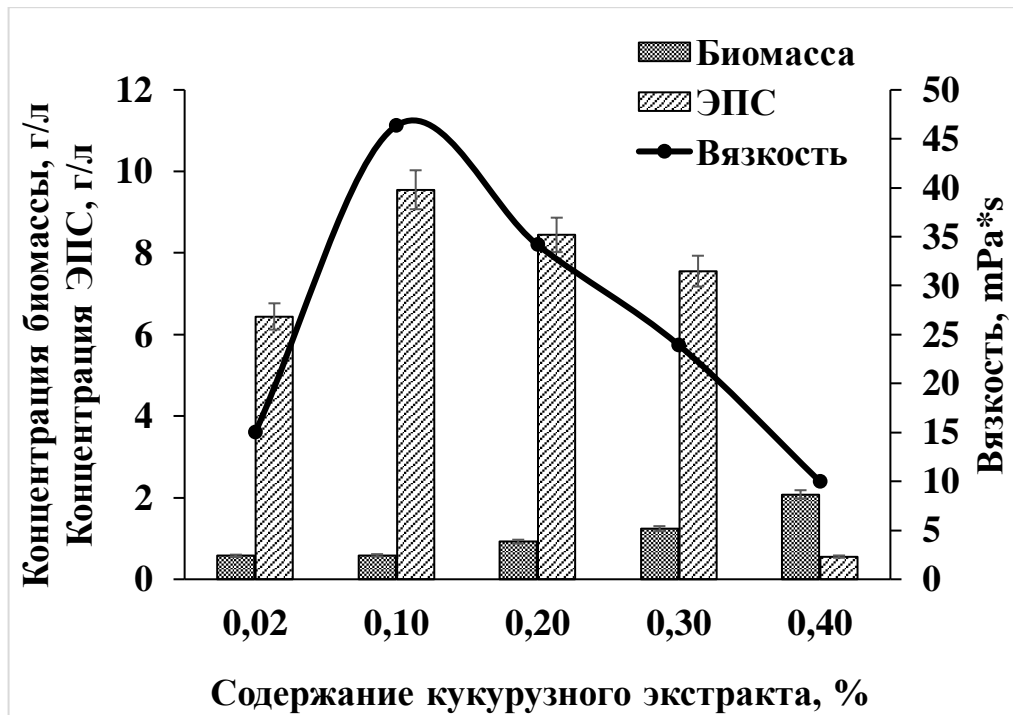
#### **4.5 Влияние источника и содержания азота на синтез биомассы и ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574**

При оптимальных условиях культивирования температуре  $30 \pm 1$  °C и pH среды  $6,0 \pm 0,2$  проводили определение влияния источника и содержания азота на синтез биомассы и ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574 (рис. 4.4). В качестве источников азота были выбраны как минеральные соли, так и органические вещества.

Интенсивность синтеза ЭПС рассматриваемым штаммом наблюдается при культивировании на питательной среде, приготовленной на основе мелассы без дополнительного внесения минеральных солей и азота (среда 2, рис. 4.4а), поскольку в стрессовых условиях (при избытке сахарозы и недостаточном количестве азота) синтез ЭПС стимулируется. Выход биомассы и ЭПС при культивировании в среде 2, содержащей мелассу без дополнительного внесения минеральных солей и азота, соответствует выходу этих продуктов на питательной среде, содержащей сахарозу (табл. 3.5). Следовательно, содержание питательных веществ в мелассе является достаточным для нормальной жизнедеятельности и синтеза ЭПС исследуемого штамма.



а)



б)

Рисунок 4.4 – Влияние источника азота (а) и его содержания (б) в питательной среде на синтез биомассы и ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574. На рисунке 4.4а: 1 – без дополнительного источника азота, 2 – без дополнительных источников минеральных солей и азота, 3 –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 4 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 – дрожжевой экстракт, 6 – одновременное присутствие  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и дрожжевого экстракта, 7 – пептон, 8 – бетафин, 9 – кукурузный экстракт, 10 – карбамид

Дополнительное внесение источника азота в питательную среду существенно влияет на рост исследуемого штамма по сравнению с контролем

(среда 1, рис. 4.4а). Наилучшим источником азота для синтеза биомассы служил пептон (среда 7, рис. 4.4а), который способствует увеличению количества биомассы в 2 раза по сравнению с контролем (среда 1, рис. 4.4а).

Из результатов, представленных на рисунках 4.4а и 4.4б видно, что при внесении в питательную среду бетафина (среда 8) и кукурузного экстракта (среда 9), увеличивается синтез ЭПС этим штаммом. Максимальная концентрация синтезируемых ЭПС в среде 9,55 г/л достигалась при внесении в среду кукурузного экстракта в количестве 0,1 %, что в 2 раза больше по сравнению контролем (среда 1), и в 1,5 раза больше, чем при культивировании исследуемого штамма на среде, содержащей 2 % мелассы и без дополнительных источников минеральных солей и азота (среда 2). По-видимому, это связано с содержанием в кукурузном экстракте индукторов синтеза ЭПС.

Дальнейшее повышение содержания кукурузного экстракта в среде обеспечивает благоприятные условия для роста продуцента, в результате которого концентрация биомассы увеличивается, однако синтез ЭПС при этом снижается в 17 раз по сравнению синтезом в среде, содержащей 0,1 % кукурузного экстракта (рис. 4.4б). В опубликованных исследованиях установлено, что кукурузный экстракт является наиболее благоприятным источником азота для биосинтеза ЭПС бактериями *Bacillus megaterium* [250], дрожжами *Aureobasidium pullulans* RBF 4A3 [251] и грибами *Agaricus nevoi*, *Inonotus levis* HAI 796 и *Phellinus robustus* [252].

#### **4.6 Влияние возраста и дозы инокулята на синтез биомассы и ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574**

Изучено влияние возраста (время инкубации) и дозы инокулята на синтез биомассы и ЭПС исследуемого штамма (рис. 4.5). Установлено, что с увеличением возраста инокулята концентрация биомассы, продуцируемой исследуемым штаммом, повышается, при этом концентрация синтезируемых ЭПС снижается (рис. 4.5а). Отмечено незначительное влияние дозы инокулята на синтез биомассы данного штамма. Максимальная концентрация ЭПС (9 г/л) и

биомассы (0,4 г/л) наблюдалась при возрасте инокулята 24 ч (рис. 4.5а) с внесением 5 % инокулята (рис. 4.5б).

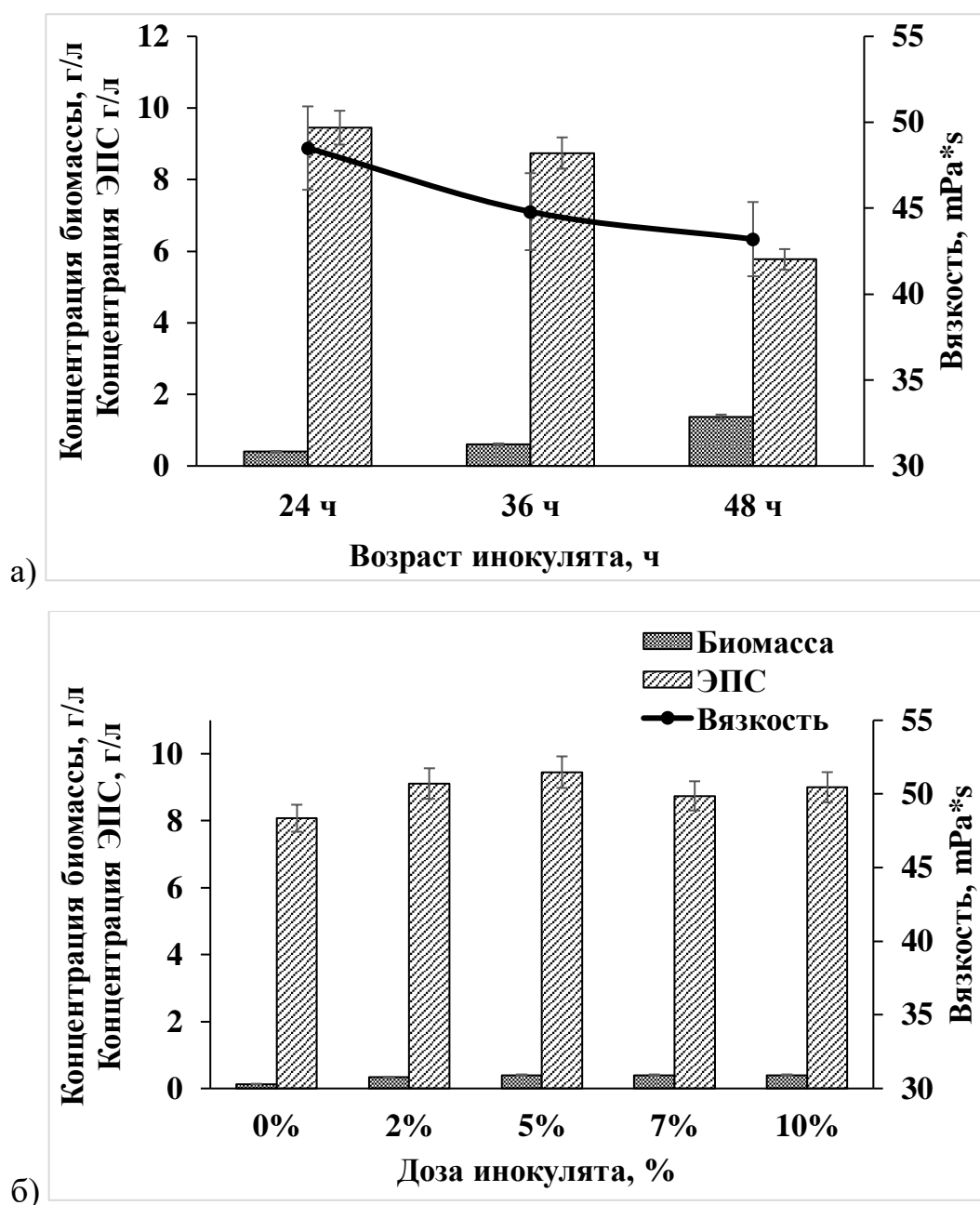


Рисунок 4.5 – Влияние возраста (а) и дозы инокулята (б) на синтез биомассы и ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574. В качестве контроля использовали питательную среду без внесения инокулята (0 %)

#### 4.7 Влияние аэрации на синтез биомассы и ЭПС штаммом *P.mucilaginosus* 574

При исследовании влияния аэрации показано, что максимальная концентрация биомассы (2 г/л) и ЭПС (9,6 г/л), синтезируемых штаммом



*P.mucilaginosus* 574, наблюдается в условиях аэрации, при которых соотношение объема воздуха к объему среды составляет 4,0:1,0 (рис.4.6а).

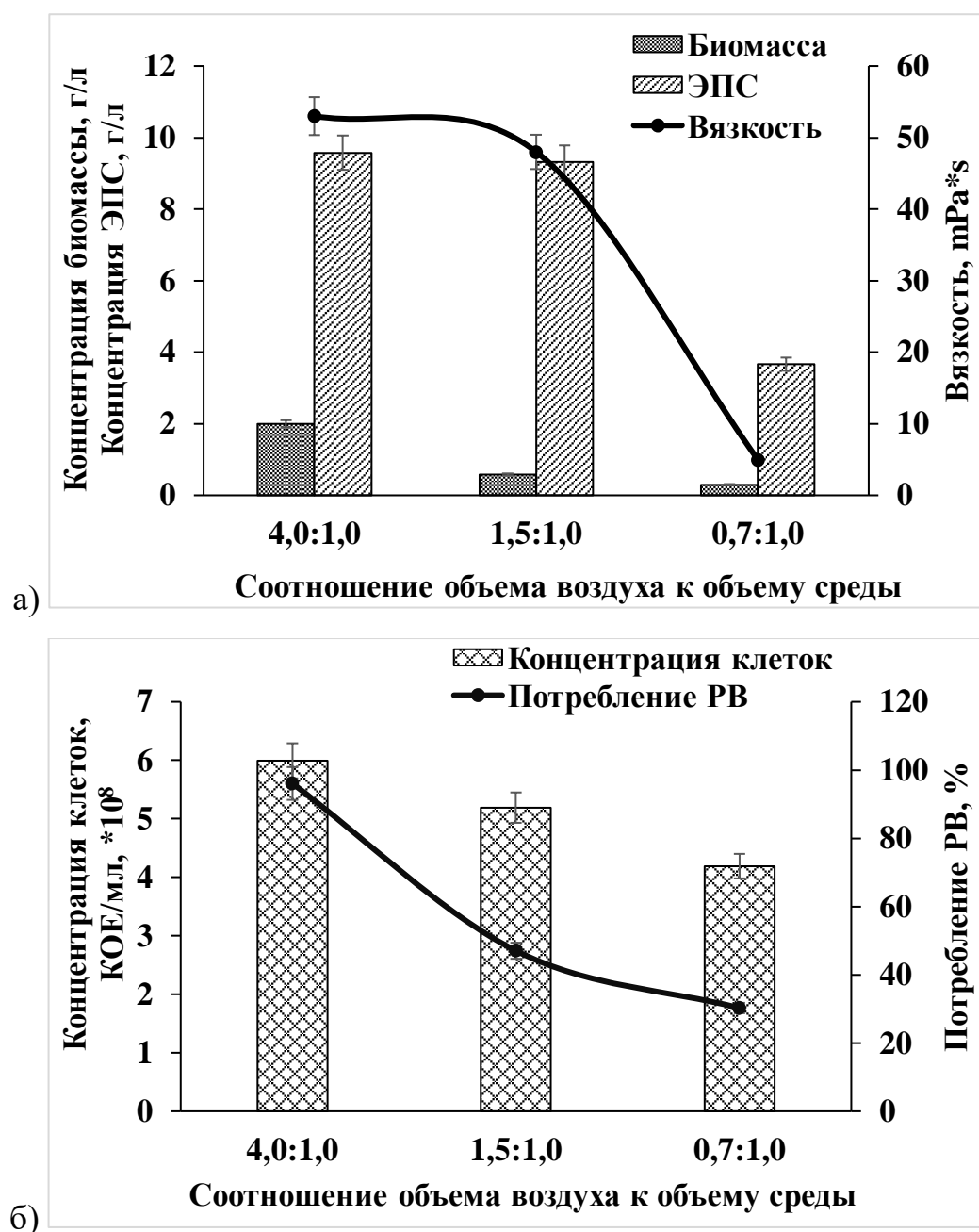


Рисунок 4.6 – Влияние соотношения объема воздуха к объему питательной среды на выход биомассы и ЭПС (а), концентрацию клеток и потребление РВ (б) штаммом *P. mucilaginosus* 574 (механическое перемешивание)

Полученные результаты соответствуют данным, представленным в работе [190], полученным при культивировании штамма *Paenibacillus* sp. TKU023. Обнаружено, что в условиях интенсивной аэрации бактерии рода *Paenibacillus* быстро растут и синтезируют значительно количество метаболитов. При этом

концентрация биомассы и ЭПС при соотношении объема воздуха к объему среды 4,0:1,0 в 2,6 и 6,6 раз больше, соответственно, по сравнению с соотношением объема воздуха к объему среды 1,5:1,0 и 0,7:1,0.

В связи с улучшением условий аэрации в среде, при которых соотношение объема воздуха к объему среды 4,0:1,0, рассматриваемый штамм может утилизировать до 96 % углеводов мелассы. Снижение утилизации субстрата при снижении соотношения объема воздуха к объему среды может быть связано с недостатком растворенного в питательной среде кислорода, необходимого для полной утилизации углеводов мелассы. Вследствие полной утилизации сахара данным штаммом при соотношении объема воздуха к объему среды 4,0:1,0 число клеток достигается  $6 \cdot 10^8$  КОЕ/мл и синтез ЭПС увеличивается до 9,55 г/л (рис. 4.6б).

Таким образом, установлено, что возможно и целесообразно синтезировать ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574 на питательной среде с мелассой без дополнительного внесения минеральных веществ и азота.

Показано, что для интенсификации биосинтеза ЭПС культивирование штамма *P. mucilaginosus* 574 целесообразно проводить на питательной среде, содержащей 2 % мелассы, при температуре  $30 \pm 1$  °С и рН  $6,0 \pm 0,2$  с добавлением 0,1 % кукурузного экстракта в качестве индуктора синтеза ЭПС. Максимальная концентрация ЭПС 9,55 г/л может быть получена с внесением 5 % инокулята после 24 ч инокуляции при соотношении объема воздуха к объему среды 4,0:1,0. Полученные результаты исследований рекомендуются для разработки технологии производства биопрепаратов сельскохозяйственного назначения [253].

## ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ УТИЛИЗАЦИИ УГЛЕВОДОВ КЛЕТЧАТКИ ОДНОЛЕТНИХ И МНОГОЛЕТНИХ РАСТЕНИЙ БАКТЕРИЯМИ *P. MUCILAGINOSUS* И *P. SALINICAENI*

Возможность утилизации клетчатки однолетних и многолетних растений микроорганизмами является важным признаком пригодности микроорганизмов к использованию в качестве микробиологических удобрений и кормовых добавок.

Рисовая шелуха – отход однолетних растений, в которой содержится от 60 до 80 % органических веществ, таких как целлюлоза, гемицеллюлозы (в основном пентозаны), лигнин, незначительное количество белка, жира, витаминов и минеральных веществ, содержание которых изменяется в зависимости от географии места и агротехнических способов возделывания риса [254]. Учитывая значительное количество, а также доступность органических веществ в рисовой шелухе, представляется целесообразным использовать этот отход в качестве сырья при производстве питательных сред для культивирования микроорганизмов в промышленных условиях. Использование данного дешевого источника углерода позволит организовать экономически эффективное производство биопрепаратов сельскохозяйственного назначения. В этой связи изучалось ферментативная активность бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* по отношению к углеводам ферментализата клетчатки рисовой шелухи.

### 5.1 Получение ферментализата клетчатки рисовой шелухи

Для использования клетчатки рисовой шелухи в качестве источника углерода в питательных средах при культивировании микроорганизмов рисовую шелуху обрабатывали гидроксидом натрия, клетчатку промывали и обрабатывали ферментами, получая РВ.

При обработке рисовой шелухи раствором гидроксида натрия установлено, что с увеличением концентрации щелочи происходит растворение низкомолекулярных фракций клетчатки рисовой шелухи, в частности, простых сахаров, о чем можно судить по величине РВ (рис. 5.1). Наименьшее извлечение

РВ из клетчатки рисовой шелухи в щелок наблюдается при концентрации гидроксида натрия 2,5 %.

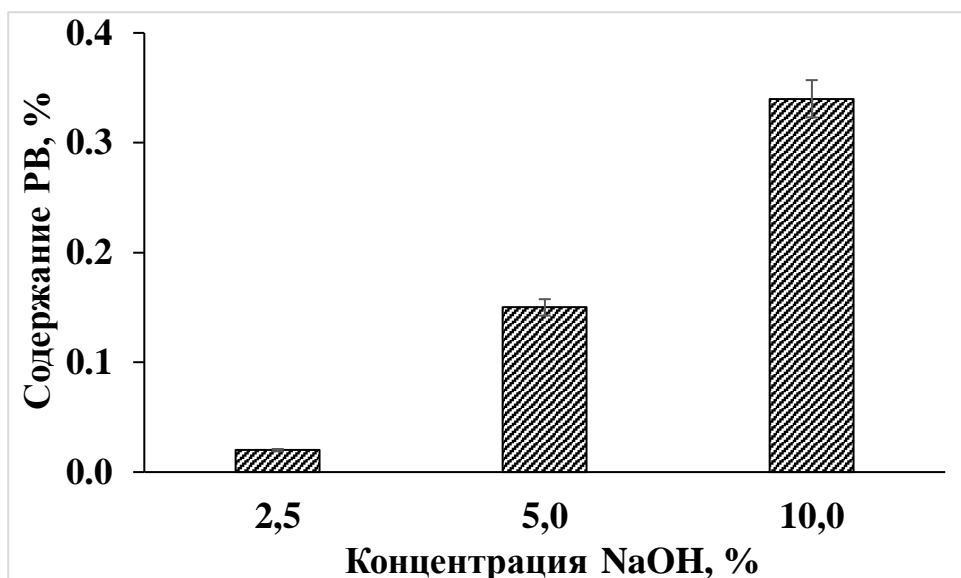


Рисунок 5.1 – Влияние концентрации гидроксида натрия на содержание РВ в щелоках при температуре обработки  $120 \pm 1$  °С в течение 20 мин

Исследования показали, что при обработке рисовой шелухи гидроксидом натрия концентрацией 2,5 % увеличилось содержание целлюлозы до 89,0 %, содержание гемицеллюлозы и лигнина снизилось, соответственно, до 6,0 и 4,0 %. После щелочной обработки рисовой шелухи увеличилась удельная площадь поверхности с 0,3 м<sup>2</sup>/г в исходном сырье до 2,5 м<sup>2</sup>/г (табл. 5.1). Следует полагать, что указанные выше изменения физико-химических свойств клетчатки рисовой шелухи обуславливают более эффективный контакт ферментного препарата Accellerase с субстратом, на что указывают результаты исследований в ранее опубликованной работе [255].

Таблица 5.1 – Состав клетчатки рисовой шелухи до и после щелочной обработки

Наименование компонента	Состав клетчатки до щелочной обработки	Состав клетчатки после щелочной обработки
Целлюлоза, %	38,7	89,0
Гемицеллюлоза, %	18,9	6,0
Лигнин, %	19,4	4,0
Сырой белок, %	1,8	-
Сырой жир, %	0,4	-
Минеральные вещества, %	13,2	0,5
Удельная площадь поверхности, м <sup>2</sup> /г	0,3	2,5

Рентгенофлуоресцентный анализ показал, что при щелочной обработке рисовой шелухи гидроксидом натрия в щелок экстрагируются минеральные вещества, состав и количество которых представлено в таблице 5.2.

Из представленных результатов исследований следует, что при щелочной обработке рисовой шелухи выделяется кремний в количестве 5,6 масс. %. Соответственно, как и указано во многих публикациях [256, 257], рисовая шелуха может являться источником диоксида кремния. Кроме этого, в щелоке содержатся макро- и микроэлементы P, S, K, Ca, Mn, Fe. Следует ожидать, что разделение клетчатки рисовой шелухи и кремния с макро- и микроэлементами в рассматриваемых условиях будет способствовать эффективному ферментолиту клетчатки с получением простых сахаров.

Таблица 5.2 – Массовая доля элементов (масс. %) в щелоке при обработке рисовой шелухи гидроксидом натрия концентрацией 2,5 % в течение 20 мин при температуре  $120 \pm 1$  °C

Na	Si	P	S	K	Ca	Mn	Fe
1,1	5,6	0,2	0,1	0,5	0,006	0,003	0,004

Обработка полученной клетчатки рисовой шелухи ферментными препаратами Accellerase показала, что на содержание РВ в ферментолите влияют активность и расход ферментов, температура и продолжительность ферментативной обработки. Установлено, что максимальное содержание РВ в ферментолите наблюдается после 24 ч обработки клетчатки рисовой шелухи. Содержание РВ в ферментолите при обработке клетчатки рисовой шелухи ферментным препаратом Accellerase 1500 больше, чем при обработке клетчатки рисовой шелухи ферментным препаратом Accellerase XY (рис. 5.2).

Полученные результаты можно объяснить наличием в использованных комплексных ферментных препаратах Accellerase ферментов с различной активностью. В частности, в ферментном препарате Accellerase 1500 присутствуют эндоглюканаза, экзоглюканаза, гемицеллюлаза,  $\beta$ -глюкозидаза, которые способствуют более эффективному ферментативному гидролизу

клетчатки рисовой шелухи по сравнению с ферментным препаратом Accellerase XY, в котором присутствует преимущественно целлюлаза и ксиланаза.

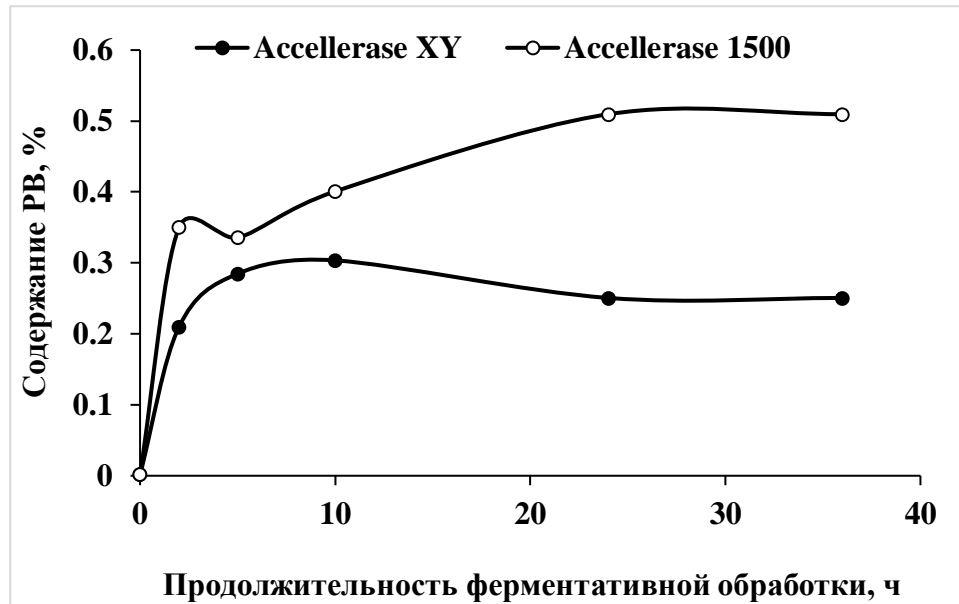


Рисунок 5.2 – Влияние ферментных препаратов и продолжительности обработки клетчатки рисовой шелухи на содержание РВ в ферментализате. Температура обработки  $55 \pm 1$  °С, рН  $5,5 \pm 0,2$

Методом ГЖХ был определен состав ферментализата (хроматограмма показана на рисунке 5.3), полученного из клетчатки рисовой шелухи (табл. 5.3).

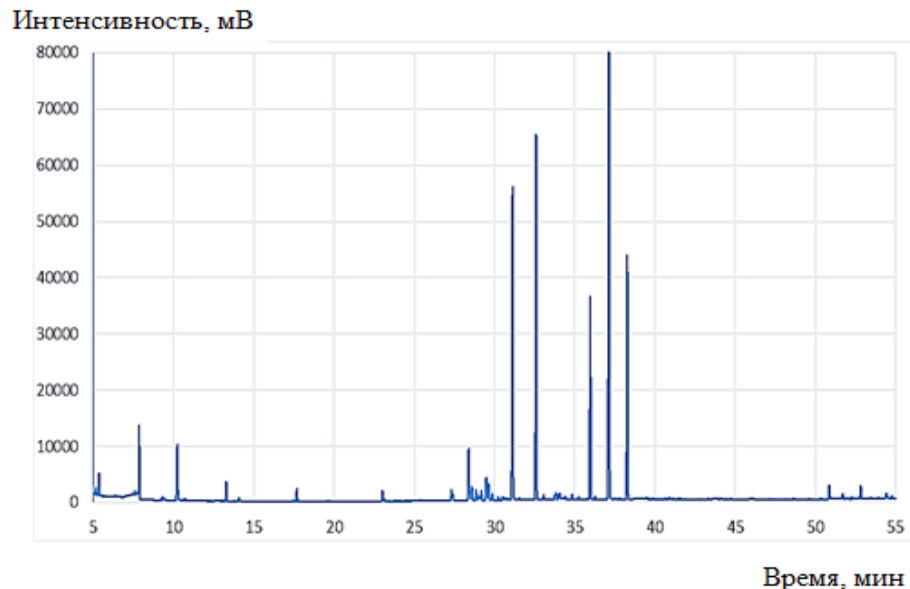


Рисунок 5.3 – Выходная кривая ГЖХ триметилсилильных производных ферментализата клетчатки рисовой шелухи. Время выхода компонентов приведено в таблице 5.3

Таблица 5.3 – Химический состав ферментолизата клетчатки рисовой шелухи после ферментативного гидролиза по данным ГЖХ

Название (время выхода, мин)	мг/л	% от АСВ
<b>Углеводы</b>		
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 (33,8/34/34,1)	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
<b>Органические кислоты</b>		
Молочная (10,2)	21,26	1,06
Изолимонная (34,2)	11,20	0,56
Винная (29,1)	2,77	0,14
Адипиновая (25,0)	0,98	0,05
Энантовая (13,8)	0,92	0,05
2-Оксоглутаровая (26,8)	0,84	0,04
Каприновая (23,4)	0,46	0,02
<b>Жирные кислоты</b>		
Лауриновая (29,0)	23,53	1,17
Пальмитиновая (39,0)	3,82	0,19
Миристиновая (34,2)	2,80	0,14
Стеариновая (43,3)	2,04	0,10
Маргариновая (41,2)	1,96	0,10
Арахидиновая (47,3)	1,07	0,05
<b>Аминокислоты</b>		
Глутаминовая кислота (27,3)	85,60	4,25
Лизин (30,9)	12,85	0,64
Аланин (10,7)	9,38	0,47
Треонин (19,7)	3,86	0,19
Оксипролин (26,3)	2,42	0,12
Изолейцин (16,7)	0,88	0,04

Как видно из представленных данных в таблице 5.3, в состав ферментолизата входит 90 % РВ от общей массы АСВ, в том числе, 47 % ксилозы, 33 % глюкозы и 10 % других сахаров. Кроме того, в составе клетчатки рисовой шелухи установлено наличие аминокислот (6 %), жирных и органических кислот (~4 %). Содержание различных аминокислот, включая аланин, глутаминовую кислоту, оксипролин, изолейцин, лизин, треонин соответствует результатам исследований, опубликованным в работе [258].

Таким образом, ферментолитат клетчатки рисовой шелухи, полученный после щелочной и ферментативной обработки, может быть использовать в качестве основного субстрата для культивирования бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* [259].

## 5.2 Культивирование бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательной среде с ферментолитатом клетчатки рисовой шелухи

Способность роста бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* определяли на агаризованной питательной среде, приготовленной на основе полученного ферментолитата клетчатки рисовой шелухи (рис. 5.4).

Установлено, что все штаммы бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* хорошо растут на нейтральной питательной среде, полученной после корректировки рН среды гидроксидом кальция (рис. 5.4а). На слабокислой питательной среде (рН 5,5) наблюдался рост только одного штамма *P. salinicaeni* 17-6 (рис. 5.4б). Полученные результаты, отражающие влияние рН на рост исследуемых бактерий, использованы при глубинном культивировании рассматриваемых микроорганизмов на питательной среде, приготовленной на основе ферментолитата клетчатки рисовой шелухи.

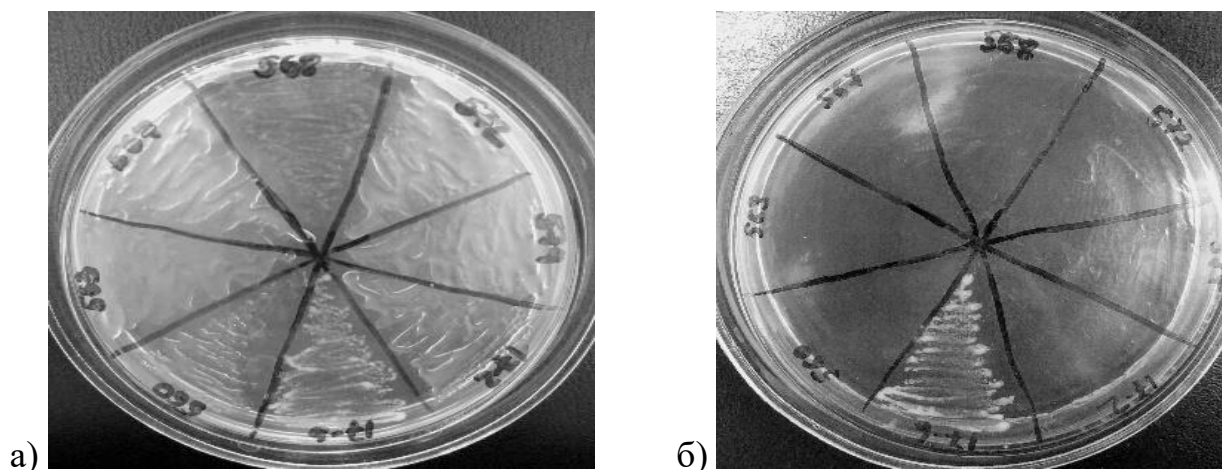


Рисунок 5.4 – Характер роста штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 и штамма *P. salinicaeni* 17-6 на агаризованной питательной среде с ферментолитатом клетчатки рисовой шелухи при температуре  $30 \pm 1$  °C в течение 72 ч при рН а)  $7,3 \pm 0,2$ , б)  $5,5 \pm 0,2$



Проведено глубинное культивирование штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 и штамма *P. salinicaeni* 17-6 на питательной среде, приготовленной на основе ферментолита клетчатки рисовой шелухи, нейтрализованной гидроксидом кальция.

Следует отметить, что в начальный период культивирования исследуемых бактерий на питательной среде с ферментолитом рисовой шелухи происходит изменение рН культуральной жидкости в сторону более кислых значений, по-видимому, это связано с накоплением органических кислот (рис. 5.5).

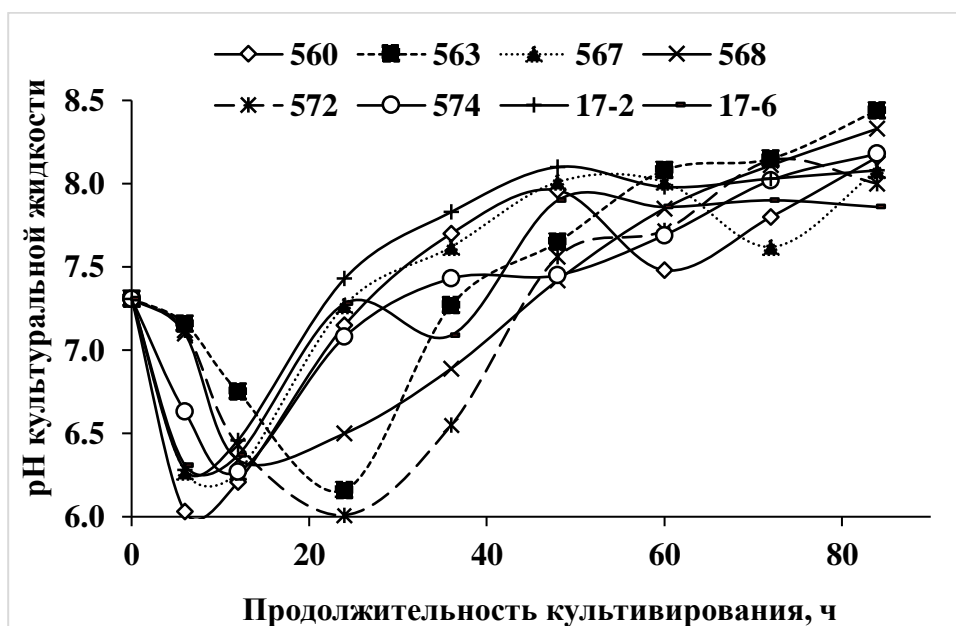


Рисунок 5.5 – Изменение рН культуральной жидкости при культивировании бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательной среде с ферментолитом клетчатки рисовой шелухи, нейтрализованной гидроксидом кальция

При дальнейшем культивировании рН среды повышается. Увеличение рН среды может быть обусловлено двумя причинами. С одной стороны, увеличение рН, возможно, связано с деградацией белков и аминокислот, изначально присутствующих в ферментолите клетчатки рисовой шелухи (табл. 5.3), в аммиак, который повышает рН среды до слабощелочной [260]. С другой стороны, при аэробном дыхании микроорганизмов увеличивается концентрация анионов  $\text{CO}_3^{2-}$  в питательной среде, которые, возможно, вступают в реакцию с катионом

кальция, присутствующим в среде, с образованием нерастворимой соли  $\text{CaCO}_3$ , что способствует увеличению pH среды [261].

Были определены параметры роста штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* при глубинном культивировании на питательной среде с ферментативным гидролизатом рисовой шелухи (табл. 5.4).

Таблица 5.4 – Параметры роста бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* при культивировании на питательной среде с ферментализатом клетчатки рисовой шелухи после нейтрализации гидроксидом кальция при температуре  $30 \pm 1$  °C в течение 72 ч

Штаммы бактерий	Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>	Время генерации, ч	Концентрация биомассы, г/л	Потребление РВ, %	Содержание белков в КЖ, г/л
<i>P. mucilaginosus</i> 560	0,21±0,02	3,33±0,03	2,37±0,20	86,36±4,50	2,62±0,10
<i>P. mucilaginosus</i> 563	0,09±0,02	9,98±0,25	2,17±0,20	81,10±4,50	3,30±0,12
<i>P. mucilaginosus</i> 567	0,14±0,01	4,96±0,04	2,96±0,20	78,48±4,50	2,25±0,08
<i>P. mucilaginosus</i> 568	0,12±0,01	5,57±0,04	2,96±0,20	82,42±4,50	3,10±0,12
<i>P. mucilaginosus</i> 572	0,10±0,01	6,81±0,04	2,17±0,20	83,73±4,50	3,46±0,13
<i>P. mucilaginosus</i> 574	0,08±0,01	8,99±0,03	2,37±0,20	77,16±4,50	3,06±0,11
<i>P. mucilaginosus</i> 17-2	0,15±0,01	4,52±0,04	2,17±0,20	67,97±4,50	1,90±0,07
<i>P. salinicaeni</i> 17-6	0,16±0,02	4,39±0,04	2,96±0,20	70,60±4,50	3,06±0,11

Показано, что биомасса, синтезируемая рассматриваемыми штаммами бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* при культивировании на питательной среде, в которой 0,5 % РВ были введены с ферментализатом клетчатки рисовой шелухи, находилась в диапазоне от 2,17 до 2,96 г/л. Эффективность потребления РВ составила 67 – 86 %.

Как следует из представленных результатов в таблице 5.4, по удельной скорости роста, времени генерации и потреблению РВ наиболее эффективно протекает культивирование на питательной среде с ферментализатом клетчатки рисовой шелухи штамма *P. mucilaginosus* 560.

С ростом бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* в питательную среду выделялись целлюлазы, целлобиазы, ксиланазы, которые способствовали ферментативному гидролизу олигомеров клетчатки рисовой шелухи в питательной среде до глюкозы и ксилозы. К концу культивирования после отделения бактериальных клеток центрифугированием в культуральной жидкости присутствовали белки концентрацией от 1,90 до 3,46 г/л. На это указывает

значение активности ферментов, представленных на рисунке 5.6, и удельной активности ферментов, представленных на рисунке 5.7.

В общем случае для внеклеточных ферментов, в том числе целлюлазы, секретируемой бактериями *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*, наблюдаются один или два пика активности. Для каждого штамма имеется свой пик активности с характерным временем инкубации (рис. 5.6а). При культивировании штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560, 563, 567, 568, 572 и штамма *P. salinicaeni* 17-6 появлялся первый пик после 12 ч культивирования и штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 574 и 17-2 – после 24 ч культивирования. Второй пик активности проявлялся после 48 ч культивирования штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560, 568 и штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 563, 572, 574, 17-2 и *P. salinicaeni* 17-6 после 72 ч культивирования. Колебание наблюдаемой ферментативной активности бактерий может быть связано с синтезом бактериями внеклеточных полисахаридов, которые на другой фазе роста могут являться дополнительным источником углерода для бактерий. Отмечена максимальная активность целлюлазы после 12 ч культивирования штамма *P. mucilaginosus* 560, которая достигает до 2 ед/мл (рис. 5.6а) или 1199 ед/г белка, соответственно, по удельной активности (рис. 5.7а) при снижении рН среды до 6,0.

Кроме целлюлазы в культуральной жидкости установлено наличие ксиланазы, гидролизующей  $\beta$ -гликозидные связи в молекуле гетерогенного полисахарида ксилана с образованием олигоксиланов меньшей молекулярной массы вплоть до мономерного соединения – ксилозы. Максимальная активность ксиланазы наблюдалась после 48 ч и 72 ч при культивировании штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 563 при повышении рН среды до 8,0. При этом активность ксиланазы достигала 7 ед/мл (рис. 5.6б) или 2046 ед/г белка, соответственно, по удельной активности (рис. 5.7б).

Следует отметить, что все исследуемые штаммы бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* обладали незначительной активностью целлобиазы (ниже 1 ед/мл, рис. 5.6в) при их культивировании на питательной среде с ферментализатом рисовой шелухи. Максимальная активность целлобиазы 0,63 ед/мл и удельная активность 231 ед/г белка достигались после 24 ч и 72 ч культивирования для штамма *P. mucilaginosus* 560 и после 48 ч культивирования для штамма *P. salinicaeni* 17-6.

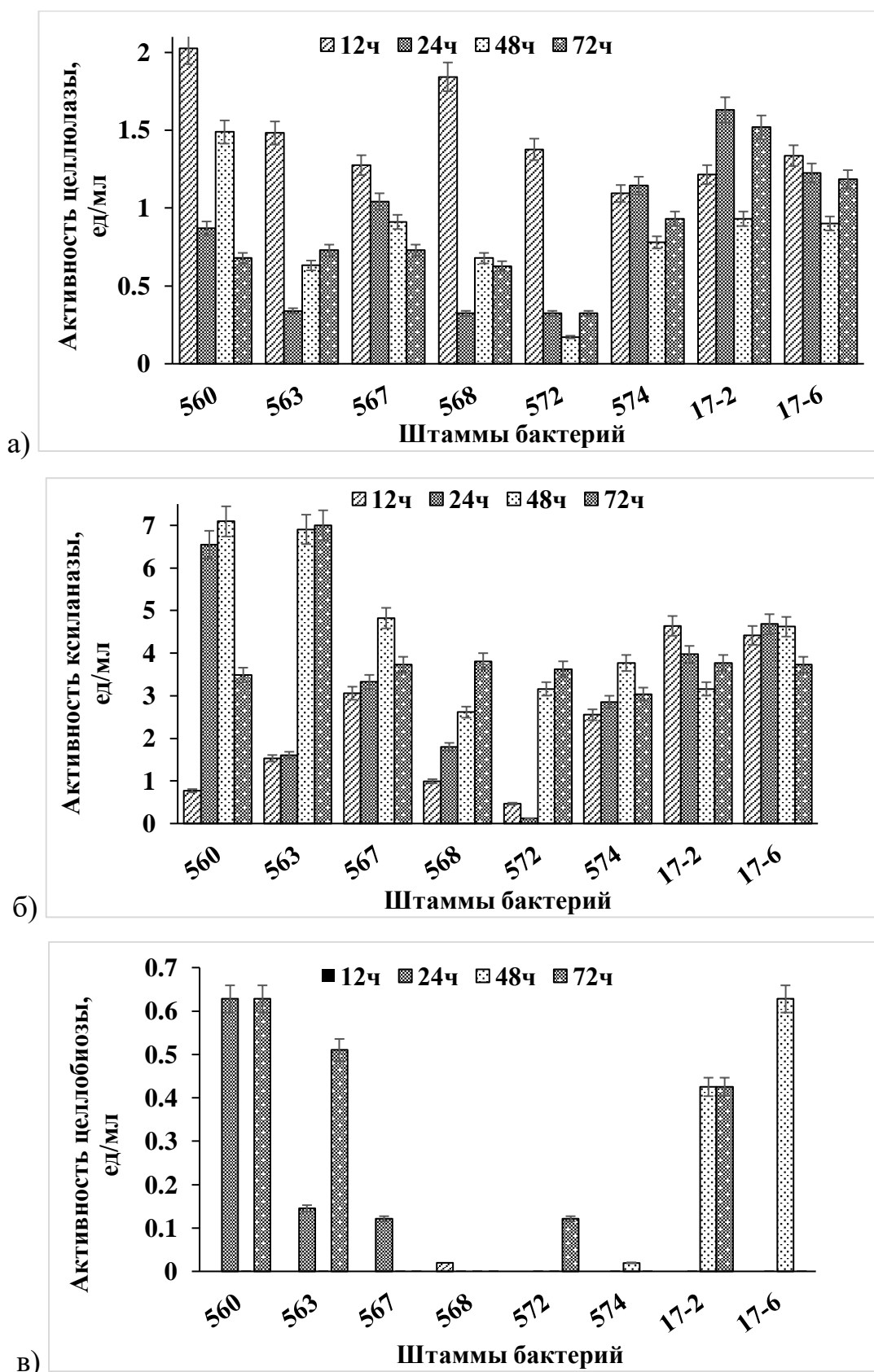


Рисунок 5.6 – Активность целлюлазы (а), ксиланазы (б) и целлобиазы (в), синтезируемых бактериями *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* при глубинном культивировании на питательной среде с ферментолизатом клетчатки рисовой шелухи (скорость перемешивания  $200 \text{ мин}^{-1}$ , температура  $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ )

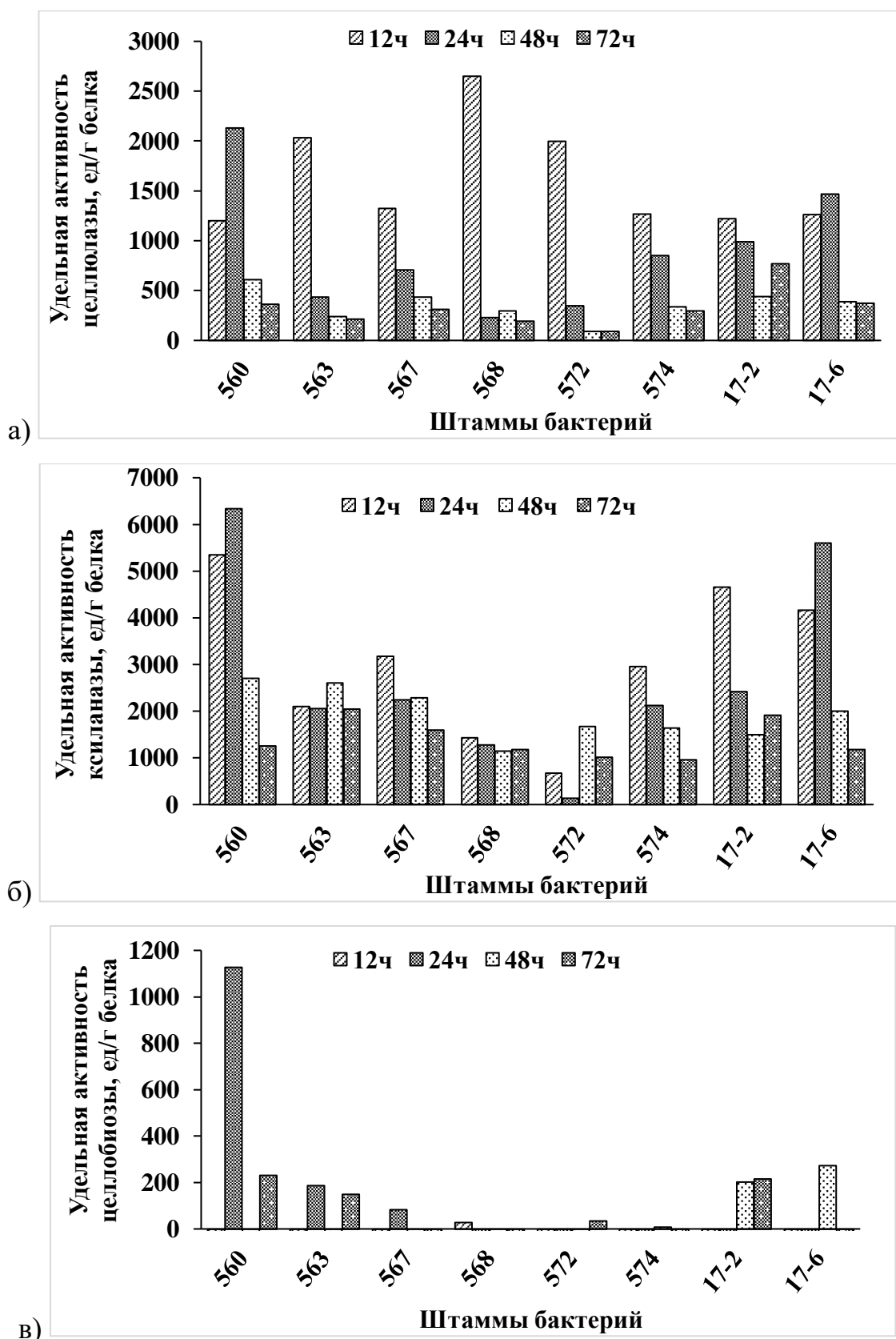


Рисунок 5.7 – Удельная активность целлюлазы (а), ксиланазы (б) и целлобиазы (в), синтезируемых бактериями *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* при глубинном культивировании на питательной среде с ферментоллизатом клетчатки рисовой шелухи (скорость перемешивания  $200 \text{ мин}^{-1}$ , температура  $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ )

Таким образом, биосинтез внеклеточных целлюлазы и целлобиазы происходит на логарифмической стадии культивирования, тогда как ксиланаза секретировалась в стационарной фазе роста бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* с большой активностью после, соответственно, 48 ч и 72 ч культивирования. При этом активность ксиланазы выше, чем активность целлюлазы и целлобиазы, что согласуется с преобладанием в субстрате ксилозы, в соответствии с данными ГЖХ, представленными в таблице 5.3.

Исходя из представленных результатов можно сделать вывод, что для получения гидролитического фермента, в частности, ксиланазы, наибольшая эффективность достигается при культивировании штамма *P. mucilaginosus* 560 на питательной среде с ферментолизатом клетчатки рисовой шелухи [259]. 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.

### **5.3 Определение влияния условий культивирования на синтез ксиланазы штаммом *P. mucilaginosus* 560**

#### **5.3.1 Влияние содержания РВ в ферментолизате клетчатки рисовой шелухи на рост и синтез ксиланазы штаммом *P. mucilaginosus* 560**

Экономически целесообразными и, соответственно, перспективными источниками углерода являются субстраты, полученные из вторичных ресурсов переработки растительного сырья, образующиеся при переработке сельскохозяйственных культур и древесостоев. Как правило, зерновая шелуха, солома, отруби, древесные опилки содержат значительное количество ксиланов.

Проведенными экспериментами установлено влияние содержания РВ в ферментолизате клетчатки рисовой шелухи на рост и активность ксиланазы, секретлируемой штаммом *P. mucilaginosus* 560 (рис. 5.8 и табл. 5.5).

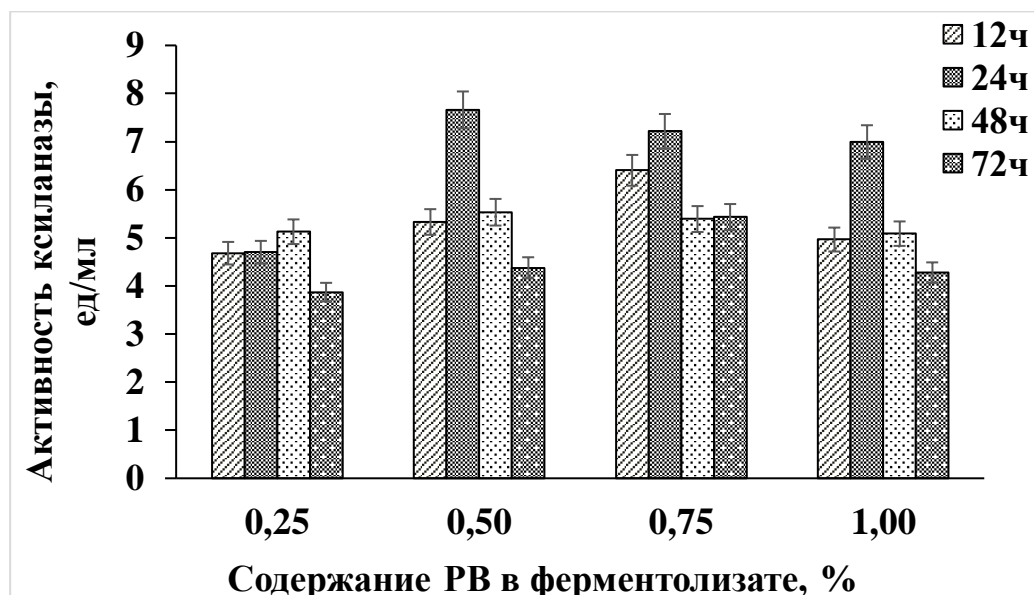


Рисунок 5.8 – Влияние содержания РВ в ферментоллизате клетчатки рисовой шелухи на ксиланазную активность штамма *P. mucilaginosus* 560

Таблица 5.5 – Влияние содержания РВ в ферментоллизате клетчатки рисовой шелухи на параметры роста штамма *P. mucilaginosus* 560

Содержания РВ, %	Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>	Время генерации, ч	Концентрация биомассы, г/л
0,25	0,17±0,05	4,10±0,59	0,83±0,10
0,50	0,22±0,03	3,09±0,41	2,17±0,20
0,75	0,26±0,05	2,71±0,25	2,17±0,20
1,00	0,23±0,05	2,96±0,30	3,00±0,30

Установлено, что с повышением содержания РВ активность фермента увеличивалась (рис. 5.8), снижалось время генерации и повышалась удельная скорость роста штамма *P. mucilaginosus* 560 (табл. 5.5). Максимальная активность ксиланазы достигала 7,66 ед/мл после 24 ч культивирования при содержании РВ в ферментоллизате клетчатки рисовой шелухи 0,5 %. При этом содержании РВ наблюдается максимальное накопление биомассы до 2,17 г/л.

### 5.3.2 Влияние температуры культивирования на рост и синтез ксиланазы штаммом *P. mucilaginosus* 560

Исследование влияния температуры при культивировании штамма *P. mucilaginosus* 560 на питательной среде, содержащей 0,5 % общего РВ в ферментоллизате клетчатки рисовой шелухи, было установлено, что для синтеза

ксилаказы оптимальной температурой является  $30 \pm 1$  °С, которая соответствует и эффективным параметрам роста рассматриваемого штамма (рис. 5.9, табл. 5.6).

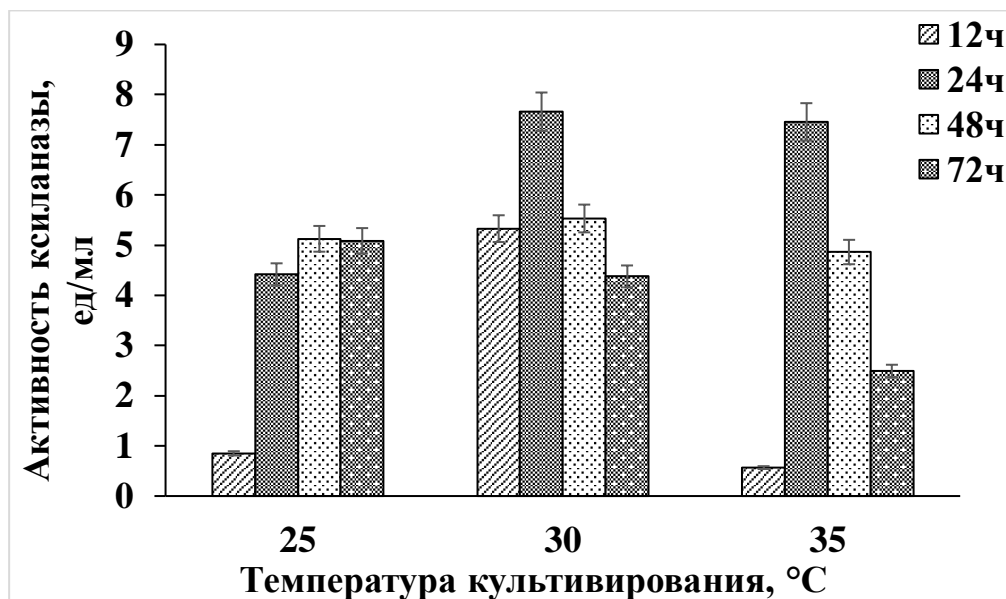


Рисунок 5.9 – Влияние температуры культивирования на ксиланазную активность штамма *P. mucilaginosus* 560

Таблица 5.6 – Влияние температуры культивирования на параметры роста штамма *P. mucilaginosus* 560

Температура, °С	Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>	Время генерации, ч	Концентрация биомассы, г/л
$25 \pm 1$	$0,11 \pm 0,04$	$6,45 \pm 0,66$	$1,50 \pm 0,10$
$30 \pm 1$	$0,15 \pm 0,03$	$4,54 \pm 0,48$	$2,25 \pm 0,20$
$35 \pm 1$	$0,24 \pm 0,03$	$2,86 \pm 0,14$	$1,75 \pm 0,20$

При повышении температуры культивирования до  $35 \pm 1$  °С увеличивалась удельная скорость роста и снижалось время генерации в 2 раза по сравнению с температурой  $25 \pm 1$  °С и в 1,5 раза по сравнению с температурой  $30 \pm 1$  °С. Однако, концентрация биомассы рассматриваемого штамма при температуре культивирования  $25 \pm 1$  °С и  $35 \pm 1$  °С было ниже по сравнению с концентрацией биомассы при температуре  $30 \pm 1$  °С (табл. 5.6).

### 5.3.3 Влияние рН среды на рост и синтез ксиланазы штаммом *P. mucilaginosus* 560

Значительное влияние на активность ксиланазы и рост штамма *P. mucilaginosus* 560 оказывает рН среды (рис. 5.10). Установлено влияние факторов



корректировки pH среды на активность и рост продуцента ксиланазы. В таблице 5.7 показано, что при применении в качестве корректора pH среды раствора щелока, содержащего аморфный кремний, полученный после щелочной обработки рисовой шелухи, ускоряется размножение клеток бактерий и увеличивается их удельная скорость роста. При корректировке pH питательной среды раствором щелока, содержащего аморфный кремний, или раствором гидроксида натрия наблюдалась невысокая активность ксиланазы и незначительное накопление биомассы исследуемого штамма (рис. 5.10а, табл. 5.7).

Максимальное накопление биомассы наблюдается при корректировке pH питательной среды гидроксидом кальция (табл. 5.7). Это связано с ролью кальция в процессе регулирования многих клеточных функций. Известно, что кальций участвует в процессе стабилизации липополисахаридного слоя внешней мембраны и клеточных стенок у грамотрицательных бактерий [262] и, как было доказано в работе [263], кальций позволяет повысить продуктивность синтеза белка микроорганизмами, что в общем влияет на выход биомассы и активность фермента. Максимальная активность ксиланазы (11 ед/мл) наблюдалась после 48 ч культивирования бактерий *P. mucilaginosus* 560 при корректировке pH среды гидроксидом кальция (рис. 5.10а), что, по-видимому, связано со способностью стабилизации и регулирования активности ферментов ионами кальция [264-266].

Таблица 5.7 – Влияние факторов корректировки pH и значения pH среды на параметры роста штамма *P. mucilaginosus* 560

Параметры	Варьирование параметров	Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>	Время генерации, ч	Концентрация биомассы, г/л
Корректоры pH	Гидроксид кальция	0,21 ± 0,02	3,29 ± 0,27	2,46 ± 0,25
	Гидроксид натрия	0,31 ± 0,04	2,25 ± 0,27	2,04 ± 0,15
	Щелок, содержащий аморфный кремний	0,45 ± 0,04	1,54 ± 0,12	1,86 ± 0,20
pH	6,0	0,11 ± 0,01	6,89 ± 0,57	1,50 ± 0,15
	7,0	0,15 ± 0,03	4,54 ± 0,18	2,25 ± 0,20
	8,0	0,20 ± 0,05	3,52 ± 0,10	1,50 ± 0,15

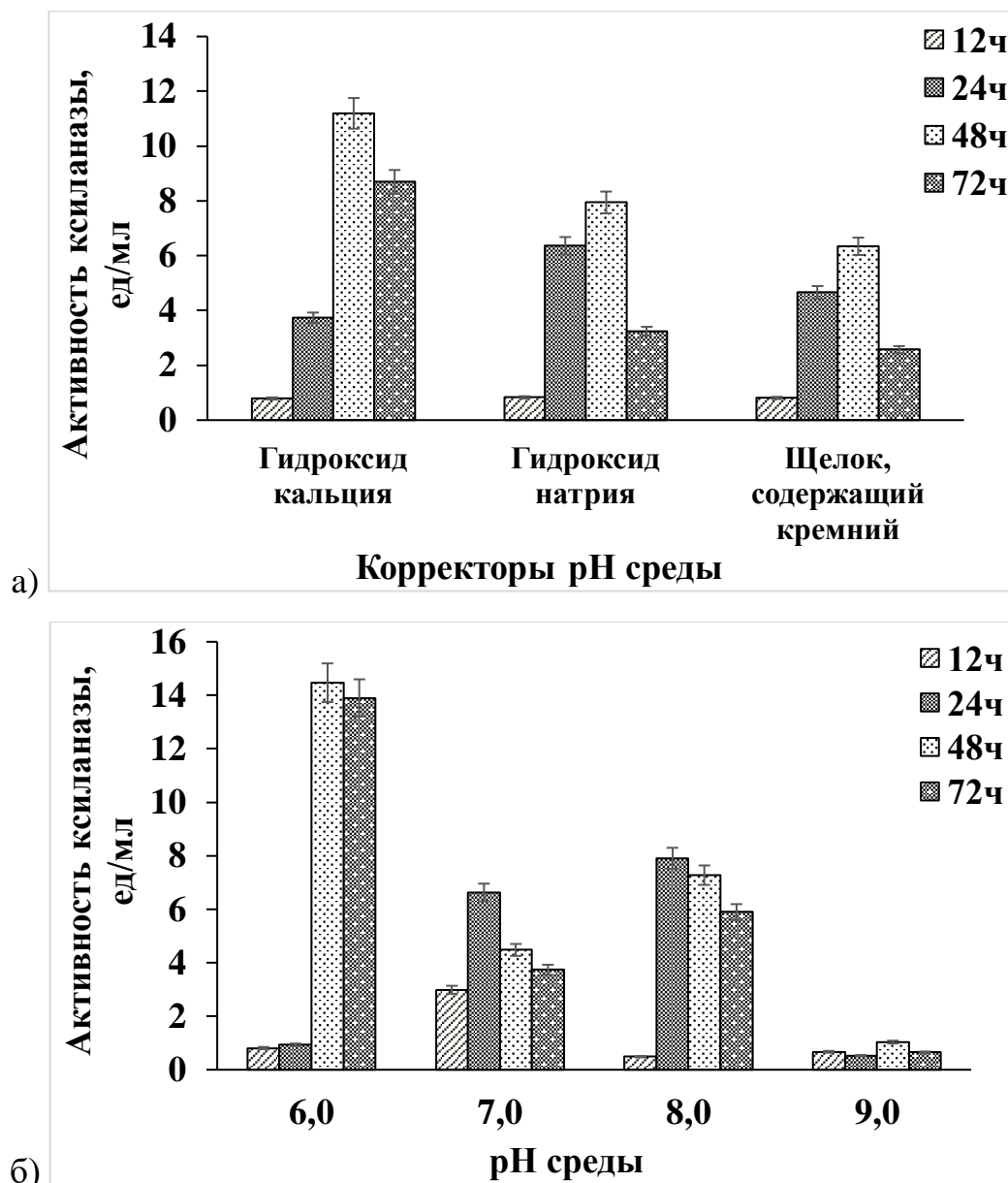


Рисунок 5.10 – Влияние корректоров (а) и рН среды (б) на активность ксиланазы штамма *P. mucilaginosus* 560

Изменяя значения рН среды от 6,0 до 9,0 гидроксидом кальция, установлено, что при рН среды 9,0 рост штамма *P. mucilaginosus* 560 ингибировался. В диапазоне рН среды от 6,0 до 8,0 с увеличением концентрация гидроксида кальция повышалась удельная скорость роста и время генерации снижалось в 2 раза (от 6 ч при рН 6,0 до 3 ч при рН 8,0, табл. 5.7).

Это соответствует результатам, приведенным в работе [267], где показано, что на рост ризобактерий оказывает совместное влияние рН и концентрация ионов кальция. В экспериментах максимальное накопление биомассы 2,25 г/л,

наблюдалось при культивировании бактерий на нейтральной питательной среде рН 7,0 (табл. 5.7). При этом максимальная активность ксиланазы 15 ед/мл, достигалась при рН 6,0 после 48 ч культивирования на питательной среде с ферментолизатом клетчатки рисовой шелухи (рис. 5.10б).

### 5.3.4 Влияние источника углерода на рост и синтез ксиланазы штаммом *P. mucilaginosus* 560

В качестве источников углерода были использованы экстракты ксилана многолетних растений (береза, бук) и ферментолизат клетчатки однолетних растений (рисовая шелуха) с концентрацией 0,5 % по РВ. Оценка роста при культивировании штамма *P. mucilaginosus* 560 на питательных средах с различными источниками ксилана было установлено, что высокая удельная скорость роста и максимальное накопление биомассы (около 3 г/л) наблюдалось при использовании в качестве субстрата экстракта ксилана из бука (табл. 5.8).

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 (рис. 5.11).

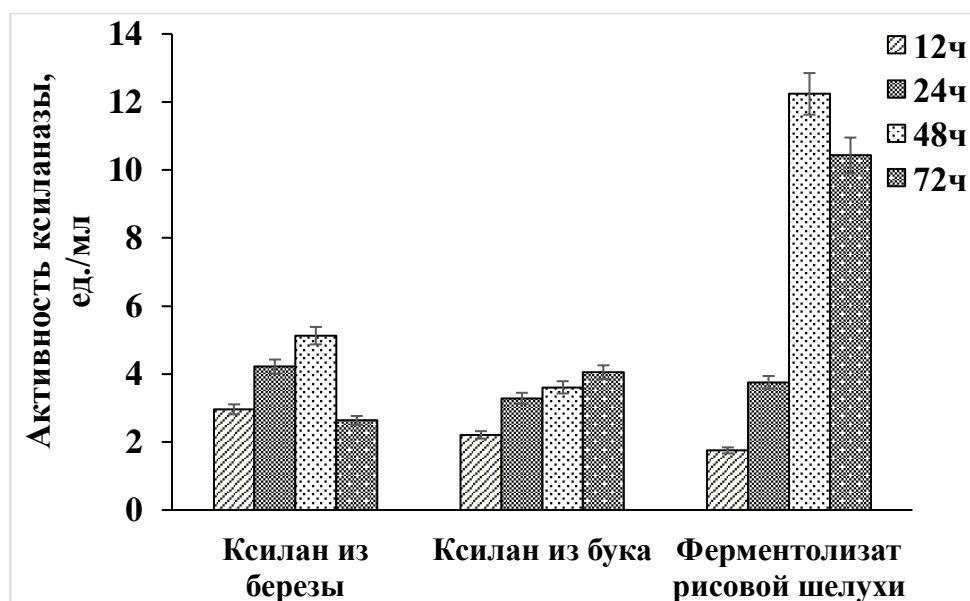


Рисунок 5.11 – Влияние источника ксилана и времени культивирования на ксиланазную активность штамма *P. mucilaginosus* 560

Таблица 5.8 – Влияние источника углерода на параметры роста штамма *P.mucilaginosus* 560

Источники углерода	Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>	Время генерации, ч	Концентрация биомассы, г/л
Экстракт ксилана из березы	0,16 ± 0,02	4,24 ± 0,55	2,23 ± 0,20
Экстракт ксилана из бука	0,20 ± 0,03	3,48 ± 0,25	2,97 ± 0,25
Ферментолизат клетчатки рисовой шелухи	0,21 ± 0,02	3,29 ± 0,27	1,75 ± 0,15

Установленная зависимость объясняется тем, что ферментолизат является продуктом неполного гидролиза рисовой шелухи, содержащим специфические вещества-индукторы, способные значительно увеличивать синтез ксиланазы, что соответствует результатам в работе [268], полученным при синтезе ксиланазы грибами *Aspergillus* и *Trichoderma*. Как показано в работе [269], специфические вещества – индукторы, играют ключевую роль в регуляции биосинтеза ксиланазы. К ним относят ксилозу, ксилобиозу, ксилоолигосахариды, гетеродисахариды ксилозы и их позиционные изомеры, которые образуются при ферментативном гидролизе клетчатки рисовой шелухи согласно данным таблицы 5.3.

### 5.3.5 Влияние возраста инокулята на рост и синтез ксиланазы штаммом *P. mucilaginosus* 560

На ферментолизате клетчатки рисовой шелухи было изучено влияние возраста инокулята на синтез биомассы и ксиланазы штаммом *P.mucilaginosus* 560 (рис. 5.12 и табл. 5.9).

Таблица 5.9 – Влияние возраста инокулята на параметры роста штамма *P. mucilaginosus* 560

Возраст инокулята, ч	Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>	Время генерации, ч	Концентрация биомассы, г/л
0 (контроль)	0,16 ± 0,03	4,36 ± 0,12	1,50 ± 0,15
12	0,15 ± 0,03	4,57 ± 0,15	0,75 ± 0,10
24	0,09 ± 0,01	7,47 ± 0,81	0,83 ± 0,10
36	0,10 ± 0,01	6,77 ± 0,70	1,33 ± 0,15
48	0,13 ± 0,02	5,55 ± 0,71	2,17 ± 0,20

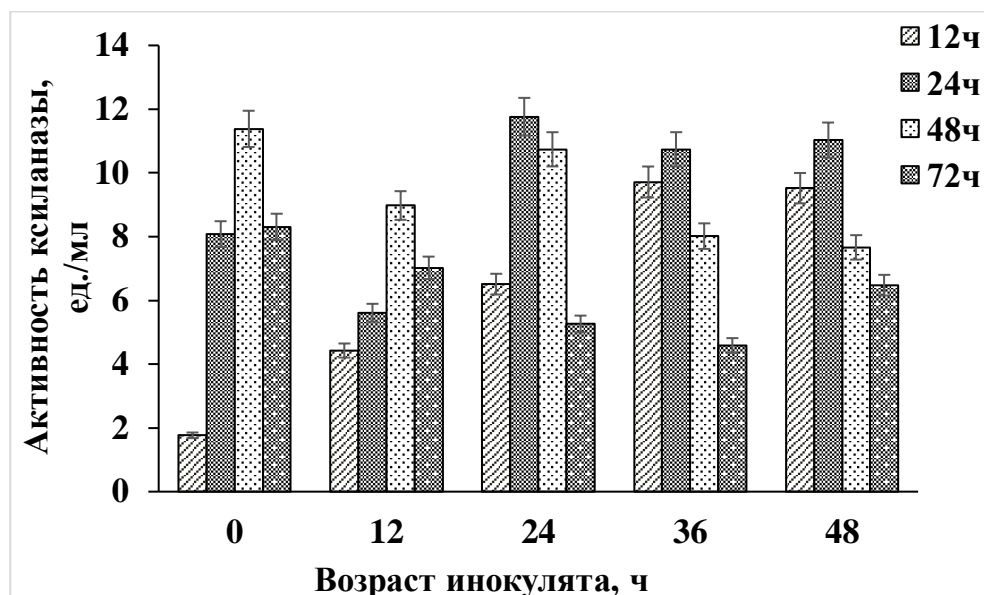


Рисунок 5.12 – Влияние возраста инокулята на ксиланазную активность штамма *P. mucilaginosus* 560

Установлено, что возраст инокулята в рассмотренных условиях существенно не влияет на рост и синтез ксиланаз штаммом *P. mucilaginosus* 560. Соответственно, предварительное приготовление инокулята при проведении экспериментальных исследований в лабораторных условиях, возможно, не является целесообразным.

### 5.3.6 Влияние источника и содержания азота на рост и синтез ксиланазы штаммом *P. mucilaginosus* 560

В работе были использованы неорганические и органические источники азота. Изучение влияния источников азота на биосинтез ксиланазы рассматриваемого штамма показало, что внесение в питательную среду кукурузного экстракта или пептона приводило к увеличению биомассы штамма *P. mucilaginosus* 560 в 1,4 и 1,2 раза, соответственно, по сравнению контролем (табл. 5.10). Возможно, это связано с содержанием в них витаминов, аминокислот и других веществ, которые стимулируют рост исследуемого штамма.

Показано, что максимальная активность ксиланазы достигалась после 48 ч культивирования при внесении в среду карбамида (рис. 5.13а). Содержание в

питательной среде 0,2 % карбамида способствовало увеличению ксиланазной активности от 1,5 до 2,5 раза по сравнению с контролем (без азота) (рис. 5.13б).

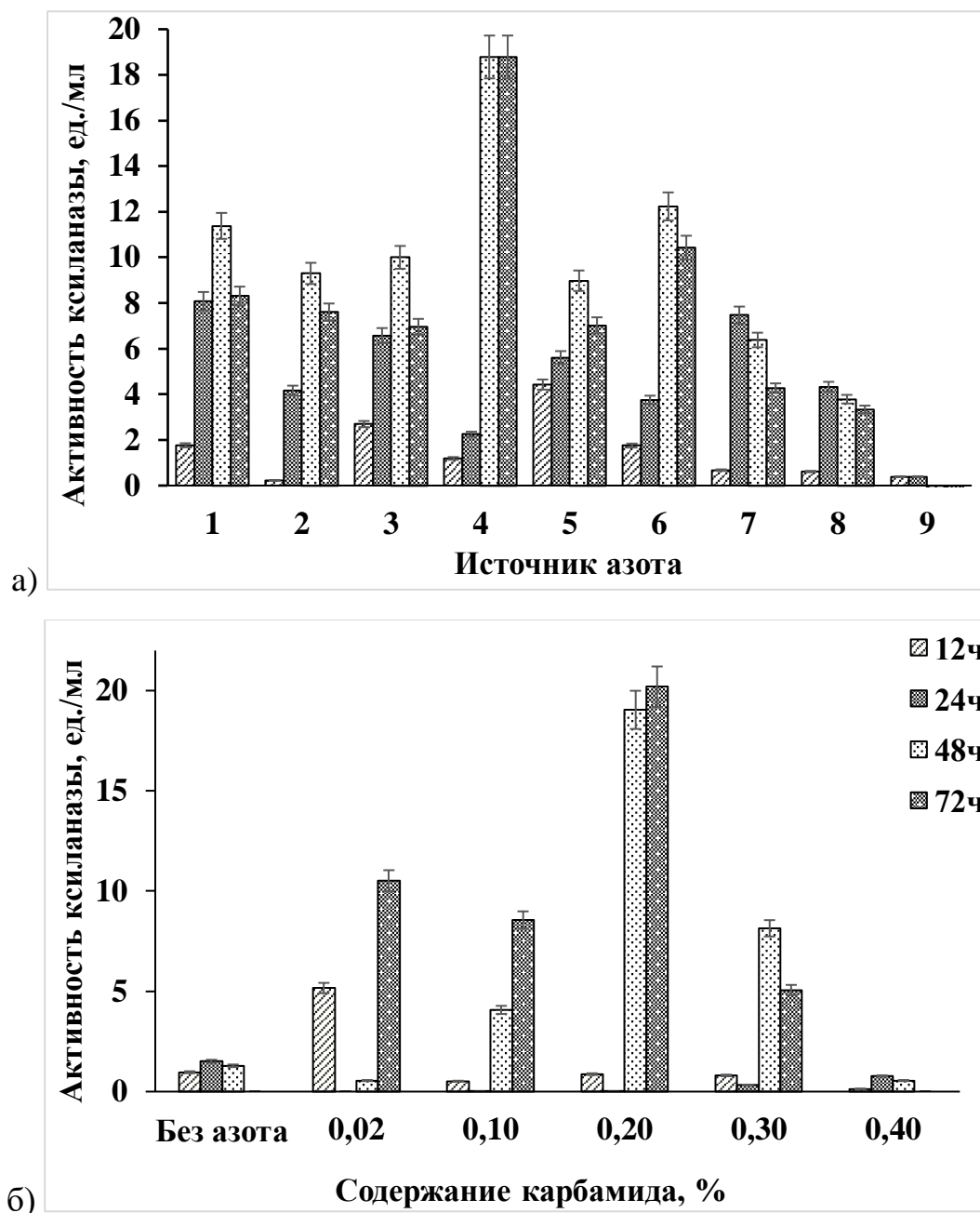


Рисунок 5.13 – Влияние времени культивирования, источника (а) и содержания (б) азота на ксиланазную активность штамма *P. tuiciliginosus* 560. На рисунке 5.13 а: 1 – без источника азота (контроль), 2 –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4 – карбамид, 5 – дрожжевой экстракт, 6 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и дрожжевой экстракт (1:1), 7 – кукурузный экстракт, 8 – пептон, 9 – бетафин

В рекомендованных условиях культивирования исследуемого продуцента температура 30 °С, рН среды 6,0 использован ферментализат клетчатки рисовой шелухи в качестве источника углерода с концентрацией 0,5 % по РВ. При

внесении карбамида в количестве 0,2 % как источника азота максимальная активность синтезируемой ксиланазы достигала 20 ед/мл или 10702 ед/г белка по удельной активности, соответственно, в стационарной фазе [270]. Активность ксиланазы, синтезируемой штаммом *P. mucilaginosus* 560 в этих условиях в 2 раза выше по сравнению с активностью ксиланазы, синтезируемой штаммом *P. campinasensis* BL11 при культивировании в оптимальных условиях на питательной среде, приготовленной на основе рисовой шелухи и соломы, обработанных щелочью (10,5 ед/мл ксиланазы) [271].

Таблица 5.10 – Влияние источника азота на параметры роста штамма *P. mucilaginosus* 560

Источник азота	Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>	Время генерации, ч	Концентрация биомассы, г/л
Без азота (контроль)	0,12±0,01	5,84±0,61	1,75±0,15
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,19±0,02	3,72±0,22	1,75±0,15
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,19±0,02	3,63±0,20	1,75±0,15
Дрожжевой экстракт	0,11±0,01	6,68±0,25	1,75±0,15
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> и дрожжевой экстракт	0,15±0,01	4,67±0,53	1,75±0,15
Кукурузный экстракт	0,06±0,01	12,17±0,74	2,50±0,20
Пептон	0,15±0,01	4,68±0,46	2,00±0,20
Карбамид	0,17±0,03	4,08±0,46	1,50±0,10
Бетафин	0,23±0,05	3,00±0,47	1,50±0,10

#### 5.4 Технологические характеристики ксиланазы, синтезируемой штаммом *P. mucilaginosus* 560

Исследовано влияние pH и температуры среды на активность ксиланазы, синтезируемой штаммом *P. mucilaginosus* 560, культивируемым на ферментализате рисовой шелухи без выделения из культуральной жидкости. В качестве субстрата для определения активности ксиланазы использовался ксилан, выделенный из бука. Полученные результаты представлены на рис. 5.14 а, б.

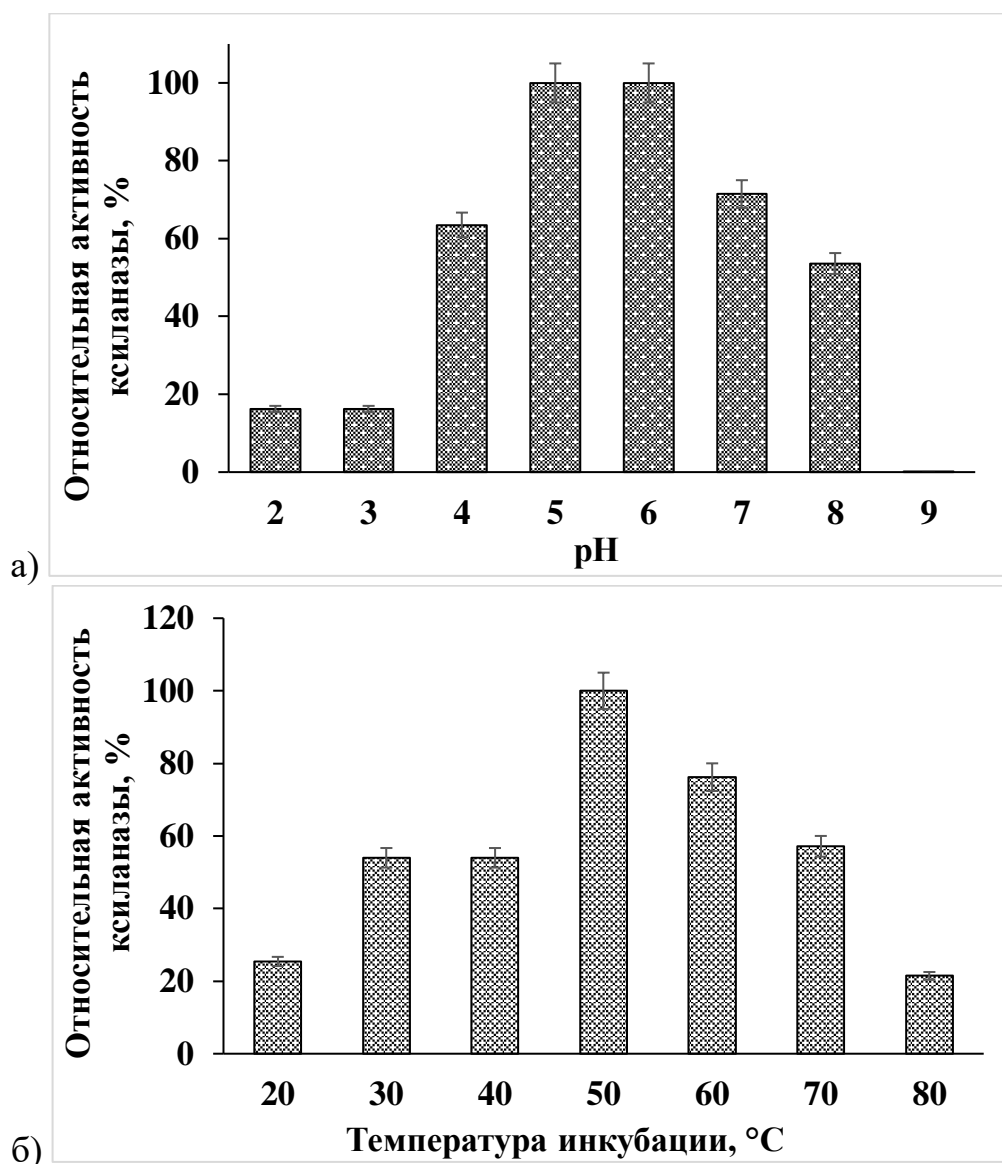


Рисунок 5.14 – Влияние pH (а) и температуры инкубации (б) на активность синтезируемой ксиланазы штаммом *P. mucilaginosus* 560. Субстрат-ксилан бука, время инкубации 60 мин

Установлено, что ксиланаза, секретируемая штаммом *P. mucilaginosus* 560 на питательной среде с ферментолизатом клетчатки рисовой шелухи, проявляла активность в диапазоне pH 2,0 – 8,0 и сохраняла более 50 % активности при pH 3,8 – 8,0. Оптимальный pH определен в диапазоне 5 – 6. При pH 9,0 фермент утрачивал активность.

Максимальная активность ксиланазы, синтезируемой штаммом *P. mucilaginosus* 560 проявляется при температуре  $50 \pm 1^\circ\text{C}$ . Уровень активности



фермента выше 50 % сохранялся при температуре от 30 до 70 °С и резко снижался при более низких и/или высоких температурах.

Установлено, что ксиланаза проявляет умеренную термостабильность. Остаточная активность при пятнадцатиминутном прогревании составила 93, 25 и 19 %, соответственно, температуре прогрева 70 °С, 80 °С и 90 °С (рис. 5.15).

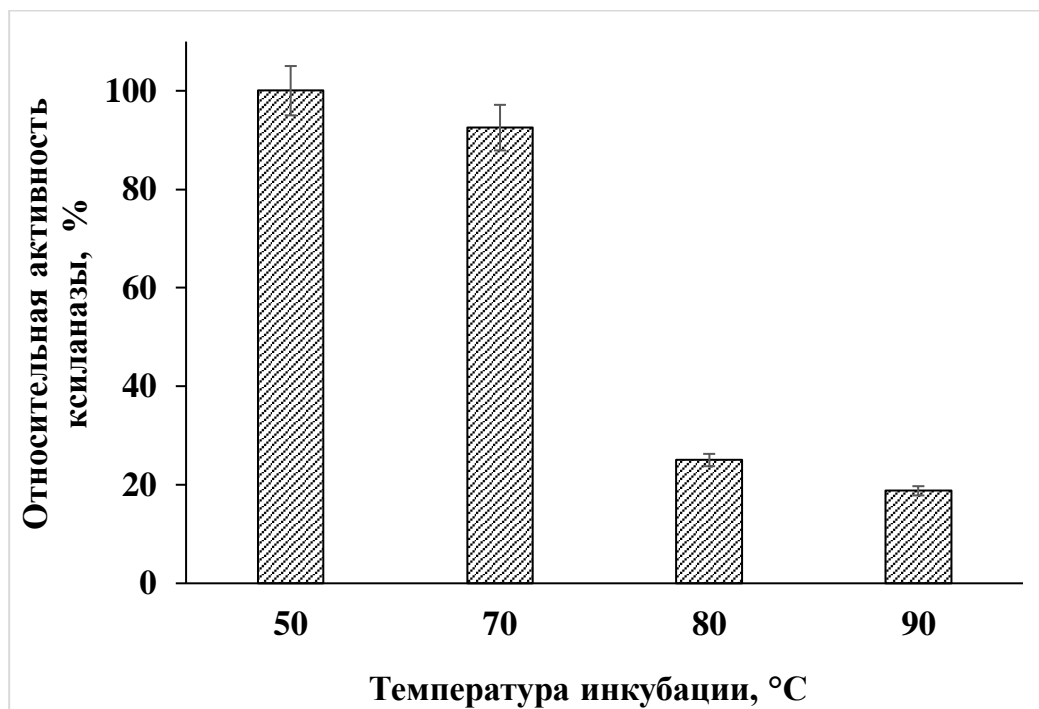


Рисунок 5.15 – Изменение активности ксиланазы при нагревании. Температура инкубирования контроля  $50 \pm 1$  °С

Кроме вышеперечисленных показателей важной характеристикой фермента является субстратная специфичность. Сравнение специфической активности полученных ксиланаз проводили с использованием следующих субстратов: ксилана березы, ксилана бука, арабиногалактана и карбоксиметилцеллюлозы (NaКМЦ) (рис. 5.16). Установлено, что наибольшая специфическая активность ксиланазы проявлялась при использовании ксилана березы в качестве субстрата, чем при использовании в качестве субстрата ксилана бука. По-видимому, это связано со структурой ксилана в растениях.

Установлена активность ферментов при использовании в качестве субстрата арабиногалактана и NaКМЦ, что, по-видимому, связано с наличием в культуральной жидкости, кроме ксиланазы, арабинофуранозидазы, галактаназы и

целлюлазы (рис. 5.16). Индукторами синтеза этих ферментов исследуемого штамма являются, видимо, олигомерные полисахариды арабиногалактан и целлюлоза. Это подтверждается наличием в ферментолизате глюкозы, арабинозы и галактозы, согласно данным в таблице 5.3.

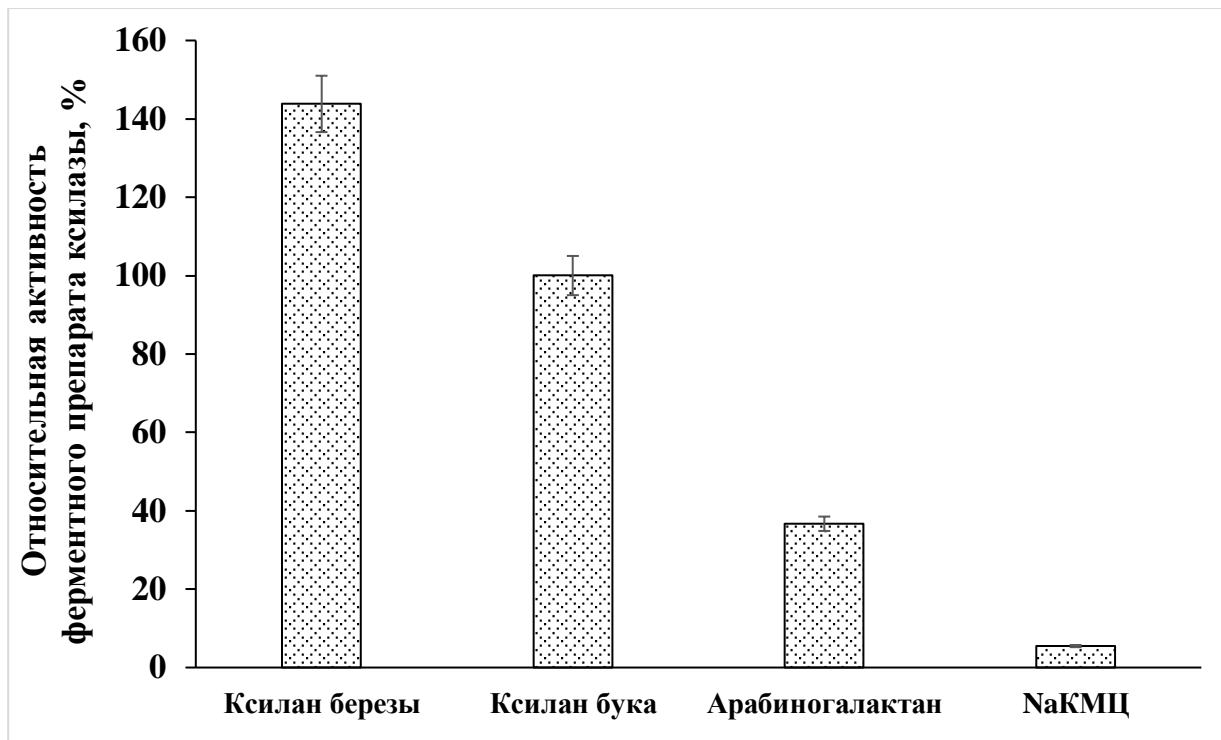


Рисунок 5.16 – Субстратная специфичность ксиланаз при использовании в качестве субстрата ксилана березы, ксилана бука, арабиногалактана и NaКМЦ

Таким образом, ксиланаза, синтезируемая штаммом *P. mucilaginosus* 560, имеет высокую активность при оптимальном значении pH 5,0 – 6,0, температуре  $50 \pm 1$  °C и умеренно термостабильна. 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 как кормовые добавки.

## ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО НАЗНАЧЕНИЯ

### 6.1 Разработка технологии и получение биопрепаратов на основе штамма *P. mucilaginosus* 574

**Биоудобрение.** Сухое микробиологическое удобрение изготавливали в экспериментальных условиях. Культивирование штамма *P. mucilaginosus* 574 проводили на питательной среде, содержащей мелассу, в рекомендованных условиях: содержание мелассы в среде 2 %, температура  $30 \pm 1$  °С, pH  $6,0 \pm 0,2$ , добавление в питательную среду 0,1 % кукурузного экстракта в качестве индуктора синтеза ЭПС, внесение 5 % инокулята от объема среды после 24 ч инокуляции, соотношение объема воздуха к объему среды 4:1. Культивирование осуществлялось в сосудах емкостью 2 л при непрерывном перемешивании со скоростью 150 об/мин на шейкере инкубатора IST-3075R (производитель Jeiotech, Korea). В течение 72 ч культивирования в этих условиях титр исследуемого штамма достигает  $6 \cdot 10^8$  КОЕ/мл, концентрация, синтезируемых ЭПС достигает  $9,0 \pm 0,5$  г/л при вязкости культуральной жидкости 53 mPa\*s.

Далее проводили иммобилизацию бактериальной суспензии на стерильном носителе при соотношении культуральная жидкость : носитель в соответствии 3:4. В качестве носителя использовали дефека́т – отход свеклосахарного производства, получаемый при очистке свекловичного сока. Дефека́т содержит 60 – 80 % CaCO<sub>3</sub>, 0,4 – 0,8 % азота, 0,1 – 2,0 % фосфора и калия и рекомендуется к использованию в сельском хозяйстве в качестве удобрения [272]. Для уничтожения посторонних микроорганизмов дефека́т необходимо стерилизовать при температуре  $200 \pm 1$  °С в течение 12 ч.

После нанесения культуральной жидкости на дефека́т проводится термостатирование в мягких условиях при температуре  $60 \pm 1$  °С до влажности продукта 5 %. Полученные биопрепараты удобрений хранились при комнатной температуре.

Для оценки степени воздействия повреждающих факторов на микроорганизмы при высушивании и естественном хранении определяли выживаемость бактерий в сухом препарате. Для этого в экспериментальных препаратах биоудобрения после высушивания и хранения определяли число КОЕ (табл. 6.1).

Установлено, что количество жизнеспособных клеток исследуемого штамма в полученном сухом препарате после высушивания снижалась более, чем 10 раз по сравнению с количеством жизнеспособных клеток до высушивания ( $6 \cdot 10^8$  КОЕ/мл). При этом титр бактерий в сухом продукте составлял не менее  $10^7$  КОЕ/г.

Таблица 6.1 – Изменение рН и титра бактерий при хранении сухого биоудобрения на основе штамма *P. mucilaginosus* 574, иммобилизованного на дефекате

Срок хранения	рН	Титр бактерий, КОЕ/г
после сушки	6,70	$5 \cdot 10^7$
1 месяц	6,67	$3 \cdot 10^7$
2 месяца	6,60	$2 \cdot 10^7$
3 месяца	6,45	$1,5 \cdot 10^7$

Периодический контроль жизнеспособности исследуемого штамма при хранении показал стабильность показателя клеток штамма *P. mucilaginosus* 574, иммобилизованных на дефекате (КОЕ/г) после 3 месяцев хранения. Значение рН незначительно снижалось и находилось в пределах 6,5-6,7.

В работе [273] рассмотрена возможность иммобилизации клеток бактерий *Bacillus subtilis* Ч-13 на дефекате и использование биопрепарата в качестве удобрения. При культивировании штамма *B. subtilis* Ч-13 авторы получали культуральную жидкость с содержанием  $6 \cdot 10^8$  КОЕ/мл бактериальных клеток, при этом в сухом препарате титр клеток снижался до  $10^6$  КОЕ/г. При нанесении культуральной жидкости на носитель (дефекат) и дальнейшем высушивании препарата титр клеток штамма *B. subtilis* Ч-13 снижался более, чем 100 раз по сравнению с титром в культуральной жидкости. Как показано выше, жизнеспособность клеток штамма *P. mucilaginosus* 574 при их иммобилизации на

дефекате на порядок выше, чем жизнеспособность клеток штамма *B. subtilis* Ч-13 на таком же носителе.

Высокое качество разработанного биоудобрения можно объяснить тем, что штамм *P. mucilaginosus* 574 в отличие от бактерий *B. subtilis* Ч-13 эффективно синтезирует ЭПС, которые выполняют, видимо, роль адгезивов (прилипателей), обеспечивая более высокую сохранность бактерий на поверхности носителя.

Опытные работы по применению разработанного биоудобрения при выращивании сои и овса в Самарской и Ленинградской областях дали положительные результаты (Приложение 1 и 2). Урожайность сои и овса увеличилась на 19,1 % и 20,8 %, соответственно, по сравнению с контрольным опытом при оптимальной дозировке 150 кг/га.

При этом урожайность сои и овса с применением разработанного биоудобрения на основе штамма *P. mucilaginosus* 574 выше по сравнению с другими существующими на Российском рынке биоудобрениями, в частности, Агат-25К, Ризоторфин, Экстрасол и Байкал ЭМ-1 (табл. 6.2).

Таблица 6.2 – Влияние биоудобрений на урожайность сои и овса

Препараты	Микроорганизмы	Прибавка урожайности к контролю, %	
		сочи	овса
-	<i>P. mucilaginosus</i> 574	19,1	20,8
Агат-25К [274]	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> ВКМ В-1973Д	16,0	19,0
Ризоторфин [275]	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 2490	17,5	-
Экстрасол [275]	<i>Bacillus subtilis</i> Ч-13	13,6	-
Байкал ЭМ-1 [276]	Бактерии (молочнокислые, фотосинтезирующие, азотфиксирующие), сахаромицеты	-	18,6

По результатам испытания биоудобрения разработана принципиальная технологическая схема промышленного производства биоудобрения с

использованием штамма *P. mucilaginosus* 574, являющегося продуцентом ЭПС, и дефеката (рис. 6.1).

**Описание технологического процесса.** Из сборника 1 меласса насосом 2.1 направляется в рассиропник 3, в котором разбавляется горячей водой (90 °С), выдерживается 30 мин и подается на кларификатор 4, где освобождается от механических примесей. Осветленное сусло смешивается с минеральными солями в реакторе 5 и нагревается до  $120 \pm 1$  °С в пластинчатом теплообменнике 6. После выдержки в сборнике 7 подается в охладитель 8 и далее направляется в инокулятор 9 и ферментер 12. Осветление и стерилизация осуществляются в непрерывном режиме. Посевной материал, выращенный в инокуляторе 9, подается для засева питательной среды в ферментер 12. Для аэрирования культуры в инокуляторе и ферментере воздух проходит подготовку и очистку в фильтре 10 и избыточный воздух с аэрозолем выбрасывает через индивидуальные фильтры 11, установленные у инокулятора и у каждого ферментера. В ферментере 12 культивируют штамм *P. mucilaginosus* 574 при температуре  $30 \pm 1$  °С в течение 72 ч.

Для полной инактивации микроорганизмов проводят стерилизацию дефеката в барабанной сушилке 14 при температуре  $200 \pm 1$  °С в течение 1 ч, далее дефекат охлаждают в аппарате 15. После этого на стерильный дефекат распылением наносится культуральная жидкость, содержащая бактерии, полученная после основной ферментации в ферментере 12. Сушка биопрепарата проводится в распылительной сушилке при температуре  $60 \pm 1$  °С горячим воздухом. Для подачи суспензии в сушилку применяются мембранные насосы высокого давления с бесступенчатой регулировкой давления. Готовый продукт осаждается в циклонном аппарате 13 и направляется на упаковку.

**Кормовая добавка.** По данной технологической схеме (рис. 6.1) предлагается также получать кормовую добавку с использованием продуцента штамма *P. mucilaginosus* 574 и в качестве носителя использовать бентонит. Присутствие в кормовой добавке ЭПС и бентонита позволяет решить проблемы детоксикации кормов от микотоксинов (акт прилагается, Приложение 3).

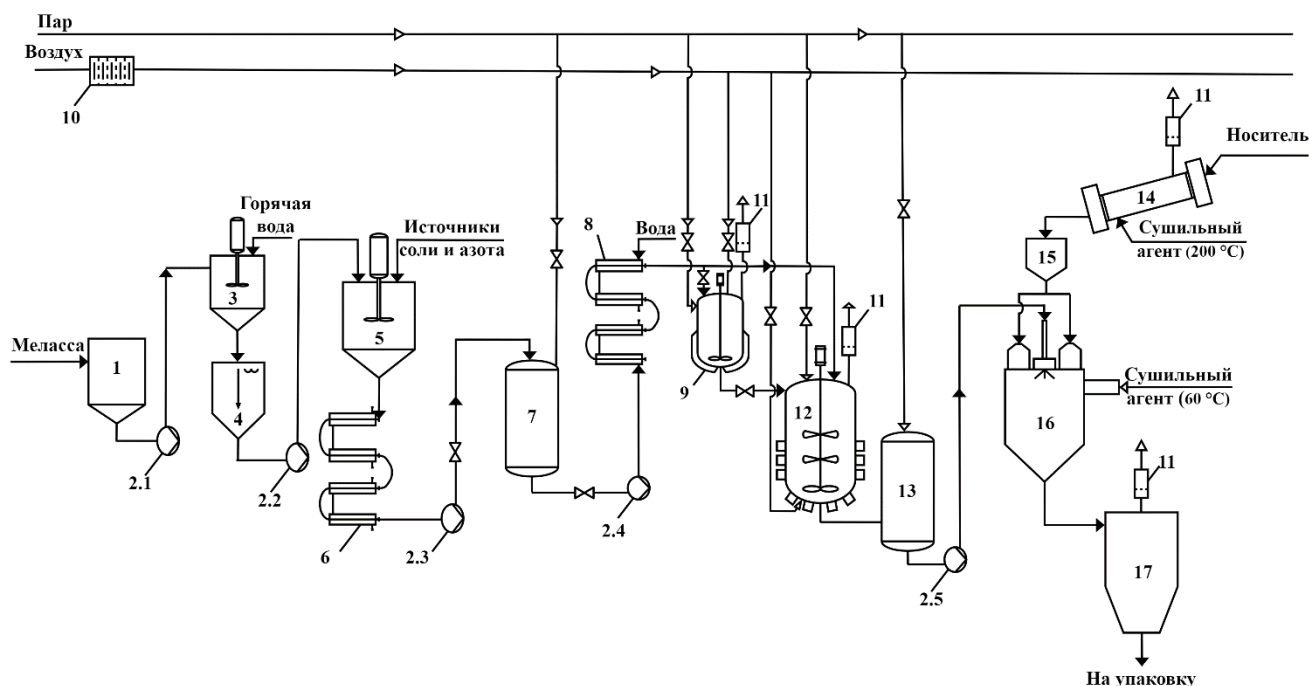


Рисунок 6.1 – Принципиальная технологическая схема производства биопрепаратов на основе штамма *P. mucilaginosus* 574: 1 – сборник для мелассы, 2.1-2.5 – насосы, 3 – рассиропник, 4 – кларификатор, 5 – реактор для приготовления питательной среды, 6 – стерилизатор, 7 и 13 – сборники, 8 – охладитель для питательной среды, 9 – инокулятор, 10 – фильтр для очистки и стерилизации воздуха, 11 – фильтры для очистки отходящего воздуха, 12 – ферментер, 14 – барабанная сушилка, 15 – охладитель для носителя, 16 – сушилка для биопрепаратов, 17 – циклонный аппарат

## 6.2 Разработка технологии и получение биопрепаратов на основе штамма *P. mucilaginosus* 560

**Кормовая добавка.** Кормовую добавку получали культивированием штамма *P. mucilaginosus* 560 на питательной среде, приготовленной на основе ферментолита клетчатки рисовой шелухи.

Ферментолит клетчатки рисовой шелухи получен путем предварительной обработки рисовой шелухи гидроксидом натрия с концентрацией 2,5 % и гидромодулем 1 : 8 при температуре  $120 \pm 1$  °С в течение 20 мин. Затем клетчатку промывали водой и обрабатывали ферментным препаратом Accellerase 1500 при рН 5,0 – 5,5 в течение 24 ч при температуре  $55 \pm 1$  °С.

Условия культивирования штамма *P. mucilaginosus* 560: содержание ферментализата клетчатки рисовой шелухи в среде 0,5 % по РВ, температура культивирования  $30 \pm 1$  °С, рН  $6,0 \pm 0,2$ , внесение в питательную среду 0,2 % карбамида в качестве источника азота. Культивирование осуществлялось в сосудах емкостью 2 л при непрерывном перемешивании со скоростью 150 об/мин на шейкере инкубатора IST-3075R (производитель Jeitech, Korea). В течение 72 ч культивирования в этих условиях титр исследуемого штамма достигает  $10^8$  КОЕ/мл, концентрация биомассы  $1,50 \pm 0,10$  г/л и активность ксиланазы  $20,00 \pm 0,25$  ед/мл.

В качестве носителя использовали шрот клетчатки рисовой шелухи, который получен после ферментативной обработки. Для инактивации микроорганизмов шрот клетчатки рисовой шелухи предварительно стерилизовали при температуре  $200 \pm 1$  °С в течение 1 ч. Далее проводили иммобилизацию бактерий на стерильном носителе при соотношении культуральная жидкость : носитель, соответственно, 3 : 4.

Влажная кормовая добавка высушивалась в мягких условиях при температуре  $60 \pm 1$  °С до влажности 8 %. Полученная кормовая добавка хранилась при комнатной температуре. В сухом продукте активность ксиланазы составляла  $15,00 \pm 0,20$  ед/г и концентрация биомассы –  $1,13 \pm 0,10$  г/кг.

Полученная кормовая добавка может использоваться как источник ферментов, способствующих утилизации клетчатки в желудочно-кишечном тракте жвачных животных. Кроме этого, полученная кормовая добавка обладает адсорбирующей способностью к Т-2 микотоксину. При включении в рацион кормления 0,25 % от массы корма кормовая добавка оказывала защитный эффект при субхроническом Т-2 микотоксикозе. Кормовая добавка более эффективна по сравнению с цеолитом. Биопрепарат безвреден при применении (акт прилагается, Приложение 4).

По результатам испытания кормовой добавки разработана принципиальная технологическая схема промышленного производства кормовой добавки с использованием штамма *P. mucilaginosus* 560, являющегося продуцентом



ксиланазы и целлюлолитических ферментов, и шрота клетчатки рисовой шелухи (рис. 6.2).

**Описание технологического процесса.** Схемой предусмотрено получение ферментализата клетчатки рисовой шелухи в качестве источника углерода для приготовления питательной среды. Из ёмкости 1 рисовую шелуху норией подают на весы 2 и далее в химический реактор 4 для обработки шелухи раствором щелочи с концентрацией 2,5 %, которую готовят в емкости 3 (условие обработки описано выше). После обработки шелухи щелочью образовавшуюся клетчатку рисовой шелухи промывают на барабанном фильтре 6. Щелочной раствор (щелок) направляют в сборник 7. Щелок содержит диоксид кремния и может быть использован для получения аморфного или кристаллического диоксида кремния. Клетчатку после промывания до нейтральной реакции направляют в биореактор 8, в котором клетчатка обрабатывается ферментным препаратом Accellerase 1500 при pH 5,0 – 5,5 в течение 24 ч при температуре  $55 \pm 1$  °C. Ферментализат и шрот клетчатки разделяют центрифугированием на центрифуге 9. В полученный ферментализат вносят минеральные соли в емкости 10, в дальнейшем стерилизуют в аппарате 11. Далее аккумулируют в емкости 12, охлаждают в охладителе 13 и направляют в инокулятор 16 и ферментер 17. Посевной материал, выращенный в инокуляторе 16, подается для засева питательной среды в ферментер 17. Для аэрирования культуры в инокуляторе и ферментере воздух проходит подготовку и очистку в фильтре 14, а избыточный воздух, содержащий микроорганизмы, очищается на индивидуальных фильтрах 15, установленных на инокуляторе и ферментере. В ферментере 17 культивируется штамм *P. mucilaginosus* 560 при температуре  $30 \pm 1$  °C в течение 72 ч.

Для получения кормовой добавки в качестве носителя используется шрот клетчатки рисовой шелухи. Сушка влажного шрота осуществляют в барабанной сушилке 19 при температуре  $200 \pm 1$  °C в течение 1 ч до влажности не более 8 %, далее охлаждается в аппарате 19. Затем стерильный шрот клетчатки рисовой шелухи смешивается с культуральной жидкостью, содержащей споры и ферменты, синтезируемые штаммом *P. mucilaginosus* 560, подаваемой из ферментера 17, на

распылительную сушилку 20. Для сушки используется горячий воздух с температурой  $60 \pm 1$  °С. Для подачи суспензии в сушилку применяются мембранные насосы высокого давления с бесступенчатой регулировкой давления. Готовый продукт отделяется в циклонном аппарате 21 и направляет на упаковку (рис. 6.2).

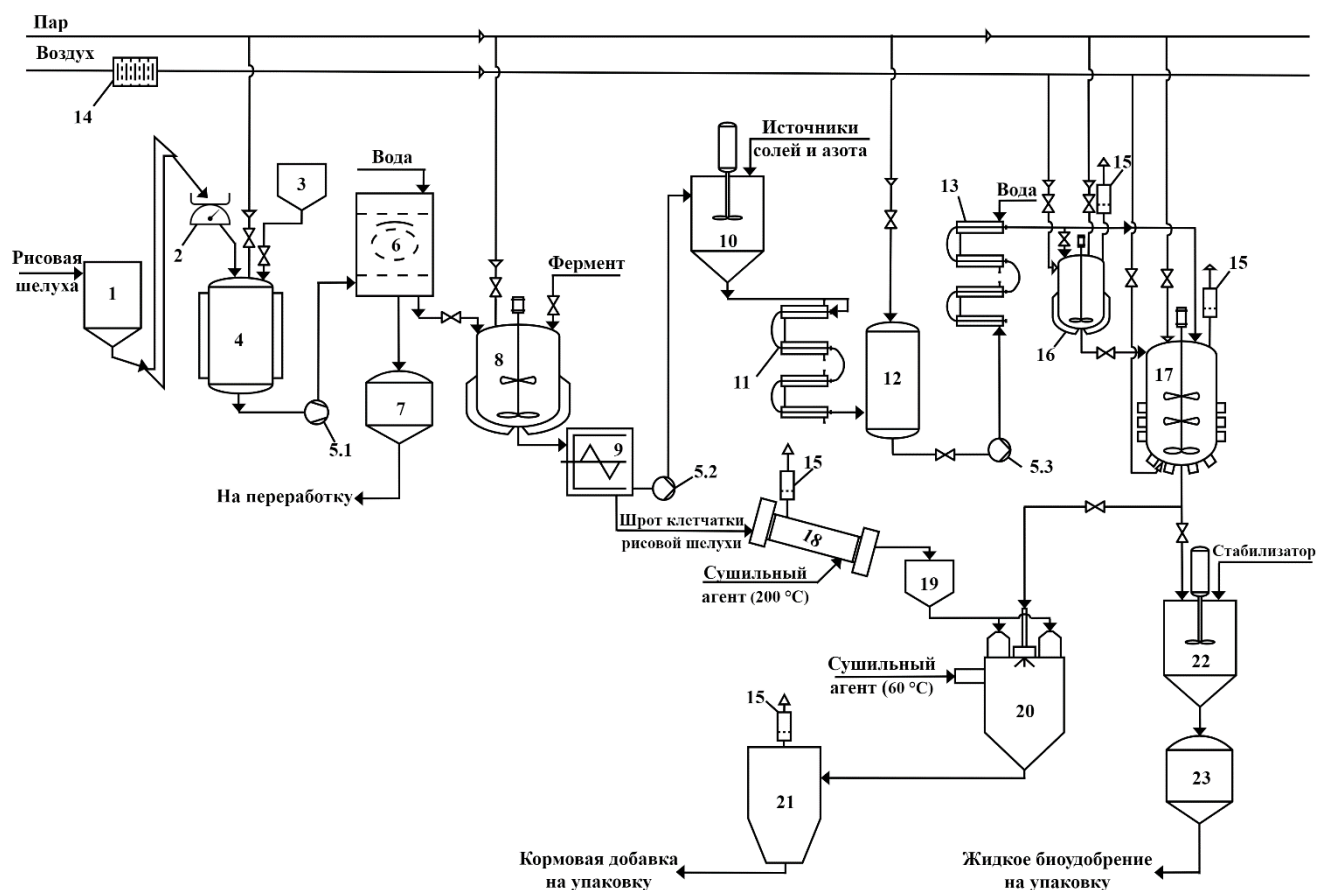


Рисунок 6.2 – Принципиальная технологическая схема производства биопрепаратов на основе штамма *P. mucilaginosus* 560: 1 – бункер для рисовой шелухи, 2 – весы, 3 – емкость для приготовления щелочи, 4 – реактор для щелочной обработки рисовой шелухи, 5.1-5.4 – насосы, 6 – барабанный фильтр, 7 – сборник для щелока, 8 – биореактор для ферментативной обработки клетчатки рисовой шелухи, 9 – центрифуга, 10 – емкость для приготовления питательной среды, 11 – стерилизатор, 12 – сборник для питательной среды, 13 – охладитель для питательной среды, 14 – фильтр для очистки и стерилизации воздуха, 15 – фильтры для очистки отходящего воздуха, 16 – инокулятор, 17 – ферментер, 18 – барабанная сушилка, 19 – охладитель для носителя, 20 – сушилка для кормовой добавки, 21 – циклонный аппарат, 22 – смеситель, 23 – емкость для жидкого биоудобрения

**Жидкое биоудобрение.** Представленный на схеме технологический процесс (рис. 6.2) рекомендуется использовать при получении жидкого биоудобрения, который получают смешением культуральной жидкости, содержащей споры штамма *P. mucilaginosus* 560 и ферменты ксиланазу, целлюлазу и целлобиазу, с консервантом в смесителе 22, аккумулярованием в емкости 23 и дальнейшей упаковкой в полиэтиленовые бутылки. В качестве стабилизатора используют 2 М сорбитол. Хранение при температуре  $4 \pm 1$  °С не более 2 лет [277].

Жидкое биоудобрение предназначено для утилизации пожнивных остатков на полях. Присутствующие в жидком удобрении ферменты ксиланаза, целлюлаза и целлобиаза способствуют ферментативному разложению растительных остатков на полях после уборки урожая. При этом повышается эффективность биоконверсии пожнивных остатков и ограничивается рост и развитие мицелиальных грибов в почве, которые поражают будущий урожай микотоксинами.

#### **Многофункциональные биопрепараты.**

Учитывая многофункциональные свойства и положительные результаты при испытании полученных опытных образцов кормовых добавок и их специфичность по составу, рекомендуется изготавливать комбинированную кормовую добавку на основе *P. mucilaginosus* 574 с носителем – бентонитом и *P. mucilaginosus* 560 с носителем – шротом клетчатки рисовой шелухи путем смешения в соотношении, регламентируемом потребителями кормов. Комбинированная кормовая добавка повысит детоксикацию кормов от микотоксинов за счет ЭПС и увеличит усвояемость кормов животными за счет ферментов ксиланазы, целлюлазы и целлобиазы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что штамм *P. mucilaginosus* 574 при культивировании на питательной среде с сахарозой обладает наиболее эффективной азотфиксирующей способностью и является продуктивным продуцентом индолилуксусной кислоты, фермента  $\beta$ -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.

## РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

1. Мелассу и ферментоллизат клетчатки рисовой шелухи рекомендуются использовать в качестве субстратов для получения биомассы, ЭПС и ферментов штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* в промышленных условиях.

2. Штамм бактерий *P. mucilaginosus* 574 рекомендуется использовать в промышленности для получения как биоудобрения для повышения урожайности растений, так и кормовой добавки для детоксикации кормов от микотоксинов и увеличения усвояемости кормов животными.

3. Штамм бактерий *P. mucilaginosus* 560 рекомендуется использовать в промышленности для получения биоудобрения для утилизации пожнивных остатков на полях и кормовой добавки в качестве энтеросорбента при микотоксикозах *in vivo* и источника ферментов, способствующих утилизации клетчатки в желудочно-кишечном тракте жвачных животных.

4. 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.

**Перечень сокращений и условных обозначений**

PGPR – Plant Growth-Promoting Rhizobacteria,

АТФ – аденозинтрифосфат,

АЦК-деаминаза – 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат деаминаза

ФПЯ – ферментированные пальмовые ядра,

КОС – ксиланаза ксилоолигосахариды,

ТФФ – твердофазная ферментация,

ЖФФ – жидкофазная ферментация,

ПХК – порошок хорды кальмара,

РВ – редуцирующие вещества,

ДНСК – 3,5-динитросалициловая кислота,

РФА - рентгенофлуоресцентный анализ,

КЖ – культуральная жидкость,

ЭПС – экзополисахарид,

ИУК – индолилуксусная кислота,

ГЖХ – газожидкостная хроматография,

OFAT – one factor at a time,

КОЕ – колониеобразующие единицы,

Na-КМЦ – натрий карбоксиметилцеллюлоза,

АСВ – абсолютное сухое вещество.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Перечень средств производств для применения в системе органического и биологизированного земледелия на основе международных принципов органического сельского хозяйства // Союза органического земледелия: официальный сайт. – URL: <https://soz.bio/> (дата обращения: 17/04/2018).
2. Avis, T.J. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity / T.J. Avis, V. Gravel, H. Antoun, R.J. Tweddell // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2008. – Vol. 40. – P. 1733-1740.
3. Kang, B. G. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots / B. G. Kang, W. T. Kim, H. S. Yun, & S. C. Chang // *Plant Biotechnology Reports*. – 2010. – Vol. 4. – № 3. – P. 179-183.
4. Ahemad, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective / M. Ahemad, M. Kibret // *Journal of King saud University-science*. – 2014. – Vol. 26. – № 1. – P. 1-20.
5. Van Loon, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria / L. C. Van Loon // *In New perspectives and approaches in plant growth-promoting. – Rhizobacteria research*. Springer, Dordrecht, 2007. – P. 243-254.
6. Compant, S. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization / S. Compant, C. Clément, A. Sessitsch // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2010. – Vol. 42. – № 5. – P. 669-678.
7. Wang, L. Y. Chen S. F. *Paenibacillus beijingensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from wheat rhizosphere soil / L. Y. Wang, J. Li, Q. X. Li, S. F. Chen // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2013. – Vol. 104. – № 5. – P.675-83.
8. Dean, D. R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: Stacey, G., Burris, R. H., Evans, H. J. (eds) *Biological nitrogen fixation* / D. R. Dean, R. Jacobson // Chapman and Hall. – New York, 1992. – P. 763-817.



9. Ahemad, M. Ecological assessment of biotoxicity of pesticides towards plant growth - promoting activities of pea (*Pisum sativum*)-specific *Rhizobium sp. Strainmrp1* / M. Ahemad, M. S. Khan // Emirates Journal of Food and Agriculture. – 2012. – P. 334-343.
10. Bhattacharyya, P. N. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture / P. N. Bhattacharyya, D. K. Jha // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2012. – Vol. 28. – № 4. – P. 1327-1350.
11. Glick, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications / B. R. Glick // Scientifica. – 2012. – P. 2012.
12. Marroquí, S. Enhanced symbiotic performance by *Rhizobium tropici* glycogen synthase mutants / S. Marroquí, A. Zorreguieta, C. Santamaría, F. Temprano, M. Soberón, M. Megías, J. A. Downie // Journal of Bacteriology. – 2001. – Vol. 183. – № 3. – P. 854-864.
13. Ramí'ez, M. *Rhizobium etli* genetically engineered for the heterologous expression of *Vitreoscilla sp.* hemoglobin effects on free-living symbiosis / M. Ramí'ez, B. Valderrama, R. Arredondo-Peter, M. Soberon, J. Mora, G. Herná'ndez // Molecular Plant-Microbe Interactions Journal. – 1999. – Vol. 12. – P. 1008–1015
14. Bhattacharjee, R. B. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges / R. B. Bhattacharjee, A. Singh, S. N. Mukhopadhyay // Applied microbiology and biotechnology. – 2008. – Vol. 80. – № 2. – P. 199-209.
15. Bhuvaneshwari, K. Agronomic potential of the association *Azolla-Anabaena* / K. Bhuvaneshwari, A. Kumar // Scientific Research and Reports. – 2013. – Vol. 3. – № 1. – P. 78–82.
16. Feng, K. Effect of organic ligands on biological availability of inorganic phosphorus in soils / K. Feng, H. M. Lu, H. J. Sheng, X. L. Wang, J. Mao // Pedosphere. – 2004. – Vol. 14. – № 1. – P. 85-92.
17. Khan, M. S. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review / M. S. Khan, A. Zaidi, P. A. Wani // Agronomic Sustainable Development. – 2007. – Vol. 27. – P. 29–43.

18. Jeffries, P. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility / P. Jeffries, S. Gianinazzi, S. Perotto, K. Turnau, J. M. Barea // *Biology and Fertility of Soils*. – 2003. – Vol. 37. – P. 1–16.
19. Rodriguez, H. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion / H. Rodriguez, R. Fraga // *Biotechnology Advances*. – 1999. – Vol. 17. – P. 319–339.
20. Sharma, S. B. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils / S. B. Sharma, R. Z. Sayyed, M. H. Trivedi, T. A. Gobi // *SpringerPlus*. – 2013. – Vol. 2. – № 1. – P. 587.
21. Öğüt, M. Increased proton extrusion of wheat roots by inoculation with phosphorus solubilising microorganism / M. Öğüt, F. Er, G. Neumann // *Plant and soil*. – 2011. – Vol. 339. – № 1-2. – P. 285-297.
22. Kpombrekou, K. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks / K. Kpombrekou, M. A. Tabatabai // *Soil Science*. – 1994. – Vol. 158. – P. 442–453.
23. Tao, G. C. Phosphate-solubilizing and -mineralizing abilities of bacteria isolated from soils / G. C. Tao, S. J. Tian, M. Y. Cai, G. H. Xie // *Pedosphere*. – 2008. – Vol. 18. – P. 515–523.
24. Ponmurugan, P. In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria / P. Ponmurugan, C. Gopi // *African Journal of Biotechnology*. – 2006. – Vol. 5. – № 4. – P. 348-350.
25. Gyaneshwar, P. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants / P. Gyaneshwar, G. Naresh Kumar, L. J. Parekh, P. S. Poole // *Plant Soil*. – 2002. – Vol. 245. – P. 83–93.
26. Bashan, Y. Long-term survival of the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant / Y. Bashan, L. E. Gonzalez // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1999. – Vol. 51. – P. 262–266.
27. Matias, S. R. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron

ore area in Brazil / S. R. Matias, M. C. Pagano, F. Carvalho-Muzzi, C. A. Oliveira, A. Almeida-Carneiro, S. N. Horta, M. R. Scotti // *European Journal of Soil Biology*. – 2009. – Vol. 45. – P. 259–266

28. Ray, J. Influence of soil inoculation with vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) and a phosphate dissolving bacteria on plant growth and  $^{32}\text{P}$  uptake / J. Ray, D. J. Bagyaraj, A. Manjunath // *Soil Biology and Biochemistry*. – 1981. – Vol. 13. – P. 105–108.

29. Rojas, A. Synergism between *Phyllobacterium* sp. ( $\text{N}_2$ -fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere / A. Rojas, G. Holguin, B. R. Glick, Y. Bashan // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2001. – Vol. 35. – P. 181–187

30. Cohen, A. C. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants / A. C. Cohen, R. Bottini, P. N. Piccoli // *Plant Growth Regulation*. – 2008. – Vol. 54. – № 2. – P. 97-103.

31. Tanimoto, E. Regulation of root growth by plant hormones—roles for auxin and gibberellin / E. Tanimoto // *Critical reviews in plant sciences*. – 2005. – Vol. 24. – № 4. – P. 249-265.

32. Hayat, R. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review / R. Hayat, S. Ali, U. Amara, R. Khalid, I. Ahmed // *Annals of Microbiology*. – 2010. – Vol. 60. – № 4. – P. 579-598.

33. Spaepen, S. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling / S. Spaepen, J. Vanderleyden, R. Remans // *In FEMS Microbiology Reviews*. – 2007. – Vol. 31. – № 4. – P. 425-448.

34. Bottini, R. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase / R. Bottini, F. Cassán, P. Piccoli // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2004. – Vol. 65. – № 5. – P. 497-503.

35. Spaepen, S. Auxin and plant-microbe interactions / S. Spaepen, J. Vanderleyden // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2011. – Vol. 3. – № 4. – P. a001438.

36. Babalola, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance / O. O. Babalola // *Biotechnology letters*. – 2010. – Vol. 32. – № 11. – P. 1559-1570.
37. Khan, A. L. Bacterial endophyte *Sphingomonas sp.* LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth / A. L. Khan, M. Waqas, S. M. Kang // *Journal of Microbiology*. – 2014. – Vol. 52. – P. 689–695.
38. Aloni, R. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism / R. Aloni, E. Aloni, M. Langhans, C. I. Ullrich // *Annals of botany*. – 2006. – Vol. 97. – № 5. – P. 883-893.
39. Liu, F. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings / F. Liu, S. Xing, H. Ma, Z. Du, B. Ma // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2013. – Vol. 97. – № 20. – P. 9155-9164.
40. Reid, M. S. The role of ethylene in flower senescence / M. S. Reid // In *IV International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants* 261. March, 1988. – P. 157-170.
41. Ahmad, M. Efficacy of *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields / M. Ahmad, Z. A. Zahir, M. Khalid, F. Nazli, M. Arshad // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2013. – Vol. 63. – P. 170-176.
42. Li, Q. The effect of native and ACC deaminase-containing *Azospirillum brasilense Cd1843* on the rooting of carnation cuttings / Q. Li, S. Saleh-Lakha, B. R. Glick // *Canadian journal of microbiology*. – 2005. – Vol. 51. – № 6. – P. 511-514.
43. Glick, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world / B. R. Glick // *Microbiological research*. – 2014. – Vol. 169. – № 1. – P. 30-39.
44. Raaijmakers, J. M. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms / J. M. Raaijmakers, T. C. Paulitz, C. Steinberg, C. Alabouvette, Y. Moe¨nne-Loccoz // *Plant Soil*. – 2009. – Vol. 321. – P. 341–361.

45. Zheng, X. Y. The effects of traits of *Bacillus megaterium* on seed and root colonization and their correlation with the suppression of Rhizoctonia root rot of soybean / X. Y. Zheng, J. B. Sinclair // *Biocontrol*. – 2000. – Vol. 45. – № 2. – P. 223-243.
46. Haas, D. Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease / D. Haas, C. Keel // *Annual Review of Phytopathology*. – 2003. – Vol. 41. – P. 117–153
47. Chet, I. Biological control of fungal pathogens / I. Chet, J. Inbar // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 1994. – Vol. 48. – P. 37–43.
48. Frankowski, J. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48 / J. Frankowski, M. Lorito, F. Scala, R. Schmidt, G. Berg, H. Bahl // *Arch Microbiol*. – 2001. – Vol. 176. – P. 421–426.
49. Ordentlich, A. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii* / A. Ordentlich, Y. Elad, I. Chet // *Phytopathology*. – 1988. – Vol. 78. – P. 84–88.
50. Singh, P. P. Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria / P. P. Singh, Y. C. Shin, C. S. Park, Y. R. Chung // *Phytopathology*. – 1999. – Vol. 89. – P. 92–99.
51. Kim, Y. C. An effective biocontrol bioformulation against Phytophthora blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions / Y. C. Kim, H. Jung, K. Y. Kim, S. K. Park // *European Journal of Plant Pathology*. – 2008. – Vol. 120. – P. 373–382.
52. Bonas, U. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition / U. Bonas, T. Lahaye // *Current opinion in microbiology*. – 2002. – Vol. 5. – № 1. – P. 44-50.
53. Romeiro, R. S. PGPR and systemic induction of resistance against plant pathogens / R. S. Romeiro // *Summa Phytopathol*. – 2000. – Vol. 26. – P. 177–184.
54. Moraes, M. G. Mechanisms of acquired systemic resistance in plants / M. G. Moraes // *Revis Anu Patol Plantas*. – 1998. – Vol. 6. – P. 261–284.

55. Pieterse, C. M. J. Novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis / C. M. J. Pieterse, J. A. van Pelt, M. Knoester, R. Laan, H. Gerrits, P. J. Weisbeek, L. C. van Loon // *Plant Cell*. – 1998. – Vol. 10. – P. 1571–1580.
56. Leeman, M. Induction of systemic resistance against Fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens* / M. Leeman, J. A. van Pelt, F. M. Denouden, M. Heinsbroek, P. A. H. M. Bakker, B. Schippers // *Phytopathology*. – 1995. – Vol. 85. – P. 1021–1027.
57. Choudhary, D. K. Volatiles as priming agents that initiate plant growth and defence responses / D. K. Choudhary, B. N. Johri, A. Prakash // *Current Science*. – 2008. – Vol. 94. – № 5. – P. 595-604.
58. Ongena, M. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants / M. Ongena, E. Jourdan, A. Adam, M. Paquot, A. Brans, B. Joris, J. L. Arpigny, P. Thonart // *Environmental Microbiology*. – 2007. – Vol. 9. – P. 1084–1090.
59. Araujo, F. F. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development / F. F. Araujo, A. A. Henning, M. Hungria // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2005. – Vol. 21. – № 8-9. – P. 1639-1645.
60. Hanson, A. D. Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implications for breeding for drought resistance 1 / A. D. Hanson, C. E. Nelsen, A. R. Pedersen, E. H. Everson // *Crop Science*. – 1979. – Vol. 19. – № 4. – P. 489-493.
61. Rampazzo, P. E. Interaction between rhizobacteria and sugarcane under different conditions of substrate moisture: growth, photosynthesis and water relations / P. E. Rampazzo // *Dissertation, Institute Agronomic of Campinas, Campinas*. – 2013. – 150 p.
62. Simova-Stoilova, L. Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage / L. Simova-Stoilova, K. Demirevska, T. Petrova, N. Tsenov, U. Feller // *Plant Soil Environ*. – 2008. – Vol. 54. – № 12. – P. 529-36.

63. Li, S. M. Analysis of defence enzymes induced by antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* strain AR12 towards *Ralstonia solanacearum* in tomato / S. M. Li, G. G. Hua, H. X. Liu, J. H. Guo // *Annals of microbiology*. – 2008. – Vol. 58. – № 4. – P. 573.
64. de Araujo, F. F. Induction of resistance in tomato by biotic (*Bacillus subtilis*) and abiotic (Acibenzolar-S-Metil) inducers / F. F. de Araujo, D. Menezes // *Summa Phytopathologica*. – 2009. – Vol. 35. – № 3. – P. 169-172.
65. Kumar, M. Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica* / M. Kumar, V. Yadav, N. Tuteja, A. K. Johri // *Microbiology*. – 2009. – Vol. 155. – № 3. – P. 780-790.
66. Andlauer, W. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook / W. Andlauer, P. Fürst // *Food Research International*. – 2002. – Vol. 35. – № 2-3. – P. 171-176.
67. Hilliou, L. Solution properties of an exopolysaccharide from a *Pseudomonas* strain obtained using glycerol as sole carbon source / L. Hilliou, F. Freitas, R. Oliveira, M. A. Reis, D. Lespineux, C. Grandfils, V. D. Alves // *Carbohydrate Polymers*. – 2009. – Vol. 78. – № 3. – P. 526-532.
68. Roberson, E. B. Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* sp. / E. B. Roberson, M. K. Firestone // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1992. – Vol. 58. – № 4. – P. 1284-1291.
69. Leigh, J. A. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions / J. A. Leigh, D. L. Coplin // *Annual Review of Microbiology*. – 1992. – Vol. 46. – P. 307-346.
70. Ashraf, M. Photosynthetic capacity and ion accumulation in a medicinal plant henbane (*Hyoscyamus niger* L.) under salt stress / M. Ashraf // *Journal of applied botany*. – 2004. – Vol. 78. – № 2. – P. 91-96.
71. Naseem, H. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance / H. Naseem, M. Ahsan, M. A. Shahid, N. Khan // *Journal of Basic Microbiology*. – 2018. – Vol. 58. – № 12. – P. 1009–22.

72. Bashan, Y. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) / Y. Bashan, G. Holguin, L. E. De-Bashan // *Canadian Journal of Microbiology*. – 2004. – Vol. 50. – № 8. – P. 521–77.
73. Ash, C. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test / C. Ash, F. G. Priest, M. D. Collins // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1993. – Vol.64. – № 3-4. – P.253-260.
74. Няникова, Г.Г. Сферы возможного применения культуры *Bacillus mucilaginosus* / Г.Г. Няникова, Е.Я. Виноградов // *Актуальные вопросы химической науки и технологии, экологии в химической промышленности: Сб.-М.: АО "НИИТЭХИМ "*. – 1995. – Вып.3. – С.17.
75. 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.
76. Sheela, T. Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the growth of maize (*Zea mays* L.) / T. Sheela, P. Usharani // *Golden Research Thoughts*. – 2013. – Vol.3. – № 6. – P.GRT-3093 ref.21
77. Han, Z. Effects of endophytic bacteria P22 and S16 in *Populus* on the rooting and growth of the relative species plants / Z. Han, Z. Zhang, Y. Dong, M. Yang // *Journal of Northeast Forestry University*. – 2014. – Vol.42. – № 7. – P.117-125
78. Fürnkranz, M. Promotion of growth, health and stress tolerance of Styrian oil pumpkins by bacterial endophytes / M. Fürnkranz, E. Adam, H. Müller, M. Grube, H. Huss, J. Winkler, & G. Berg // *European Journal of Plant Pathology*. – 2012. – Vol. 134. – № 3. – P. 509-519.
79. de Souza, R. Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with rice cropped in iron-stressed soils / R. de Souza, J. Meyer, R. Schoenfeld, P. B. da Costa, L. M. P. Passaglia // *Annals Microbiology*. – 2014. – Vol. 65. – № 2. – P. 951-964.



80. Ker, K. Switchgrass establishment and seeding year production can be improved by inoculation with rhizosphere endophytes / K. Ker, P. Seguin, B. T. Driscoll, J. W. Fyles, D. L. Smith // *Biomass Bioenergy*. – 2014. – Vol. 47. – P.295-301.

81. Weselowski, B. Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CRI with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production / B. Weselowski, N. Nathoo, A.W. Eastman, J. MacDonald, Z.C. Yuan // *BMC microbiology*. – 2016. – Vol. 16. – № 1. – P. 244.

82. Wen, Y. Identification and analysis of the gene cluster involved in biosynthesis of paenibactin, a catecholate siderophore produced by *Paenibacillus elgii* B69 / Y. Wen, X. Wu, Y. Teng, C. Qian, Z. Zhan, Y. Zhao, O. Li, // *Environmental Microbiology*. – 2011. – Vol. 13. – P. 2726-37.

83. 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. – Т. 3. – С. 62-72.

84. Beneduzi, A. *Paenibacillus riograndensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum* / A. Beneduzi, P. B. Costa, M. Parma, I. S. Melo, M. H. Bodanese-Zanettini, & L. M. Passaglia, // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2010. – Vol. 60. – № 1. – P. 128-133.

85. Xie, J. B. Comparative genomic analysis of N<sub>2</sub>-fixing and non-N<sub>2</sub>-fixing *Paenibacillus spp.*: Organization, evolution and expression of the nitrogen fixation genes / J. B. Xie, Z. Du, L. Bai, C. Tian, Y. Zhang, J. Y. Xie, & T. Wang // *PLoS Genetics*. – 2014. – Vol. 10. – № 3. – P. e1004

86. Das, S. N. Plant growth-promoting chitinolytic *Paenibacillus elgii* responds positively to tobacco root exudates / S. N. Das, S. Dutta, A. Kondreddy, N. Chilukoti, S.V. Pullabhotla, S. Vadlamudi, A. R. Podile // *Journal of plant growth regulation*. – 2010. – Vol. 29. – № 4. – P. 409-418.

87. Marra, L. M. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils / L. M. Marra, C.R.F. Sousa Soares, S.M. de Oliveira, P.A.A. Ferreira, B. L. Soares, R. F. de Carvalho, J. M. de Lima & F. M. de Souza Moreira // *Plant Soil*. – 2012. – Vol. 357. – № 1-2. – P. 289-307.

88. Wang, Y. Phosphate solubilization of *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus macerans* from mycorrhizal and non-mycorrhizal cucumber plants / Y. Wang, Y. Shi, B. Li, C. Shan, M. Ibrahim, A. Jabeen, G. Xie and G. Sun // *African Journal of Microbiology Research*. – 2012. – Vol. 6. – P. 4567-4573.

89. Hu, X. Two phosphate- and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China / X. Hu, J. Chen, J. Guo // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2006. – Vol. 22. – № 9. – P. 983-990.

90. Pandya, M. Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiata* / M. Pandya, M. Rajput, S. Rajkumar // *Microbiology*. – 2015. – Vol. 84. – № 1. – P. 80-89.

91. Tsakelova, E. A. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review / E. A. Tsakelova, S. Y. Klimova, T. A. Cherdyntseva, A. I. Netrusov // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2006. – Vol. 42. – № 2. – P. 117-126

92. Holl, F. B. Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa* / F. B. Holl, C. P. Chanway, R. Turkington and R. A. Radley // *Soil Biology and Biochemistry*. – 1988. – Vol. 20. – № 1. – P. 19-24

93. Mok, M. C. Cytokinins and plant development- an overview. Cytokinins: Chemistry, Activity and Function / M. C. Mok // CRC Press, New York, 1994. – P. 115-166

94. Lindberg, T. Acetylene reduction in gnotobiotic cultures with rhizosphere bacteria and wheat / T. Lindberg, U. Granhall // *Plant and Soil*. – 1986. – Vol. 92. – P. 171-180

95. Lindberg, T. Infectivity and acetylene reduction of diazotrophic rhizosphere bacteria in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under gnotobiotic

conditions / T. Lindberg, U. Granhall, K. Tomenius // *Biology and Fertility of Soils*. – 1985. – Vol. 1. – № 3. – P. 123-129

96. Çakmakçi, R. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants / R. Çakmakçi, M. Erat, U. Erdog̃an and M. F. Dönmez // *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. – 2007. – Vol. 170. – № 2. – P. 288-295

97. Phi, Q. T. Assessment of root-associated *Paenibacillus polymyxa* groups on growth promotion and induced systemic resistance in pepper / Q. T. Phi, Y. M. Park, K. J. Seul, C. M. Ryu, S. H. Park, J. G. Kim, S. Y. Ghim // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 20. – № 12. – P. 1605-1613.

98. Sang, M. K. Priming mediated systemic resistance in cucumber induced by *Pseudomonas azotoformans* GC-B19 and *Paenibacillus elgii* MM-B22 against *Colletotrichum orbiculare* / M. K. Sang, E. N. Kim, G. D. Han, M. S. Kwack, Y. C. Jeun, K. D. Kim // *Phytopathology*. – 2014. – Vol. 104. – № 8. – P. 834-842.

99. Kumar, S. *Paenibacillus lentimorbus* inoculation enhances tobacco growth and extenuates the virulence of cucumber mosaic virus / S. Kumar, P. S. Chauhan, L. Agrawal, R. Raj, A. Srivastava, S. Gupta, S. K. Mishra, S. Yadav, P. C. Singh, S. K. Raj, C. S. Nautiyal // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – № 3. e0149980.

100. Pichard, B. Effect of *Bacillus polymyxa* seed treatments on control of black-rot and damping-off of cauliflower / B. Pichard, D. Thouvenot // *Seed Science and Technology* – 1999. – Vol. 27. – № 2. – P. 455–65.

101. Wakelin, S. A. Biological control of *Aphanomyces euteiches* root-rot of pea with spore-forming bacteria / S. A. Wakelin, M. Walter, M. Jaspers, A. Stewart // *Australasian Plant Pathology*. – 2002. – Vol. 31. – № 4. – P. 401–407.

102. Jeon, Y. H. Involvement of growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* in root rot of stored Korean ginseng / Y. H. Jeon, S. P. Chang, I. Hwang, Y. H. Kim // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2003. – № 6. – Vol. 13. – P. 881–891.

103. Yang, J. Evaluation of *Paenibacillus polymyxa* PKB1 for biocontrol of pythium disease of cucumber in a hydroponic system / J. Yang, P. D. Kharbanda, M. Mirza // *Acta Horticulturae*. – 2004. – Vol. 635. – P. 59–66.
104. Akhtar, M. S. Biocontrol of a chickpea root-rot disease complex with *Glomus intraradices*, *Pseudomonas putida* and *Paenibacillus polymyxa* / M. S. Akhtar, Z. A. Siddiqui // *Australasian Plant Pathology*. – 2007. – Vol. 36. – P. 175–80.
105. Haggag, W. M. Colonization of exopolysaccharide - producing *Paenibacillus polymyxa* on peanut roots for enhancing resistance against crown rot disease / W. M. Haggag // *African Journal of Biotechnology*. – 2007. – Vol. 6. – P. 1568–77.
106. Zhou, K. *Paenibacillus* BRF-1 has biocontrol ability against *Phialophora gregata* disease and promotes soybean growth / K. Zhou, M. Yamagishi, M. Osaki // *Soil Science and Plant Nutrition*. – 2008. – Vol. 54. – P. 870–875.
107. Antonopoulos, D. F. Effect of *Paenibacillus alvei* strain K165 on the germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia in planta / D. F. Antonopoulos, S. E. Tjamos, P. P. Antoniou, P. Rafeletos, E. C. Tjamos // *Biological Control*. – 2008. – Vol. 46. – P.166–170.
108. Von Der Weid, I. Antifungal and root surface colonization properties of GFP-tagged *Paenibacillus brasilensis* PB177 / I. Von Der Weid, V. Artursson, L. Seldin, J. K. Jansson // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2005. – Vol. 21. – P. 1591-1597.
109. Lapidot, D. Disease protection and growth promotion of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) by *Paenibacillus dendritiformis* / D. Lapidot, R. Dror, E. Vered, O. Mishli, D. Levy, Y. Helman // *Plant Pathology*. – 2014. – Vol. 64. – P.545-551.
110. Naing, K. W. Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups / K. W. Naing, M. Anees, S. J. Kim, Y. Nam, Y. C. Kim, K. Y. Kim // *Annals of Microbiology*. – 2014. – Vol. 64. – P. 55-63.

111. Lo Presti, L. Fungal effectors and plant susceptibility / L. Lo Presti, D. Lanver, G. Schweizer, S. Tanaka, L. Liang, M. Tollot, A. Zuccaro, S. Reissmann & R. Kahmann // Annual review of plant biology. – 2015. – Vol. 66. – P. 513-545.

112. Martin, N. I. Isolation, structural characterization, and properties of mactacin (Polymyxin M), a cyclic peptide antibiotic produced by *Paenibacillus kobensis* M / Martin N. I., Hu H., Moake M. M., Churey J. J., Whittal R., Worobo R. W., J. C. Vederas // Journal of Biological Chemistry – 2003. – Vol. 278. – P. 13124-13132.

113. Bae, Y. S. *Bacillus spp.* as biocontrol agents of root rot and phytophthora blight on ginseng / Y. S. Bae, K. Park, C. H. Kim // The Plant Pathology Journal. – 2004. – Vol. 20. – P. 63-66.

114. Gulati, M. K. Biological control of Phytophthora diseases on strawberry with rhizobacteria / M. K. Gulati, E. Koch, R. A. Sikora, W. Zeller // Bull OILB/SROP. – 2001. – Vol. 24. – P. 51-55.

115. Jung, T. K. Antifungal activity and plant growth promotion by rhizobacteria inhibiting growth of plant pathogenic fungi / T. K. Jung, J. H. Kim, H. G. Song // Korean Journal of Microbiology. – 2012. – Vol. 48. – P. 16-21.

116. Huang, E. The lipopeptide antibiotic paenibacterin binds to the bacterial outer membrane and exerts bactericidal activity through cytoplasmic membrane damage / E. Huang, A. E. Yousef // Applied and Environmental Microbiology. – 2014. – Vol. 80. – P. 2700-2704.

117. Ma, M. Isolation and identification of PGPR strain and its effect on soybean growth and soil bacterial community composition / M. Ma, X. Jiang, Q. Wang, D. Guan, L. Li, M. Ongena, J. Li // International Journal of Agriculture and Biology. – 2018. – Vol. 20. – P. 1289-1297.

118. Goswami, D. Describing *Paenibacillus mucilaginosus* strain N3 as an efficient plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) / D. Goswami, S. Parmar, H. Vaghela, P. Dhandhukia, J. N. Thakker // Cogent Food & Agriculture. – 2015. – Vol. 1. – № 1. – P. 1000714.

119. Shores, M. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents / M. Shores, G. E. Harman, and F. Mastouri // Annual review of phytopathology. – 2010. – 48. – № 1. – P. 21-43.

120. Xu, S. Manipulation of nitrogen leaching from tea field soil using a *Trichoderma viride* biofertilizer / S. Xu, S. Zhou, S. Ma, C. Jiang, S. Wu, Z. Bai, G. Zhuang, and X. Zhuang // Environmental Science and Pollution Research. – 2017. – Vol. 24. – № 36. – P. 27833-27842.

121. Ramya, M. Management of *Cephaleuros parasitica* Karst 592 (*Trentepohliales: Trentepohliaceae*), an algal pathogen of tea plant, *Camellia sinensis* (L) (O. 593 Kuntze) / M. Ramya, P. Ponmurugan, and D. Saravanan // Crop Protection. – 2013. – Vol. 44. – P. 66-74.

122. Jeyaraman, M. Integrated management of branch canker disease 562 (*Macrophoma sp.*) in tea under field level / M. Jeyaraman, and P.S.A. Robert // Journal of Plant Diseases and Protection. – 2017. – Vol. 124. – № 2. – P. 115-119. 563.

123. Daud, N. S. *Paenibacillus polymyxa* bioactive compounds for agricultural and biotechnological applications / N. S. Daud, A. R. J. Mohd Din, M. A. Rosli, Z. M. Azam, N. Z. Othman, and M. R. Sarmidi // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2019. – Vol. 18. – P. 101092.

124. Zhou, S. *Paenibacillus polymyxa* biofertilizer application in a tea plantation reduces soil N<sub>2</sub>O by changing denitrifier communities / S. Zhou, X. Zeng, Z. Xu, Z. Bai, S. Xu, C. Jiang, G. Zhuang & S. Xu // Canadian Journal of Microbiology. – 2020. – Vol. 66. – № 3. – P. 214-227.

125. Han, H. S. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber / H.S. Han, K.D. Supanjani Lee // Plant Soil Environ. – 2006. – Vol. 52. – № 3. – P. 130–136

126. Kapoor, K. K. Effects of inoculation of phosphate-solubilizing microorganisms and an arbuscular mycorrhizal fungus on mungbean grown under natural soil conditions / K. K. Kapoor, S. Singh // Mycorrhiza. – 1998. – Vol. 7. – № 5. – P. 249–253.

127. Wang, P. Effects of combined inoculation with *Rhizophagus intraradices* and *Paenibacillus mucilaginosus* on plant growth, root morphology, and physiological status of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings under different levels of phosphorus / P. Wang, S. H. Wu, M. X. Wen, Y. Wang, & Q. S. Wu // *Scientia horticulturae*. – 2016. – Vol. 205. – P. 97-105.

128. Пат. 1068092 РФ, МПК А23К 3/00. Способ консервирования растений / Е.Я. Виноградов, С.Н. Хохрин, Т.Я. Ильина, А.И. Гуди; заявитель и патентообладатель Ленинградский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера и Ленинградский ветеринарный институт - № 3468003; заявл. 07.07.1982; опубл. 23.01.1984. Бюл. № 3.

129. Пат. 858721 РФ, МПК А23К 1/00 А23К 1/16. Способ кормления телят / Е.Я. Виноградов, В.Г. Новиков, С.Н. Хохрин, В.С. Злобин; заявитель и патентообладатель Ленинградский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера и Ленинградский ветеринарный институт. - № 2777193; заявл. 11.06.1979; опубл. 30.08.1981. Бюл. № 32.

130. Пат. 1743019 РФ, МПК А01N 63/00 С12N 1/20. Штамм бактерий *Bacillus ssp.* для получения препарата против грибных возбудителей болезней злаковых культур / А. И. Мелентьев, Н. Г. Усанов, О. Н. Логинов; заявитель институт биологии Башкирского научного центра Уральского отделения АН СССР; патентообладатель ТОО «Новодекс». - № 4767349/13; заявл. 03.10.1989; опубл. 30.05.1994.

131. Пат. 2213773 РФ, МПК С12N 1/20С12N 9/36 С12R 1/07. Продуцент комплекса хитинолитических ферментов и ламинариназы / А. И. Мелентьев, Г. Э. Актуганов, Н. Г. Усанов, Л. Ю. Кузьмина; заявитель и патентообладатель Институт биологии Уфимского научного центра РАН. - № 2001101594/13; заявл. 18.01.2001; опубл. 10.10.2003.

132. Пат. 2460780 РФ, МПК С12N 1/20С12P 19/04. Продуцент полисахарида / Г.Г. Худайгулов, Г.Э. Актуганов, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев,

Н.Г. Усанов, Н.Н. Силищев; заявители и патентообладатели Учреждение Российской академии наук Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Закрытое акционерное общество научно-производственное предприятие «Биомедхим» (ЗАО НПП «Биомедхим»). - № 2011114179/10; заявл. 11.04.2011; опубл. 10.09.2012. Бюл. № 25.

133. Пат. 2662931 РФ, МПК C12N 1/20C12N 9/00. Биологическая основа микробной кормовой добавки / Г.Ф. Рафинкова, Е.В. Логинова, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев; заявители и патентообладатели Учреждение Российской академии наук Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Закрытое акционерное общество научно-производственное предприятие «Биомедхим» (ЗАО НПП «Биомедхим»). - № 2017106190; заявл. 22.02.2017; опубл. 31.07.2018. Бюл. № 22.

134. O'Mara, F. P. The nutritive value of palm kernel meal measured in vivo and using rumen fluid and enzymatic techniques / F. P. O'Mara, F. J. Mulligan, E. J. Cronin, M. Rath, P. J. Caffrey // *Livestock Production Science*. – 1999. – Vol. 60. – P. 305-316.

135. Sundu, B. Use of enzymes to improve the nutritional value of palm kernel meal and copra meal / B. Sundu, J. Dingle // *Proceedings of the Queensland Poultry Science Symposium*. University of Sydney, Sydney, NSW, Australia. 2003. – 15p.

136. Alimon, A. R. The nutritive value of palm kernel cake for animal feed / A. R. Alimon // *Palm Oil Development*. – 2004. – Vol. 40. – P. 12–14.

137. Francesch, M. Nutritional factors affecting excreta/litter moisture and quality / M. Francesch, J. Brufau // *World's Poultry Science Journal*. – 2004. – Vol. 60. – P. 64–75. DOI:10.1079/WPS20040006

138. Marini, A. M. Performance of locally isolated microorganism in degrading palm kernel cake (PKC) fibre and improving the nutritional value of fermented PKC / A. M. Marini, M. J. Daud, S. Noraini, ah H. Jame, & E. E. Azahan // *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*. – 2005. – Vol. 33. – № 2. – P. 311.

139. Alshelmani, M. I. Effect of feeding different levels of palm kernel cake fermented by *Paenibacillus polymyxa* ATCC 842 on nutrient digestibility, intestinal



morphology, and gut microflora in broiler chickens / M. I. Alshelmani, T. C. Loh, H. L. Foo, A. Q. Sazili, & W. H. Lau // *Animal Feed Science and Technology*. – 2016. – Vol. 216. – P. 216-224.

140. Xu, Z. *Paenibacillus panacisoli* enhances growth of *Lactobacillus spp.* by producing xylooligosaccharides in corn stover ensilages / Z. Xu, S. Zhang, Y. Mu, & J. Kong // *Carbohydrate polymers*. – 2018. – Vol. 184. – P. 435-444.

141. Hwang, Y. H. Effects of  $\beta$ -Glucan from *Paenibacillus polymyxa* and L-theanine on Growth Performance and Immunomodulation in Weanling Piglets / Y. H. Hwang, B. K. Park, J. H. Lim, M. S. Kim, I. B. Song, S. C. Park, H. I. Yun // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. – 2008. – Vol. 21. – № 12. – P. 1753-1759.

142. He, Z. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin / Z. He, D. Kislá, L. Zhang, C. Yuan, K. B. Green-Church, A. E. Yousef // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2007. – Vol. 73. – P. 168–178

143. Stern, N. J. *Paenibacillus polymyxa* purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens / N. J. Stern, E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, Y. N. Kovalev, L. I. Volodina, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. P. Levchuk // *Journal of Food Protection*. – 2005. – Vol. 68. – P. 1450–1453

144. Cole, K. Bacteriocins reduce *Campylobacter* colonization and alter gut morphology in turkey poults / K. Cole, M. B. Farnell, A. M. Donoghue, N. J. Stern, E. A. Svetoch, B. N. Eruslanov, I. P. Mitsevich // *Poultry Science*. – 2006. – Vol. 85. – № 9. – P. 1570-1575.

145. Sjöström, E. *Wood chemistry: fundamentals and applications*; Academic Press: San Diego, USA, 1993.

146. Delmer, D. P. Cellulose biosynthesis / D. P. Delmer, Y. Amor // *Plant Cell*. – 1995. – Vol. 7. – P. 987–1000.

147. Ha, M. A. Fine structure in cellulose microfibrils: NMR evidence from onion and quince / M. A. Ha, D. C. Apperley, B. W. Evans, I. M. Huxham, W. G. Jardine, R. J. Vietor, D. Reis, B. Vian, M. C. Jarvis // *Plant Journal*. – 1998. – Vol. 16. – P. 183–190.

148. Talebnia, F. Optimization study of citrus wastes saccharification by dilute acid hydrolysis / F. Talebnia, M. P. Bafrani, M. Lundin, M. J. Taherzadeh // *BioResources*. – 2008. – Vol. 3. – P. 108–122.

149. Persson, T. Extraction of hemicelluloses from process water from the production of Masonite / T. Persson, M. Matusiak, G. Zacchi, A. S. Jonsson // *Desalination*. – 2006. – Vol. 199. – P. 411–412.

150. Ademark, P. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a beta-mannanase / P. Ademark, A. Varga, J. Medve, V. Harjunpaa, T. Drakenberg, F. Tjerneld, H. Stalbrand // *Journal of Biotechnology*. – 1998. – Vol. 63. – P. 199–210.

151. Kuhad, R. C. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls / R. C. Kuhad, A. Singh, K. E. L. Eriksson // *In Biotechnology in the pulp and paper industry* Springer. – Berlin, Heidelberg, 1997. – P. 45-125.

152. Lynd, L. R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annual review of energy and the environment*. – 1996. – Vol. 21. – № 1. – P. 403-465.

153. Palmqvist, E. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition / E. Palmqvist, B. Hahn- Hägerdal // *Bioresource Technology*. – 2000. – Vol. 74. – P. 25–33.

154. Sun, Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review / Y. Sun, J. Cheng // *Bioresource technology*. – 2002. – Vol. 83. – № 1. – P. 1-11.

155. Khiyami, M. A. Detoxification of corn stover and corn starch pyrolysis liquors by *Pseudomonas putida* and *Streptomyces setonii* suspended cells and plastic compost support biofilms / M. A. Khiyami, A. L. Pometto, R. C. Brown // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2005. – Vol. 53. – № 8. – P. 2978-2987.

156. Ballesteros, I. Ethanol production from olive oil extraction residue pretreated with hot water / I. Ballesteros, J. M. Oliva, M. J. Negro, P. Manzanares, M. Ballesteros, // *In Biotechnology for Fuels and Chemicals* Humana Press, Totowa, NJ, 2002. – P. 717-732.

157. Lynd, L. R. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology / L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. Van Zyl, I. S. Pretorius // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2002. – Vol. 66. – № 3. – P. 506-577.

158. Malik, K. Pretreated rice straw as an improved fodder for ruminants-An Overview / K. Malik, J. Tokkas, R. C. Anand, N. Kumari // Journal of Applied and Natural Science. – 2015. – Vol. 7. – P. 514-520

159. Adesogan, A. T. Ruminant Nutrition Symposium: improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes / A. T. Adesogan, Z. X. Ma, J. J. Romero and K. G. Arriola // Journal of Animal Science. – 2014. – Vol. 92. – P. 1317-1330

160. Nieves, R. A. Components of *Trichoderma reesei* Cellulase Complex on Crystalline Cellulose. / R. A. Nieves, R. J. Todd, R. P. Ellis, M. E. Himmel // Three-Dimensional Visualization with Colloidal Gold, 1994. – P. 236-243.

161. Suzuki, H. Extracellular and cell-bound cellulase components of bacteria / H. Suzuki, K. Yamane, K. Nisizawa // In Cellulases and their applications, Advances in Chem. Series. – Washington D.C, 1969. – Vol. 95. – P. 60-85.

162. Simmons, E. G. Classification of some cellulase-producing *Trichoderma* species / E.G. Simmons // In Second International Mycological Congress. – Tampa, Florida, 1977. – Vol. 2. – P. 618.

163. Wood, T. M. The cellulase of *Fusarium solani* / T.M. Wood // Resolution of the enzyme complex. Biochemical Journal. – 1969. – Vol. 115. – P. 457.

164. Selby, K. Biodeterioration of materials / K. Selby // In Proc. 1st Intern. Biodeterioration Symp. Elsevier Amsterdam. – New York, 1968. – P. 62.

165. Wood, T. M. The cellulase of *Fusarium solani* / T.M. Wood // Resolution of the enzyme complex. Biochemical Journal. – 1969. – Vol. 115. – P. 457.

166. Gusakov, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production / A. V. Gusakov // Trends in biotechnology. – 2011. – Vol. 29. – № 9. – P. 419-425.

167. Adsul, M. G. Biochemical characterization of two xylanases from yeast *Pseudozyma hubeiensis* producing only xylooligosaccharides / M. G. Adsul, K. B.

Bastawde, D. V. Gokhale // *Bioresource technology*. – 2009. – Vol. 100. – № 24. – P. 6488-6495.

168. Zimmermann, W. Degradation of lignin by bacteria / W. Zimmermann // *Journal of biotechnology*. – 1990. – Vol. 13. – № 2-3. – P. 119-130.

169. Pandey, A. Solid-state fermentation / A. Pandey // *Biochemical Engineering Journal*. – 2003. – Vol. 13. № 2. P. 81–84.

170. Thomas, L. Current developments in solid-state fermentation / L. Thomas, C. Larroche, A. Pandey, // *Biochemical Engineering Journal*. – 2013. – Vol. 81. – P. 146–161.

171. Couto, S. R. Application of solid-state fermentation to food industry—a review / S. R. Couto, M. A. Sanromán // *Journal of Food Engineering*. – 2006. – Vol. 76. – № 3. – P. 291-302.

172. Singhanian, R. R. Recent advances in solid-state fermentation / R. R. Singhanian, A. K. Patel, C. R. Soccol, A. Pandey // *Biochemical Engineering Journal*. – 2009. – Vol. 44. – № 1. – P. 13-18.

173. Gašo-Sokač, D. Application of proteomics in food technology and food biotechnology: process development, quality control and product safety / D. Gašo-Sokač, S. Kovač, D. Josić // *Food Technology & Biotechnology*. – 2010. – Vol. 48. – № 3. – P. 284-295.

174. Brijwani, K. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran / K. Brijwani, H. S. Oberoi, P. V. Vadlani // *Process Biochemistry*. – 2010. – Vol. 45. – № 1. – P. 120-128.

175. Teixeira, J. A. *Engineering Aspects of Food Biotechnology* / J. A. Teixeira, A. A. Vicente. – CRC Press, 2017. – 485 p.

176. Saqib, A. A. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF) / A. A. Saqib, M. Hassan, N. F. Khan, S. Baig // *Process Biochemistry*. – 2010. – Vol. 45. – № 5. – P. 641-646.

177. Nema, N. Production of cellulase from *Bacillus cereus* by submerged fermentation using corn husks as substrates / N. Nema, L. Alamir, M. Mohammad // International Food Research Journal. – 2015. – Vol. 22. – № 5. – P. 1831–1836.

178. Buyukkileci, A. O. Utilization of orange peel, a food industrial waste, in the production of exo-polygalacturonase by pellet forming *Aspergillus sojae* / A. O. Buyukkileci, M. F. Lahore, C. Tari // Bioprocess and biosystems engineering. – 2015. – Vol. 38. – № 4. – P. 749-760.

179. Lim, H.C. Fed-batch Cultures: Principles and Applications of Semi-batch Bioreactors / H.C. Lim, H.S. Shin. Cambridge University Press. – New York, USA, 2013. – 453 p.

180. Ruiz, B. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source / B. Ruiz, A. Chávez, A. Forero, Y. García-Huante, A. Romero, M. Sánchez, D. Rocha, B. Sánchez, R. Rodríguez-Sanoja, S. Sánchez, E. Langley // Critical reviews in microbiology. – 2010. – Vol. 36. – № 2. – P. 146-167.

181. Breitling, R. Metabolomics for secondary metabolite research / R. Breitling, A. Cenicerros, A. Jankevics, E. Takano // Metabolites. – 2013. – Vol. 3. – № 4. – P. 1076-1083.

182. Shen, Y. Quantitative metabolic network profiling of *Escherichia coli*: An overview of analytical methods for measurement of intracellular metabolites / Y. Shen, T. Fatemeh, L. Tang, Z. Cai // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2016. – Vol. 75. – P. 141-150.

183. Tyc, O. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria / O. Tyc, C. Song, J. S. Dickschat, M. Vos, P. Garbeva, // Trends in microbiology. – 2017. – Vol. 25. – № 4. – P. 280-292.

184. Lee, I. Y. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa* / I. Y. Lee, W. T. Seo, G. J. Kim, M. K. Kim, S. G. Ahn, G. S. Kwon, Y. H. Park // Bioprocess Engineering. – 1997. – Vol. 16. – № 2. – P. 71-75.

185. Rafigh, S. M. Optimization of culture medium and modeling of curdlan production from *Paenibacillus polymyxa* by RSM and ANN / S. M. Rafigh, A. V. Yazdi,

M. Vossoughi, A. A. Safekordi, M. Ardjmand // International journal of biological macromolecules. – 2014. – Vol. 70. – P. 463-473.

186. Liu, J. Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 / J. Liu, J. Luo, H. Ye, Y. Sun, Z. Lu, X. Zeng // Carbohydrate polymers. – 2009. – Vol. 78. – № 2. – P. 275-281.

187. Li, O. Optimization and characterization of polysaccharide-based bioflocculant produced by *Paenibacillus elgii* B69 and its application in wastewater treatment / O. Li, C. Lu, A. Liu, L. Zhu, P. M. Wang, C. D. Qian, X. H. Jiang, X. C. Wu // Bioresource technology. – 2013. – Vol. – 134. – P. 87-93.

188. Jung, H. K. Production and physicochemical characterization of  $\beta$ -glucan produced by *Paenibacillus polymyxa* JB115 / H. K. Jung, J. H. Hong, S. C. Park, B. K. Park, D. H. Nam, S. D. Kim // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2007. – Vol. 12. – № 6. – P. 713-719.

189. Suresh Kumar, A. Bacterial exopolysaccharides—a perception / A. Suresh Kumar, K. Mody, B. Jha // Journal of basic microbiology. – 2007. – Vol. 47. – № 2. – P. 103-117.

190. Wang, C. L. Production and characterization of exopolysaccharides and antioxidant from *Paenibacillus* sp. TKU023 / C. L. Wang, T. H. Huang, T. W. Liang, C. Y. Fang, S. L. Wang // New biotechnology. – 2011. – Vol. 28. – № 6. – P. 559-565.

191. Pirog, T. P. Exopolysaccharides synthesis on industrial waste / T. P. Pirog, M. O. Ivakhniuk, A. A. Voronenko // Biotechnologia Acta. – 2016. – Vol. 9. – № 2. – P. 7-18.

192. Худайгулов, Г. Г. Экзополисахарид альгинатного типа *Paenibacillus ehimensis* 739 / Г. Г. Худайгулов, О. Н. Логинов, А. И. Мелентьев // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Вып. 13. – № 5-3. – С. 214.

193. Wang, X. Optimization of culture medium for growth of *Bacillus mucilaginosus* PM13 strain / X. Wang, X. F. Yuan, B. Zhao, Y. C. Wang // The Chinese Journal of Process Engineering. – 2010. – Vol. 10. – № 3. – P. 582-587.

194. Пестова, О. В. Биосинтез экзополисахаридов *Bacillus mucilaginosus* на различных питательных средах / О. В. Пестова, С. В. Водолажская, Г. Г. Няникова, Е. Я. Виноградов // Междунар. науч.-практ. конф. «Разработка и производство диагностических питательных сред и микротестсистем»: тез. докл. - Махачката, 1998. – С.27.
195. Mihajlovski, K. R. Improved  $\beta$ -amylase production on molasses and sugar beet pulp by a novel strain *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 / K. R. Mihajlovski, N. R. Radovanović, Đ. N. Veljović, S. S. Šiler-Marinković, S. I. Dimitrijević-Branković // Industrial crops and products. – 2016. – Vol. 80. – P. 115-122.
196. Gao, Y. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis / Y. Gao, J. Xu, Y. Zhang, Q. Yu, Z. Yuan, Y. Liu // Bioresource technology. – 2013. – Vol. 144. – P. 396-400.
197. Ikram-Ul-Haq, H. U. Solid state fermentation for the production of  $\alpha$ -amylase by *Paenibacillus amylolyticus* / H. U. Ikram-Ul-Haq, Z. Mahmood, M. M. Javed // Pakistan Journal of Botany. – 2012. – Vol. 44. – P. 341-346.
198. Hensley, D. E. Beta-Amylase production by *Bacillus polymyxa* on a corn steep-starch-salts medium / D. E. Hensley, K. L. Smiley, J. A. Boundy, A. A. Lagoda // Applied and environmental microbiology. – 1980. – Vol. 39. – № 3. – P. 678.
199. Di Marco, E. Raw sugarcane bagasse as carbon source for xylanase production by *Paenibacillus* species: a potential degrader of agricultural wastes / E. Di Marco, P. M. Sorraire, C. M. Romero, L. B. Villegas, M. A. Martínez // Environmental Science and Pollution Research. – 2017. – Vol. 24. – № 23. – P. 19057-19067.
200. Ko, C. H. Xylanase production by *Paenibacillus campinasensis* BL11 and its pretreatment of hardwood kraft pulp bleaching / Ko C. H., Lin Z. P., Tu J., Tsai C. H., Liu C. C., Chen H. T., & Wang T. P. // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2010. – Vol. 64. – № 1. – P. 13-19.
201. Lee, Y. E. Optimization of xylanase production from *Paenibacillus* sp. DG-22 / Y. E. Lee // Journal of Life Science. – 2003. – Vol. 13. – № 5. – P. 618-625.

202. Lincoln, L. Isolation, screening and optimization of extracellular glucoamylase from *Paenibacillus amylolyticus* strain NEO03 / L. Lincoln, V. S. More, S. S. More // Biocatalysis and agricultural biotechnology. – 2019. – Vol. 18. – P. 101054.

203. Pathania, S. Optimization of cellulase-free xylanase produced by a potential thermoalkalophilic *Paenibacillus* sp. N1 isolated from hot springs of Northern Himalayas in India / S. Pathania, N. Sharma, S. K. Verma // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. – 2020. – Vol. 9. – № 4. – P. 1-24.

204. Liang, Y. L. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1 / Y. L. Liang, Z. Zhang, M. Wu, Y. Wu, J. X. Feng // BioMed research international. – 2014. – Vol. 2014. – 13 p.

205. El-Sayed, M. H. Optimization, purification and physicochemical characterization of curdlan produced by *Paenibacillus* sp. strain NBR-10 / M. H. El-Sayed, H. H. Arafat, I. A. Elsehemy, M. Basha // Biosciences Biotechnology Research Asia. – 2016. – Vol. 13. – № 2. – P. 901-909.

206. Raza, W. Optimization, purification, characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 / W. Raza, K. Makeen, Y. Wang, Y. Xu, S. Qirong // Bioresource technology. – 2011. – Vol. 102. – № 10. – P. 6095-6103.

207. Gao, J. Production optimization, purification, expression, and characterization of a novel  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Paenibacillus polymyxa* / J. Gao, Y. Zhao, G. Zhang, Y. Li, Q. Li // Electronic Journal of Biotechnology. – 2018. – Vol. 36. – P. 24-33.

208. Liang, T. W. Production and characterization of antioxidant properties of exopolysaccharide (s) from *Paenibacillus mucilaginosus* TKU032 / T. W. Liang, S. C. Tseng, S. L. Wang // Marine drugs. – 2016. – Vol. 14. – № 2. – P. 40.

209. Liang, T. W. Exopolysaccharides and antimicrobial biosurfactants produced by *Paenibacillus macerans* TKU029 / T. W. Liang, Wu, C. C., Cheng, W. T., Chen, Y. C., Wang, C. L., Wang, I. L., & Wang, S. L. // Applied biochemistry and biotechnology. – 2014. – Vol. 172. – № 2. – P. 933-950.



210. Garcia-Ochoa, F. Xanthan gum: production, recovery, and properties / F. Garcia-Ochoa, V. E. Santos, J. A. Casas, E. Gómez // *Biotechnology advances*. – 2000. – Vol. 18. – № 7. – P. 549-579.

211. Mihajlovski, K. R. Carboxymethyl cellulase production from a *Paenibacillus* sp / K. R. Mihajlovski, S. Z. Davidović, M. B. Carević, N. R. Radovanović, S. S. Šiler-Marinković, M. D. Rajilić-Stojanović, S. I. Dimitrijević-Branković // *Hemijska industrija*. – 2016. – Vol. 70. – № 3. – P. 329-338.

212. 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. – Vol. 3. – № 47. – С. 74-84.

213. 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. – Vol. 3. – № 47. – P. 58-73.

214. Moyes, R. B. Differential Staining of Bacteria: Gram Stain / R. B. Moyes, J. Reynolds, D. P. Breakwell // *Current Protocols in Microbiology*. – 2009. – Vol. 15. – № 1. – P. A.3C.1-A.3C.8

215. Patent WO2014009604A1 U.S, C08B 37/14 D21C 1/02 D21C 1/10. Method for extracting biomass / S. Von Schoultz; заявитель и патентообладатель OHMAN, Ann-Marie. - № 2005129296/13; заявл. 01.07.2013; опубл. 16.01.2004.

216. Морозова, Ю. А. Биосинтез ксиланаз и целлюлаз грибами рода *Trichoderma* на послеспиртовой барде / Ю.А. Морозова, Е.В. Скворцов, Ф.К. Алимова, А.В. Канарский // *Вестник Казанского технологического университета*. – 2012. – Т. 15. – № 19. – С. 120- 122.

217. 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.

218. Юсупов, Р. А. Методика выполнения измерений концентрации серебра в технологических водах предприятий / Р. А. Юсупов, С. А. Бахтеев, И. Р. Гатиятуллин // Вестник Казанского технологического университета. – 2011. – Т. 19. – С. 306-308.

219. Orata, F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis / F. Orata // *Advanced Gas Chromatography Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. –2012. –Р. 83-108.

220. Пат. 2289621 РФ, С12N 1/20 А01N 63/00 С12R 1/07. Штамм бактерий *Bacillus mucilaginosus*, обладающий широким спектром фунгицидного действия, и биопрепарат на его основе / Е. В. Кандыба; заявитель и патентообладатель закрытое акционерное общество «Промышленно-инновационно-техническая компания «ПИТком». - № 2005129296/13; заявл. 21.09.2005; опубл. 20.12.2006 Бюл. № 35.

221. Lu, J. J. Diversity of plant growth-promoting *Paenibacillus mucilaginosus* isolated from vegetable fields in Zhejiang, China / J. J. Lu, A. Q. Xue, Z. Y. Cao, S. J. Yang, X. F. Hu // *Annals of Microbiology*. – 2014. – Vol.64. –№ 4. – P. 1745-1756.

222. Li, X. Construction of transgenic *Bacillus mucilaginosus* strain with improved phytase secretion / X. Li, S. H. Yang, X. C. Yu, Z. X. Jin, W. D. Li, L. Li, J. Li, M. G. Li // *Journal of applied microbiology*. – 2005. – Vol. 99. – № 4. – P. 878-884.

223. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания. М.: - Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 67с.

224. Greiner, R. Purification and Characterization of a Phytase from *Klebsiella terrigena* / R. Greiner, E. Haller, U. Konietzny, & K. D. Jany // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1997. – Vol. 341. – № 2. – P. 201-206.

225. Marie, N. Analysis of sodium and potassium in total parenteral nutrition bags by ICP-MS and ICP-AES: critical influence of the ingredients / N. Marie, C.

Verdier, B. Le Bot, G. Burgot // American Journal of Analytical Chemistry. – 2011. – Vol. 2. – № 05. – P. 573.

226. ГОСТ Р 57165-2016 (ИСО 11885:2007) Вода. Определение содержания элементов методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой: дата введения 2018-01-01. – М.: Стандартинформ, 2019. – 13 с.

227. Bric, J. M. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane / J. M. Bric, R. M. Bostock, S. E. Silverstone // Applied and environmental Microbiology. – 1991. – Vol. 57. – № 2. – P. 535-538.

228. Maier, R. M. Bacterial Growth / R. M. Maier // In Environmental Microbiology. Elsevier Inc, 2009. – P. 37–54.

229. Польшагина, Г. В. Определение активности ферментов / Г.В. Польшагина, В.С. Чередниченко, Л.В. Римарева. - М: ДеЛи принт, 2003. 375 с.

230. Adney, B. Measurement of cellulase activities / B. Adney, J. Baker // Laboratory analytical procedure. – 1996. – 11 p.

231. Bailey, M. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity / M. Bailey, J. Biely, K. Poutanen // Journal Biotechnol. – 1992. – Vol. 23. – № 3. – P. 257–270

232. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Analytical biochemistry. – 1976. – Vol. 72. – № 1-2. – P. 248-254.

233. Czitrom, V. One-factor-at-a-time versus designed experiments / V. Czitrom // The American Statistician. – 1999. – Vol. 53. – № 2. – P. 126-131.

234. Halder, A. K. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium* / A. K. Halder, P. K. Chakrabarty // Folia microbiologica. – 1993. – Vol. 38. – № 4. – P. 325-330.

235. Meena, V.S. Does a rhizospheric microorganism enhance K availability in agricultural soils? / V.S. Meena, B.R. Maurya, J.P. Verma // Microbiological Research. – 2014. – Vol. 169. – P. 337-347.

236. Sugumaran, P. Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth / P. Sugumaran, B. Janarthanam // World Journal of Agricultural Sciences. – 2007. – Vol. 3. – № 3. – P. 350-355.

237. Ахметова, А. И.  $\beta$ -пропеллерная фитаза *Bacillus ginsengihumi*: клонирование гена, очистка белка, свойства фермента: автореф. дис... кан. биол. наук: 03.02.03-микробиология / Ахметова Алина Ильдусовна. Казань, 2013. 27 с.
238. Shokri, D. Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by Taguchi design / D. Shokri, G. Emtiazi // *Current microbiology*. – 2010. – Vol. 61. – № 3. – P. 217-225.
239. Conrad, R. Regulation of glucose, fructose and sucrose catabolism in *Rhodopseudomonas capsulate* / R. Conrad, H. G. Schlegel // *Microbiology*. – 1978. – Vol. 105. – № 2. – P. 315-322.
240. Куис, Л. В. Накопление кислот в культуральной жидкости бактерий рода *Bacillus* / Л. В. Куис, Р. М. Маркевич // Труды БГТУ. Серия 2: Химические технологии, биотехнология, геоэкология, 2008 – С. 195-199.
241. Ouhib-Jacobs, O. Fructose and glucose mediates enterotoxin production and anaerobic metabolism of *Bacillus cereus* ATCC14579<sup>T</sup> / O. Ouhib-Jacobs, N. D. Lindley, P. Schmitt, T. Clavel // *Journal of applied microbiology*. – 2009. – Vol. 107. – № 3. – P. 821-829.
242. Маринченко, В. А. Технология спирта / В. А. Маринченко, В. А. Смирнов, Б. А. Устиников и др.; под ред. В.А. Смирнова. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1981. – 416 с.
243. Захарова, Е.А. Синтез индолил-3-уксусной кислоты и его регуляция у бактерий *Azospirillum brasilense*: дис....канд. биол. наук: 03.00.07 / Захарова Елена Андреевна. – Саратов, 1998. – 148 с.
244. Мерзаева, О. В. Образование ауксинов эндофитными актинобактериями озимой ржи / О. В. Мерзаева, И. Г. Широких // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2010. – Т.46. – № 1. – С. 51-57.
245. Ковалевская, Н. П. Биорегуляторная активность ассоциативных азотфиксирующих бактерий, выделенных из техногенно-засолённых почв / Н. П. Ковалевская, Д. Ю. Шаравин // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 3. – С. 544.

246. Yi, Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate / Y. Yi, W. Huang, Y. Ge // World Journal of microbiology and biotechnology. – 2008. – Vol. 24. – № 7. – P. 1059-1065.

247. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes / A. Zaidi, M. S. Khan, M. Ahemad, M. Oves, P. A. Wani // In Microbial strategies for crop improvement Springer. Berlin, Heidelberg, 2009. – P. 23-50.

248. Emtiazia, G. Production of extra-cellular polymer in *Azotobacter* and biosorption of metal by exopolymer / G. Emtiazia, Z. Ethemadifara, M. H. Habibib // African Journal of Biotechnology. – 2004. – Vol. 3. – № 6. – P. 330-333.

249. Razack, S. A. Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes / S. A. Razack, V. Velayutham, V. Thangavelu // Turkish Journal of Biology. – 2013. – Vol. 37. – № 3. – P. 280–288.

250. Chaijamrus, S. Production and characterization of polyhydroxybutyrate from molasses and corn steep liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748 / S. Chaijamrus, N. Udpuay // Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal. Manuscript FP 07 030. – 2008. – Vol. X.

251. Sharma, N. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide / N. Sharma, G. S. Prasad, A. R. Choudhury // Carbohydrate polymers. – 2013. – Vol. 93. – № 1. – P. 95–101.

252. Elisashvili, V.I. Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production / V.I. Elisashvili, E.T. Kachlishvili, S.P. Wasser // Applied biochemistry and microbiology. – 2009. – Vol. 45. – № 5. – P. 531–535.

253. 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. – 2021. – Т. 10. – № 4. – С. 708-718.

254. Muntohar, A. S. Utilization of uncontrolled burnt rice husk ash in soil improvement / A. S. Muntohar // Civil Engineering Dimension. – 2004. – Vol. 4. – № 2. – P. 100-105.

255. Dong, M. Pretreatment of sweet sorghum straw and its enzymatic digestion: insight into the structural changes and visualization of hydrolysis process / M. Dong, S. Wang, F. Xu, J. Wang, N. Yang, Q. Li, W. Li // *Biotechnology for biofuels*. – 2019. – Vol. 12. – № 1. – P. 1–11.

256. Пат. 2394764 РФ, С01В 33/12 В82В 1/00. Способ получения диоксида кремния / Л. А. Земнухова; заявитель и патентообладатель Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук (статус государственного учреждения) (Институт химии ДВО РАН). - № 2009114380/15; заявл. 15.04.2009; опубл. 20.07.2010. Бюл. № 20.

257. Hessien, M. M. Controlling the synthesis conditions for silica nanosphere from semi-burned rice straw / M. M. Hessien, M. M. Rashad, R. R. Zaky, E. A. Abdel-Aal, K. A. El-Barawy // *Materials science and engineering: B*. – 2009. – 162. – № 1. – P. 14-21.

258. Barber, S. Chemical and biological data of rice proteins for nutrition and feeding / S. Barber, C.B. de Barber // *In Amino acid composition and biological value of cereal proteins*. Springer, Dordrecht, 1985. – P. 481–494.

259. Ха, Т. З. Эффективность культивирования бактерий *Paenibacillus* на ферментолізатах 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*. – № 2. – P. 271-282.

260. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman, 2002. 1050 p.

261. Stocks-Fischer, S. Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub> / S. Stocks-Fischer, J. K. Galinat, S. S. Bang // *Soil Biology and Biochemistry*. – 1999. – Vol. 31. – № 11. – P. 1563–1571.

262. Dias, F. E Growth-promoting activity of spent sulfite liquor for *Sphaerotilus natans* growing in a continuous-flow apparatus / F. E. Dias, H. Okrend, N. C. Dondero // *Applied Microbiology*. – 1968. – Vol. 16. – № 2. – P. 276–278.

263. Patrauchan, M. A. Calcium influences cellular and extracellular product formation during biofilm-associated growth of a marine *Pseudoalteromonas sp.* / M.A.

Patrauchan, S. Sarkisova, K. Sauer, M. J. Franklin // *Microbiology*. – 2005. – Vol. 151. – № 9. – P. 2885–2897.

264. Lamed, R. Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum* / R. Lamed, E. Setiter, E. A. Bayer // *Journal of Bacteriology*. – 1983. – Vol. 156. – № 2. – P. 828–836.

265. Grepinet, O. Nucleotide sequence and deletion analysis of the xylanase gene (xynZ) of *Clostridium thermocellum* / O. Grepinet, M.C. Chebrou, P. Beguin // *Journal of Bacteriology*. – 1988. – Vol. 170. – № 10. – P. 4582–4588.

266. Ratanakhanokchai, K. Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* strain K-1 / K. Ratanakhanokchai, K. L. Kyu, M. Tanticharoen // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1999. – Vol. 65. – № 2. – P. 694–697.

267. Howieson, J. G. Calcium modifies pH effects on acid-tolerant and acidsensitive strains of *Rhizobium meliloti* / J. G. Howieson, A. D. Robson, L. K. Abbott // *Australian Journal of Agricultural Research*. – 1992. – Vol. 43. – № 3. – P. 765–772.

268. Haltrich, D. Production of fungal xylanases / D. Haltrich, B. Nidetzky, K.D. Kulbe, W. Steiner, S. Župančič // *Bioresource Technology*. – 1996. – Vol. 58. – № 2. – P. 137–161.

269. Kulkarni, N. Molecular and biotechnological aspects of xylanases / N. Kulkarni, A. Shendye, M. Rao // *FEMS Microbiology Reviews*. – 1999. – Vol. 23. – № 4. – P. 411–456.

270. 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.

271. Ko, C. H. Xylanase production by *Paenibacillus campinasensis BL11* and its pretreatment of hardwood kraft pulp bleaching / C. H. Ko, Z. P. Lin, J. Tu, C. H. Tsai, C. C. Liu, H. T. Chen, T. P. Wang // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2010. – Vol. 64. – № 1. – P. 13–19.

272. Пат. 2514401 РФ, МПК C05F 5/00. Органическое удобрение на основе отходов сахарного производства из свеклы и способ его применения / Е. П. Проценко, А. А. Проценко, А. Е. Кузнецов, Н. А. Клеева, Н. И. Тригуб, Ю. А. Сидорова, М. В. Маркова; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Курский государственный университет». - № 2012148028/13; заявл. 12.11. 2012; опубл. 27.04. 2014. Бюл. № 12.

273. Пат. 2241692 РФ, С2 МПК C05G 1/00 C12N 1/20 C12R 1/125 (2006.01). Способ получения биоудобрений / В.К. Чеботарь, А.Е. Казаков, С.В. Ерофеев; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Бисолби-интер». - № 2002127984/13; заявл. 11.10. 2002; опубл.12.10. 2004.

274. Пат. 2111196 РФ, МПК A01N 63/00 A01N 59/00 A01N 65/00 A01P 15/00 C05F 11/08. Биопрепарат Агат-25К для повышения урожая растений / С.А. Павулсоне, А.К. Злотников, Э.К. Буяновский; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Био-БиЗ». - № 96111561/13; заявл. 20.06. 1996; опубл. 20.05.1998.

275. Чеботарь, В. К. Эффективность комплексного применения микробиологических препаратов при возделывании сои / В. К. Чеботарь, С. В. Рафальский, А. Г. Ариткин, В. В. Есин // Достижения науки и техники АПК. – 2013. – № 8. – Р. 23-25.

276. Баталова, Г. А. Формирования урожая и качества зерна овса / Г. А. Баталова // Достижения науки и техники АПК. – 2010. – № 11. – Р. 10-13.


277. Pal, A. Characterizing and improving the thermostability of purified xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 grown on solid-state-medium / A. Pal, F. Khanum // Journal of Biochemical Technology. – 2010. – Vol. 2. – № 4. – Р. 203-209.



## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ООО «Микробокс», 2020

АКТ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ИСПЫТАНИЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ  
ПРЕПАРАТОВ

 <p>Согласовано: _____          Директор НИЦ «Микробокс»          Шербаков А.В.          « 03 » октября 2020 г</p>	
---	--

## А. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

1. Торговое название и назначение препаратов	Образец сухого микробиологического удобрения на основе Paenibacillus tuscilagenosus 574, с титром 107 КОЕ/г (гранулы)
2. Период проведения испытаний	Май-сент 2020
3. Место проведения испытаний	Самарская обл, Ставропольский р-н
4. Почвенно-климатическая зона	
5. Культура, сорт	Соя, Лидия
6. Вид испытаний	Мелкоделяночные
7. Метеорологические условия	

## Б. ХАРАКТЕРИСТИКА УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

8. Почва	Чернозем
9. Предшественник	Пшеница озимая
10. Обработка почвы	Ручная уборка сорняков
11. Внесение удобрений	Фон - НРК 50 в предпосевную культивацию
12. Технология применения микробиологического препарата	Внесение гранул в дозировке 50, 100, 150 кг/га Обработка жидкими фунгицидами в фазу бутонизации
13. Учеты и наблюдения	1.06- в фазу 2-х трилистников, 26.7 – бутонизация
14. Учет урожая	12.09

## В. СХЕМЫ ИСПЫТАНИЙ

Вариант	Внесение в почву	Обработка семян	Обработка по вегетации
Контроль (технология хозяйства)	Без внесения	Жидкий инокулянт ООО Экос 1 л/т	Химический фунгицид
Опыт 1	50 кг/га	Инокулянт НодиксЖ, 1л/т	Микробиологический фунгицид 0,5 л/га
Опыт 2	100 /га	Инокулянт НодиксЖ 1л/т	Микробиологический фунгицид 0,5 л/га
Опыт 3	150 кг/га	Инокулянт НодиксЖ 1л/т	Микробиологический фунгицид 0,5 л/га

## Г. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

### 1. Общая урожайность

Вариант	Урожайность по повторностям, ц/га			Средняя урожайность, ц/га		% к контролю
	1	2	3	всего	+/- к контролю	
1 Контроль	20,1	21,2	19,8	20,4	-	-
2	24,8	22,3	21,5	22,9	2,5	12,3
3	23,5	24,4	24,2	24,0	3,6	17,6
4	24,6	24,5	23,9	24,3	3,9	19,1

### 2. Структура урожая

Вариант	Количество, шт./м <sup>2</sup>		Высота растений, см
	растений	бобов	
1 Контроль	76	506	43
2	78	540	45
3	79	567	45
4	78	576	48

### Заключение

Образец сухого микробиологического удобрения на основе *Bacillus mucilaginosus* 574, с титром 107 КОЕ/г (гранулы) показал в деляночных опытах положительный эффект на растениях сои, сорт Лидия, наибольшая урожайность достигнута в дозировке 150 кг/га, прибавка составила +3,9 ц/га, или +19,1%.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

ООО «Микробокс», 2020

### АКТ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ИСПЫТАНИЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

 <p style="text-align: center;">Согласовано:          Директор НИИ «Микробокс»          Шербаков А.В.          « 03 » октября 2020 г.</p>	
--	--

#### А. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

1. Торговое название и назначение препаратов	Образец сухого микробиологического удобрения на основе <i>Paenibacillus mucilagenosus</i> 574, с титром 107 КОЕ/г (гранулы)
2. Период проведения испытаний	Май-сент 2020
3. Место проведения испытаний	Ленинградская обл, Ломоносовский р-н, урочище Новая Буря, д. Лопухинка
4. Почвенно-климатическая зона	Дерново-карбонатные, выщелоченные оподзоленные почвы.
5. Культура, сорт	Овес яровой, Боррус
6. Вид испытаний	Мелкоделяночные
7. Метеорологические условия	Соответствуют Северо-Западному региону

#### Б. ХАРАКТЕРИСТИКА УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

8. Почва	Дерново-карбонатная, оподзоленная
9. Предшественник	Пар
10. Обработка почвы	Ручная уборка сорняков
11. Внесение удобрений	Фон - NPK 50 в предпосевную культивацию
12. Технология применения микробиологического препарата	Внесение гранул в дозировке 50, 100, 150 кг/га Обработка жидкими фунгицидами в фазу выхода в трубку
13. Учеты и наблюдения	15.06- в фазу кущения, 20.7 – выход в трубку
14. Учет урожая	15.09

#### В. СХЕМЫ ИСПЫТАНИЙ

Вариант	Внесение в почву	Обработка по вегетации
Контроль (технология хозяйства)	Без внесения	Химический фунгицид
Опыт 1	50 кг/га	Микробиологический фунгицид 0,5 л/га
Опыт 2	100 /га	Микробиологический фунгицид 0,5 л/га
Опыт 3	150 кг/га	Микробиологический фунгицид 0,5 л/га



## Г. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

### 1. Общая урожайность

Вариант	Урожайность по повторностям, ц/га			Средняя урожайность, ц/га		% к контролю
	1	2	3	всего	+/- к контролю	
1 Контроль	15.4	15.8	14.9	15.4	-	-
2	17.2	16.9	16.8	17.0	1.6	10.4
3	17.4	17.3	17.1	17.3	1.9	12.3
4	18.0	18.5	19.2	<b>18.6</b>	<b>3.2</b>	<b>20.8</b>

### 2. Структура урожая

Вариант	Количество, шт./м <sup>2</sup>		Высота растений, см	Масса 1000 зерен, г
	растений	продуктивных стеблей		
1 Контроль	80	101	36	41.3
2	78	132	42	41.5
3	83	148	56	42.0
4	85	158	61	42.5

### Заключение

Образец сухого микробиологического удобрения на основе *Bacillus mucilaginosus* 574, с титром 107 КОЕ/г (гранулы) показал в делячных опытах положительный эффект, наибольшая урожайность достигнута в дозировке 150 кг/га, прибавка составила +3.2 ц/га, или +20,8%.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора по  
НР и ИР ФГБНУ «ФЦТР-ВНИВИ»  
профессор

 Василевский Н.М.  
« 17 » \_\_\_\_\_ 2020 г.

АКТ

**ИСПЫТАНИЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ кормовой добавки адсорбента  
микотоксинов на основе внеклеточных полисахаридов и бентонита  
В УСЛОВИЯХ *IN VIVO***

**Место испытаний:** ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных», г. Казань

**Время испытаний:** сентябрь-октябрь 2020 года

**Объект испытаний:** кормовая добавка адсорбент микотоксинов получена на основе внеклеточных полисахаридов, синтезируемых штаммом 574 бактерии *P. Mucilaginosus*, и бентонита.

**Кормовая добавка представлена на испытание кафедрой пищевой биотехнологии КНИТУ.**

**Краткое описание технологии изготовления кормовой добавки на основе  
бактерий *Paenibacillus mucilaginosus* и бентонита**

При получении кормовой добавки использовали штамм 574 бактерии *P. mucilaginosus*, который является эффективным продуцентом экзополисахаридов.

Глубинное культивирование культуры осуществляли на жидкой питательной среде, содержащей мелассу и кукурузный экстракт, при непрерывном перемешивании в течение 3 суток. По окончании культивирования получили  $2 \pm 0,5$  г/л биомассы и  $8,5 \pm 0,5$  г/л экзополисахаридов, число выживаемых клеток не менее  $10^8$  КОЕ/мл. В качестве носителя использовали стерилизованный бентонит. Стерильный бентонит смешали с культуральной жидкостью (КЖ), соотношение «носитель : КЖ» в соответствии «4 : 3». После этого культуру выдерживали в термостате при температуре  $30 \pm 1$  °C в течение 5-6 час. Далее кормовую добавку высушивали при температуре  $60 \pm 1$  °C в течение 24 час. Влажность сухого продукта 5 %.

**Цель испытаний:** Определить эффективность применения кормовой добавки при Т-2 микотоксикозе белых крыс. Исследования проводили в два этапа.

Первый этап - изучение сорбционных свойств кормовой добавки в отношении Т-2 микотоксина в остром опыте на белых крысах

Для экспериментов использовались самцы нелинейных белых крыс массой 180-200 г. Животных разделили на три группы по 10 в каждой. Первой (контрольной) группе животных натошак с помощью зонда проводили внутрижелудочное введение болюсов, содержащих Т-2 микотоксин из расчета

3,2 мг/кг массы тела. Второй группе крыс вводили болусы, содержащие Т-2 микотоксин в той же дозе и исследуемую кормовую добавку в соотношении Т-2 микотоксин : кормовая добавка 1 : 1000. Третьей группе - болусы, содержащие Т-2 микотоксин и адсорбент «Микосорб» в аналогичных пропорциях. За животными вели наблюдение в течение 3 суток.

К третьим суткам эксперимента выживаемость в токсичной группе составила 50%, при 100 % выживаемости в остальных группах.

При вскрытии павших и не кормленных адсорбентом животных отмечались признаки носового кровотечения, кровоизлияния и катарально-геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, отек легких и головного мозга, т.е. характерные признаки острого Т-2 микотоксикоза. Оставшиеся животные были угнетены, малоподвижны, слабо реагировали на внешние раздражители, наблюдались рвота, диарея, отказ от корма и воды. В группах, получавших адсорбенты, за это же время гибели крыс не наблюдали, животные были угнетены, но более активны в сравнении с животными первой группы, подвижны, признаки диареи выражены слабо, аппетит сохранен.

Второй этап - изучение эффективности рациона с исследуемой кормовой добавкой на течение Т-2 микотоксикоза в хроническом опыте на белых крысах.

Оценку влияния введения кормовой добавки на гематологические и весовые показатели проводили на нелинейных белых крысах. Для экспериментов использовались самцы средней массой тела  $150 \pm 2$  г. Было сформировано 4 группы по 6 голов в каждой. Первая группа служила биологическим контролем, получала основной рацион (далее ОР). Животные второй группы получали токсичный корм (далее ТК), содержащий 200 мкг/кг Т-2 токсина. Третья группа животных получала токсичный корм и кормовую добавку из расчета 0,25% от массы корма. Крысы 4 группы получали основной рацион с добавлением 0,25% кормовой добавки. Кормление животных и наблюдение за ними вели в течение 30 сут., регистрировали выживаемость, проводили взвешивание животных и в конце опыта провели отбор крови для гематологических исследований. Гематологические исследования, включающие определение количества эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина и СОЭ проводили общепринятыми методами.

Наблюдение за клиническим состоянием крыс, показало, что в первые дни опыта во всех группах существенных различий в общем состоянии не выявлено. В группе биологического контроля крысы свободно поедали корм и воду и были подвижны. Начиная с 10 - 12 дня кормления, во второй опытной группе наблюдали отказ от корма, угнетение, расстройство желудочно-кишечного тракта в виде диареи.

Динамика роста живой массы у крыс при воздействии Т-2 токсином существенно снижалась. Так, к 30 суткам опыта у животных, получавших токсический корм, средняя живая масса была на 11,9% ниже по сравнению с контрольной группой, в группе с токсином и кормовой добавкой на 6,4%. В четвертой группе живая масса крыс была на уровне данных контроля (таблица 1).

Таблица 1 – Данные массы тела белых крыс при постановке эксперимента

Группа животных	Живая масса, г	
	в начале опыта	в конце опыта
1 (ОР)	156,8±0,25	192,5±0,38
2 (ТК)	154,3±0,36	169,8±0,25
3 (ТК+0,25% кормовая добавка)	155,7±0,22	180,4±0,34
4 (ОР+0,25% кормовая добавка)	156,2±0,23	193,1±0,38

Наблюдали угнетение гематологических показателей (таблица 3) при Т-2 токсикозе: во второй группе крыс, получавших Т-2 токсин, по сравнению с контрольной группой происходило снижение количества эритроцитов на 16,4%, гемоглобина – на 11,5%, лейкоцитов – на 15,2%. СОЭ увеличилось на 20,6%. В третьей опытной группе, колебания гематологических показателей относительно данных контроля менее выражены: отмечали снижение эритроцитов в пределах на 8,5%; лейкоцитов – 11,7%, гемоглобина - 4,8%, увеличение СОЭ составило - 17,0%. Данные гематологических показателей крыс четвертой группы несущественно отличались от данных контроля.

Таблица 2 - Гематологические показатели крови белых крыс при постановке эксперимента

Группа животных	Показатель			
	Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	Лейкоциты, $\times 10^9/л$	Гемоглобин, г/л	СОЭ, мм/час
1 (ОР)	6,3±0,11	8,4±0,25	153,4±0,63	0,94±0,02
2 (ТК)	5,27±0,10*	7,12±0,12*	135,8±0,60*	1,13±0,03*
3(ТК+0,25% кормовая добавка)	5,76±0,09	7,42±0,10*	146,0±0,58	1,1±0,02*
4(ОР+0,25% кормовая добавка)	6,25±0,10	8,54±0,11	150,7±0,46	0,91±0,02*

\* -  $p < 0,05$

#### Выводы:

1. Кормовая добавка - адсорбент микотоксинов, полученный на основе внеклеточных полисахаридов, синтезируемых штаммом 574 бактерии *P. Mucilaginosus*, и бентонита, обладает выраженной сорбционной активностью к Т-2 микотоксину *in vivo*.

2. Кормовая добавка адсорбент микотоксинов при включении в рацион в дозе 0,25 % от массы корма оказывает защитный эффект при субхроническом Т-2 микотоксикозе и безвреден при применении.

Представитель ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

Г.н.с. лаборатории микотоксинов, д.б.н.



Семёнов Э.И.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 4

УТВЕРЖДАЮ

Врио директора  
ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»Насыбуллина Ж.Р.  
« 10 » \_\_\_\_\_ 2020

АКТ

## ИСПЫТАНИЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ

кормовой добавки адсорбента микотоксинов на основе шрота клетчатки  
рисовой шелухи и клеток *P. mucilaginosus* 560 с ферментом  
в условиях *in vivo*

**Место испытаний:** ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных», г. Казань

**Время испытаний:** сентябрь-октябрь 2020 года

**Объект испытаний:** кормовая добавка адсорбент микотоксинов получена на основе шрота клетчатки рисовой шелухи и внеклеточных ферментов, синтезируемых штаммом *P. mucilaginosus* 560.

**Кормовая добавка** представлена на испытание кафедрой пищевой биотехнологии КНИТУ.

**Краткое описание технологии изготовления кормовой добавки на основе бактерий *Paenibacillus mucilaginosus* и бентонита.** При получении кормовой добавки использовали штамм *P. mucilaginosus* 560, который является эффективным продуцентом ксиланаз. Глубинное культивирование культуры осуществляли на жидкой питательной среде, содержащей ферментолитат клетчатки рисовой шелухи, при непрерывном перемешивании в течение 3 суток. По окончании культивирования получили  $1,5 \pm 0,5$  г/л биомассы, число выживаемых клеток не менее  $10^8$  КОЕ/мл. Активность ксиланазы составила  $20,0 \pm 0,25$  ед/мл. В качестве адсорбента микотоксинов использовали шрот клетчатки рисовой шелухи, на котором осаждали клетки *P. mucilaginosus* 560 в активной форме и ферменты. После этого высушивали при температуре  $60 \pm 1$  °С в течение 24 час. Влажность сухого продукта 5 %.

**Цель испытаний:** Определить эффективность применения кормовой добавки при Т-2 микотоксикозе белых крыс.

Исследования проводили в два этапа.

Первый этап - изучение сорбционных свойств кормовой добавки в отношении Т-2 микотоксина в остром опыте на белых крысах

Для экспериментов использовались самцы нелинейных белых крыс массой 180-200 г. Животных разделили на три группы по 10 в каждой. Первой (контрольной) группе животных натошак с помощью зонда проводили внутрижелудочное введение болюсов, содержащих Т-2 микотоксин из расчета 3,2 мг/кг массы тела. Второй группе крыс вводили болюсы, содержащие Т-2 микотоксин в той же дозе и исследуемую кормовую добавку в соотношении Т-2 микотоксин : кормовая добавка 1 : 1000. Третьей группе - болюсы, содержащие Т-2 микотоксин и цеолит в аналогичных пропорциях. За животными вели



наблюдение в течение 3 суток.

К третьим суткам эксперимента выживаемость в токсичной группе составила 50%, при 100 % выживаемости во второй группе и 90% в третьей группе.

Второй этап - изучение эффективности рациона с исследуемой кормовой добавкой на течение Т-2 митоксикоза в хроническом опыте на белых крысах.

Оценку влияния введения кормовой добавки на гематологические и весовые показатели проводили на нелинейных белых крысах. Для экспериментов использовались самцы средней массой тела  $150 \pm 2$  г. Было сформировано 5 групп по 6 голов в каждой. Первая группа служила биологическим контролем, получала основной рацион (далее ОР). Животные второй группы получали токсичный корм (далее ТК), содержащий 200 мкг/кг Т-2 токсина. Третья группа животных получала токсичный корм и кормовую добавку из расчета 0,25% от массы корма. Четвертая группа животных получала токсичный корм и кормовую добавку из расчета 0,25% от массы корма. Крысы 5 группы получали основной рацион с добавлением 0,25% кормовой добавки. Кормление животных и наблюдение за ними вели в течение 30 сут., регистрировали выживаемость, проводили взвешивание животных и в конце опыта провели отбор крови для гематологических исследований.

Динамика роста живой массы у крыс при воздействии Т-2 токсином существенно снижалась. Так, к 30 суткам опыта у животных, получавших токсический корм, средняя живая масса была на 12,7% ниже по сравнению с контрольной группой, в группе с токсином и кормовой добавкой на 4,4%, в четвертой группе – на 9,2%, а в пятой группе живая масса крыс была на уровне данных контроля (таблица 1).

Таблица 1 – Масса тела белых крыс

Группа животных	Живая масса, г	
	в начале опыта	в конце опыта
1 (ОР)	153,4 $\pm$ 0,29	189,7 $\pm$ 0,33
2 (ТК)	155,2 $\pm$ 0,28	165,6 $\pm$ 0,41
3 (ТК+0,25% кормовая добавка)	152,3 $\pm$ 0,25	181,3 $\pm$ 0,32
4 (ТК+0,25% цеолита)	154,9 $\pm$ 0,31	172,2 $\pm$ 0,36
5 (ОР+0,25% кормовая добавка)	150,6 $\pm$ 0,23	191,6 $\pm$ 0,29

Наблюдали угнетение гематологических показателей (таблица 2) при Т-2 токсикозе: во второй группе крыс, получавших Т-2 токсин, по сравнению с контрольной группой происходило снижение количества эритроцитов на 18,6%, гемоглобина – на 13,4%, лейкоцитов – на 19,6%. СОЭ увеличилось на 22,1%. В третьей опытной группе, колебания гематологических показателей относительно данных контроля менее выражены: отмечали снижение эритроцитов в пределах на 6,3%; лейкоцитов – 10,9%, гемоглобина - 5,2%, увеличение СОЭ составило - 15,2%. Данные гематологических показателей крыс четвертой группы были хуже, чем третьей, а пятой группы несущественно отличались от данных контроля.

**Выводы:**

1. Кормовая добавка - шрота клетчатки рисовой шелухи и клеток *P. miscilagnosus* 560 с ферментом, обладает выраженной адсорбирующей способностью к Т-2 микотоксину;

2. Кормовая добавка адсорбент микотоксинов при включении в рацион в дозе 0,25 % от массы корма оказывает защитный эффект при субхроническом Т-2 микотоксикозе, более эффективен в сравнении с неорганическим адсорбентом – цеолитом и безвреден при применении.

Зав. лабораторией микотоксинов, д.б.н.



Матросова Л.Е.

Г.н.с. лаборатории микотоксинов, д.в.н.



Семёнов Э.И.

М.н.с. лаборатории микотоксинов



Сагдеева З.Х.