

На правах рукописи



ГАЙДАШЕВА Ирина Игоревна

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ШТАММА *STREPTOMYCES LATERITIUS* 19/97 М:
ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ
РОСТА И ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ БОЛЕЗНЕЙ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Сибирский государственный технологический университет» на кафедре химической технологии древесины и биотехнологии

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Громовых Татьяна Ильинична

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Алимова Фарида Кашифовна

доктор биологических наук, доцент
Кураков Александр Васильевич

Ведущая организация: Института леса им. В. Н. Сукачева СО РАН

Защита состоится 22 марта в 15.30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Автореферат разослан «_19_» февраля 2011г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Пискункова Н.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В настоящее время биологический метод защиты растений является наиболее важным звеном в выращивании экологически безопасной сельскохозяйственной продукции, оздоровлению лесопосадочного материала. Биометод защиты растений признан наиболее ресурсосберегающим приемом, позволяющим защищать растения от болезней, вредителей и повышать их продуктивность без затрат невозполнимых природных ресурсов и без вредных выбросов в окружающую среду. Этот метод защиты растений имеет важные отличительные свойства: полное отсутствие резистентности патогенных организмов, короткий срок ожидания отклика, способность живых организмов размножаться в природе, безопасность в применении (<http://rscrt.ru/>) В настоящее время уже успешно используются такие препараты как планриз, агат-25, псевдобактерин – это биофунгициды на основе бактерий рода *Pseudomonas*, бактофит, фитоспорин, интеграл, бисолбисан – на основе *B.subtilis*, триходермин – на основе микровицетов рода *Trichoderma*.

Все чаще в научной литературе, исследователи рекомендуют к использованию в биологическом контроле и стимулированию роста растений штаммы группы актиномицетов (Зенова 1989, Ikotun 1990, Громовых и др. 2005, Доолоткельдиева и др., 2007). Предложено достаточно большое количество штаммов актиномицетов, защищенных патентами и предлагаемых для производства биопрепаратов защиты растений, однако технология их массового производства отсутствует. Из почвы лесного питомника Красноярского края в 1997 году был выделен штамм 19/97М *Streptomyces lateritius* (ВКПМ Ас 1637). Данный штамм был предложен как потенциальный продуцент биопрепарата для стимулирования роста и защиты сеянцев хвойных от возбудителей болезней, вызываемых грибами родов *Fusarium* и *Alternaria* (Громовых и др., 2005). Однако до настоящего времени не изучены условия получения биомассы и метаболитов этого продуцента. Не подобраны оптимальные питательные среды для культивирования штамма 19/97 М *S.lateritius*. Кроме того, не проведена апробация полученного на основе штамма препарата в полевых условиях. Все это сдерживает возможность скорейшего внедрения препаратов на основе этих микроорганизмов в качестве инструмента биоконтроля.

Цели и задачи исследования.

Целью настоящей работы было изучение биологической активности и продуктивности штамма 19/97 М *Streptomyces lateritius*, разработка биотехнологии биопрепарата для биологического контроля фитопатогенов злаков и сеянцев хвойных.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- изучить биологические особенности роста и продуктивности штамма 19/97 М *Streptomyces lateritius* при жидкофазном и твердофазном культивировании;
- с целью повышения продуктивности оптимизировать состав питательной среды и условия для культивирования штамма;
- подобрать субстраты для твердофазного культивирования штамма на основе отходов сельского хозяйства и лесоперерабатывающей промышленности;
- изучить состав вторичных метаболитов, продуцируемых активностью штамма в отношении фитопатогенов рода *Fusarium*;
- изучить ростстимулирующие свойства штамма 19/97 М *Streptomyces lateritius* в отношении хвойных и злаковых растений;

- оценить биологическую активность и жизнеспособность штамма при хранении в лабораторных условиях;

- поработать опытные партии биопрепарата и оценить его эффективность в защите растений при внесении в почву лесного питомника и агроценоза злаков.

Научная новизна. Выявлен ростостимулирующий эффект метаболитов штамма 19/97М *Streptomyces lateritius* в отношении хвойных и злаковых растений и установлена антагонистическая активность штамма в отношении фитопатогенных грибов хвойных и злаков из рода *Fusarium*. Показано, что штамм 19/97М *Streptomyces lateritius* сохраняет жизнеспособность и антибиотическую активность при длительном хранении в лабораторных условиях. Изучены физиолого-морфологические свойства, потребности в источниках углерода и азота и динамика накопления биомассы штамма 19/97М *Streptomyces lateritius* при жидкофазном поверхностном культивировании на различных питательных средах; подобраны оптимальные условия для накопления биомассы. Дано биологическое обоснование применения штамма 19/97М *Streptomyces lateritius* для получения биопрепарата.

Проведена оценка химического состава продуцируемых актиномицетом метаболитов. С использованием методов ТСХ, ВЖХ, бумажной хроматографии и электрофореза доказано, что штамм не синтезирует антибиотических соединений группы пенициллина, стрептомицина, тетрациклина и левомицитина. Показано, что активными соединениями являются окрашенные пигменты розово-красного цвета, относящиеся к группам хинонов и антрациклинов.

Впервые методом твердофазной ферментации на древесной зелени и коре пихты сибирской получен новый биопрепарат на основе продуцента 19/97 М *Streptomyces lateritius*. Установленные в результате исследований представления о возможности получения биопрепарата на основе нового штамма 19/97 М актиномицета *Streptomyces lateritius* вносят существенный вклад в научные основы использования его в биологической защите злаковых и хвойных культур.

Практическая значимость работы. Подобраны состав жидкой синтетической среды и условия для получения биомассы штамма 19/97М *S. lateritius*. С целью получения биопрепарата разработаны условия для твердофазного культивирования штамма на древесной зелени пихты сибирской.

Показано, что штамм 19/97 М *S.lateritius* может быть использован для защиты растений в сельском и лесном хозяйстве. Поработана опытная партия биопрепарата, содержащего биомассу и культуральную жидкость штамма, и проведены опытно-производственные испытания биопрепаратов на сеянцах хвойных в лесном питомнике и культурах злаковых растений. Показано положительное влияние биопрепаратов на увеличение урожайности злаков и выход здоровых сеянцев в питомнике.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы докладывались и обсуждались на конференциях: международных - II «Актуальные проблемы технологии живых систем» (Владивосток, 2007); VII «Живые системы и биологическая безопасность населения» (Москва, 2008); всероссийских - «Рациональное природопользование» (Ярославль, 2005); «Лесной и химический комплекс. Проблемы и решения» (Красноярск, 2006, 2008, 2009); IV съезде биотехнологов России (Пушино, 2006); городской научно-практической конференции «Развитие инновационной деятельности в промышленном комплексе города Красноярска», (Красноярск, 2007) семинаре проблемной лаборатории Сибирского государственного технологического университета (Красноярск, 2009), на научном

симпозиуме «Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее» (Москва, 2011).

Работа выполнена при финансовой поддержке грантами: Российский фонд фундаментальных исследований 06-04-08040 – офи, «Создание высокопродуктивных устойчивых к патогенам форм хвойных растений в культуре *in vitro*, на основе современных достижений в области половой репродукции голосеменных»; 07-04-90843 (МОБ_СТ) грант на прохождение научной стажировки в Московском государственном университете прикладной биотехнологии. Грант РНП.2.2.3.1.2466 Министерства образования и науки РФ "Развитие гербарной коллекции и музея культур грибов Средней Сибири как базы для научно-образовательного процесса"; Красноярский краевой фонд науки "Индивидуальные гранты для молодых ученых" 18G178.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Список литературы включает в себя 200 работ, в т.ч 70 на иностранных языках. Общий объем диссертации 174 страниц из них основного текста 156 страниц. Диссертация включает 40 рисунков, 12 таблиц, 11 приложений.

Публикации. Материалы диссертации изложены в 11 публикациях (из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК). Экспериментальные данные, представленные в диссертации, получены лично соискателем и опубликованы в соавторстве с руководителем и сотрудниками, работавшими совместно с автором в процессе выполнения исследований.

Благодарности Автор выражает благодарность за помощь при выполнении и подготовке работы своему научному руководителю, д.б.н., проф. Т.И. Громовых, д.б.н., проф. Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова Г.М. Зеновой за помощь при идентификации штамма, д.б.н., проф. Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова О.В. Камзолкиной за помощь при исследовании микроморфологии штамма, д.х.н., проф. Института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе РАМН Г.С. Катруха за помощь при идентификации биологически активных соединений.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Обзор литературы

Глава содержит анализ и обобщение литературы по использованию актиномицетов для получения биологически активных соединений и биопрепаратов. Приводится историческая справка о применении биопрепаратов на основе актиномицетов для защиты растений. Особое внимание уделено поиску и путям отбора активных штаммов и видов как агентов биологического контроля фитопатогенных грибов и стимуляторов роста растений, приведена характеристика антибиотических и ростстимулирующих веществ актиномицетов. Показана целесообразность разработки биотехнологии с использованием различных способов культивирования.

2 Объекты и методы исследования

В ходе выполнения данной работы осуществляли лабораторные и полевые исследования. Основным объектом исследования являлся штамм 19/97М *Streptomyces lateritius* (ВКПМ Ас 1637), предложенный для стимуляции роста и защиты растений

от возбудителей сосудистых микозов, вызываемых грибами родов *Fusarium* и *Alternaria*.

Микроморфологические особенности штамма исследовали в живом состоянии путем выращивания культуры актиномицета в камерах Ван-Тигема. Микроморфологию штамма изучали методами световой микроскопии с использованием микроскопа марки LW Scientific (США) и сканирующей электронной микроскопии. Сканирующую электронную микроскопию проводили с помощью микроскопа «Hitachi» S-405A в лаборатории электронной микроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова.

Изучали динамику роста актиномицета при поверхностном и глубинном культивировании (на качалке) в колбах Эрленмейера на 250 мл (100 мл среды) на модифицированных жидких синтетических средах, созданных на основе стандартной крахмало-аммиачной среды. Модификацию качественного и количественного состава среды проводили с целью подбора оптимальных субстратов – источников углерода (крахмал, пептон, глюкоза, сахароза, сорбит, маннит, глицерин, экстракт зерна, нейтрализат) и азота (пептон, дрожжевой автолизат, нитрат калия, нитрат натрия, сульфат аммония, нитрат аммония); поиск оптимальной кислотности среды – использованием фосфатных буферных систем. Оптимизацию условий культивирования проводили методом полного факторного эксперимента и метода крутого восхождения. Основные факторы для оптимизации: температура, концентрация крахмала и сульфата аммония, выходной параметр – концентрация биомассы.

Процесс твердофазного культивирования проводили на древесной зелени после спиртовой экстракции; коре лиственницы после CO₂-экстракции; коре пихты и некондиционном зерне пшеницы сорта Тулунская-12. Прирост продуцента на субстратах определяли по титру количества колониеобразующих единиц (КОЕ) методом высева на оптимизированную агаризованную среду.

Концентрацию биомассы актиномицета при культивировании на жидких средах определяли весовым и колориметрическим методами с использованием спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО). Измерение концентрации крахмала и сахароспиртов проводили, окрашивая крахмал рабочим раствором Люголя, используя цветную реакцию спиртов и гидрата меди соответственно. Содержание белка в биомассе продуцента проводили с использованием красителя амидо-черный 10В. Концентрацию сахаров измеряли эбулиостатическим методом.

Исследования спектра антибиотических веществ, содержащихся в культуральной жидкости и биомассе продуцента, проводили в лаборатории по выделению и идентификации новых антибиотиков Института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН. В работе были использованы методы хроматографии (ТСХ и ВЭЖХ), электрофореза на бумаге в различных электролитах, спектральные методы. Для обнаружения стрептомицина согласно разработанного для этой группы антибиотиков метода выделения проводили сорбцию из нативного раствора на карбоксильном катионите КБ-2(Na⁺) с последующей элюцией раствором соляной кислоты. Согласно схеме выделения проводили экстракцию нативных растворов культуральной жидкости (КЖ) н-бутанолом при исходном рН, кислом рН (3,8-4,5) и щелочном рН=8,6. Биомассу экстрагировали ацетоном при исходном рН, а также при кислых значениях рН. Для обнаружения в КЖ хлорамфеникола (левомицетина) проводили экстракцию этилацетатом при рН=8,65. Спиртовый концентрат из этого экстракта исследовали спектральными и электрофоретическим

методами вместе с образцом левомицетина. Проводили электрофоретическое и хроматографическое исследование спиртовых экстрактов с последующим анализом люминесцентным методом (свечение или поглощение при 260 и 340 нм в УФ-свете на ультрахемископе). Аналитическую и полупрепаративную хроматографию антибиотиков проводили методом TLC на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 "Merck" (Germany) в системе хлороформ-бензол-метанол (30:20:7): UV-VIS-спектры выделенных антибиотиков снимали на спектрофотометре UV-1601 PC (Shimadzu, Япония). ВЭЖХ-анализ проводили на жидкостном хроматографе "Милихром-4" (Россия) на колонках из нержавеющей стали, размером 2x80 мм, заложенных сорбентом «Диасфер» А-110 С-16, 5 мкм и «Кромасил А-100» С-18, 5 мкм (ЗАО БиоХимМак СТ, Москва). Аналитический и полупрепаративный электрофорез на бумаге проводили на V-образном приборе Durruma в электролитах: (E₁) – 1 н уксусная кислота, рН=2,4, 550 V, 2 - 3 ч и (E₂) 30 %-я уксусная кислота, рН=1,7, 550 V, 2 - 3 ч.

На всех стадиях выделения антибиотиков после электрофоретического и хроматографического разделения проводили биоавтографию по методике, предложенной в литературе (Haese, Keller, 1988), методом бумажных дисков с использованием набора тест-организмов: грамположительных: *B. subtilis* ATCC 6633, *B. mycoides* 537, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *B. coagulans*; грамотрицательных: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Comamonas terrigena* ATCC 8461, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и грибы: *Aspergillus niger* ИНА 00760, *Candida albicans* ИНА 00763, *Fusarium oxysporum*.

Определение химического состава метаболитов штамма проводили методом хроматомасс-спектрометрии с использованием хроматомасс-спектрометра Agilent-68–90-N на кварцевой капиллярной колонке HP-5МС с неподвижной фазой (метилсиликоновая) в диапазоне температур 70-280 °С с электронным ударом 70 эВт.

Оценку стимулирующего действия метаболитов актиномицета в культуральной жидкости проводили по показателям энергии прорастания и всхожести семян сосны обыкновенной, ели сибирской, ячменя и пшеницы с использованием метода влажных камер (ГОСТ 13056.5-76).

Полевые испытания биопрепаратов на основе актиномицета *S.lateritius* 19/97М проводили на посевах *Picea obovata* L. и *Pinus sibirica* в Мининском лесом питомнике, расположенном на территории Мининского опытного лесного хозяйства (56°10'с.ш., 92°42'в.д). Эффективность действия метаболитов штамма 19/97 М в агроценозе проводили, используя метод предварительного замачивания семян в культуральной жидкости пшеницы сорта Тулунская -12, КС-15 и ячменя сортов Кедр и Красная Армия 80.

Для оценки сохранения жизнеспособности штамм актиномицета 19/97М *S.lateritius* (в виде сухой биомассы) и препарат, полученный после твердофазного культивирования, хранили в бьюксе при 20-25 °С в течение шести месяцев. Оценку жизнеспособности проводили ежемесячно по показателю КОЕ/г⁻¹ путем посева образцов биомассы на модифицированной крахмало-аммиачной среде.

Статистическую обработку проводили с использованием программного пакета Microsoft Excel. Достоверность различий рассчитывали при доверительной вероятности P=0,95.

3 Биологические свойства штамма *Streptomyces lateritius* 19/97 М

Штамм антагонистически активного актиномицета *S.lateritius* 19/97М образует ветвящийся мицелий на 4-е и 6-е сутки культивирования на жидких и плотных агаризованных средах соответственно, при этом образуются артроспоры, а на 5-е и 7-е сутки мицелий частично распадается на фрагменты (рисунок 1). Штамм образует плотные кожистые колонии, характерные для этой группы микроорганизмов. Продуцент синтезирует пигмент розово-красного цвета, но в процессе исследования может образовывать и атипигментную форму. При микроскопическом анализе было показано, что пигментная и атипигментная форма штамма имеет идентичную структуру мицелия. Возможность образования атипигментной формы свидетельствует о том, что окрашенные вторичные метаболиты не всегда синтезируются штаммом.

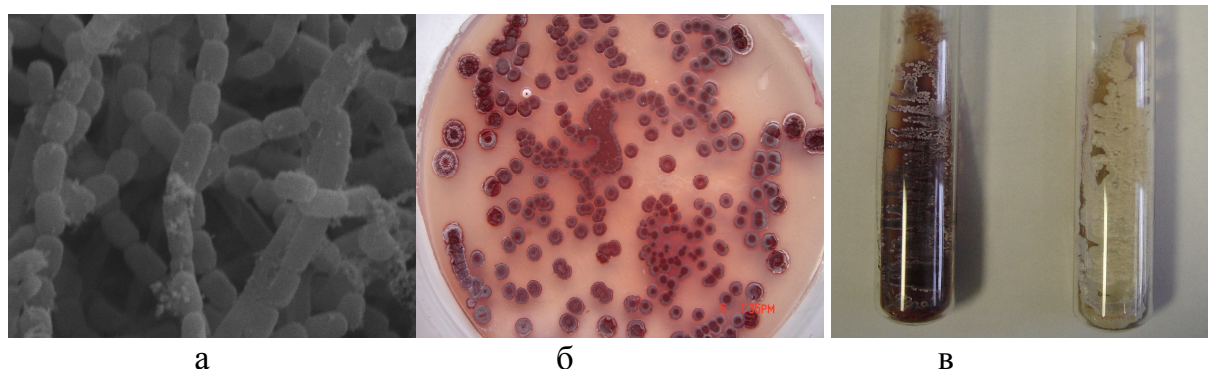


Рисунок 1 – Морфология клеток (а, колоний (б) и образование пигментной и атипигментной форм (в) штамма 19/97М *Streptomyces lateritius*

При культивировании на плотной питательной среде (овсяный агар) в течение 7 сут при $(27 \pm 2)^\circ\text{C}$ штамм продуцирует 3900 ± 200 колониеобразующих элементов с площади 100 мм^2 .

4 Идентификация антибиотиков в культуральной жидкости и мицелии штамма 19/97 *Streptomyces lateritius*

Тенденция применения антибиотиков в кормах, в пищевой промышленности способствует увеличению числа резистентных к антибиотикам микроорганизмов. Поэтому к проблеме использования антибиотиков следует подходить очень осторожно, учитывая возможное попадание их в пищевые продукты и отрицательное влияние на здоровье человека. Недопустимо применение антибиотиков (тетрациклина, стрептомицина, пенициллина, и др.), используемых в медицинской практике (СанПиН 2.3.2.1078-01).

Спектрофотометрические, хроматографические и электрофоретические исследования не выявили наличия в культуральной жидкости и в кислых экстрактах тетрациклина. Электрофорез и ТСХ проводили вместе с аутентичным образцом тетрациклина. УФ-спектральный анализ также не выявил характерных для тетрациклиновых антибиотиков максимумов поглощения $\lambda_{\text{max}} = 269$ и 365 нм .

Для обнаружения в культуральной жидкости хлорамфеникола (левомицетина) проводили экстракцию этилацетатом при $\text{pH}=8,65$. Спиртовой концентрат из этого экстракта исследовали спектральными и электрофоретическим методами. На

основании полученных результатов сделали вывод, о том, что в культуральной жидкости штамма № 19/97-М левомецетин отсутствует. УФ-спектр спиртового концентрата также не содержит характерного для левомецетина максимума поглощения при 278 нм.

Анализ электрофоретическим методом показал, что штамм № 19/97-М антибиотиков аминокликозидной группы, как и стрептомицина не образует.

Биологическая активность в основном была сосредоточена в «красных» фракциях. Даже не значительное количество окрашенного антибиотика проявляет антагонистические свойства в отношении тест-объектов. Пигментная часть накапливается в основном в мицелии продуцента, и как из нативного раствора, так и из мицелия может быть выделена экстракцией при кислых значениях pH. УФ-спектры полученных соединений убедительно свидетельствуют, что выделенные антибиотики красного цвета относятся к группам хинонов и антрациклинов. Из данных литературы (J. Berdy, 1980) следует, что анализируемые антибиотики близки по свойствам к антибиотикам родомицинам и цинерубинам.

5 Оценка антибиотической активности штамма 19/97M *Streptomyces lateritius* в отношении грибов рода *Fusarium*

Принципы использования антагонистически активных микроорганизмов были разработаны еще Н.А. Красильниковым (1953; 1961). Исследования ряда авторов доказывают перспективность использования метаболитов актиномицетов в качестве ингибиторов роста патогенных микроорганизмов, вызывающих заболевания растений.

В результате проведенных исследований доказано, что штамм проявляет активность в отношении грибов рода *Fusarium* при культивировании на подобранной жидкой питательной среде с содержанием фосфатно-щелочного буфера и соблюдении оптимальных условий культивирования (рисунок 2).

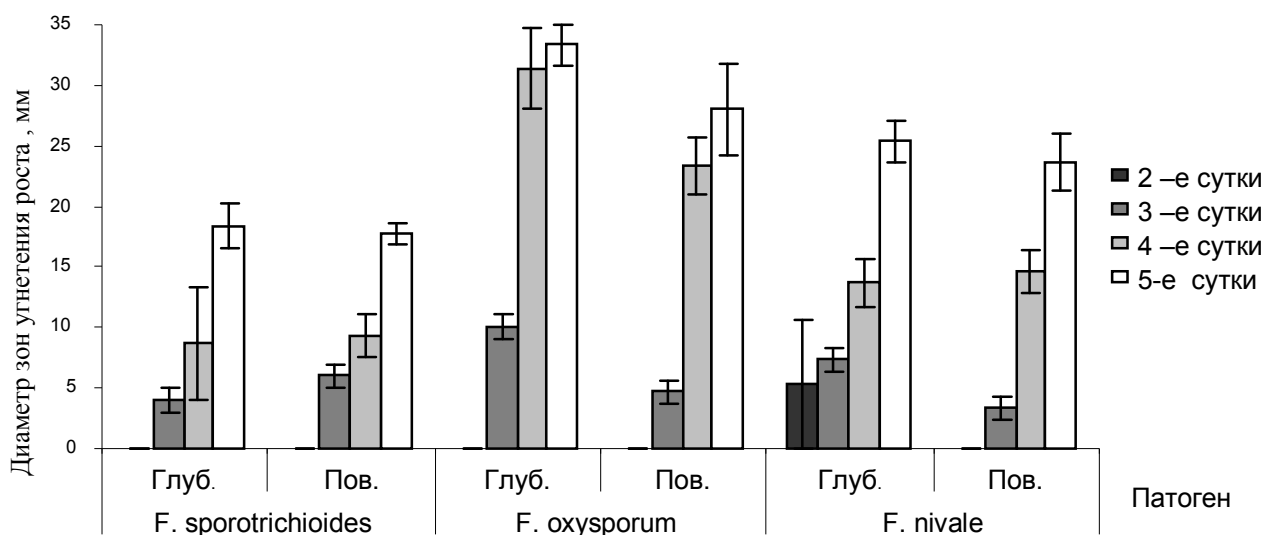


Рисунок 2 - Зоны подавления роста грибов рода *Fusarium* жидкими метаболитами актиномицета *S.lateritius* 19/97M

Актиномицет антагонистически активен в отношении видов *F.nivale*, *F.oxysporum*, *F.solani* и в меньшей степени – в отношении вида *F.sporotrichioides*, к штамму вида *F.sumbucinum* активность экзометаболитов продуцента не проявлялась.

Активность метаболитов при глубинном и поверхностном культивировании максимальна на пятые сутки.

Таблица 1 - Зоны подавления роста фитопатогенов экстрактами, полученными после твердофазной ферментации штамма

Водный экстракт	Зоны подавления роста, мм <i>F.oxysporum</i>	Зоны подавления роста, мм <i>F.solani</i>
<i>S.lateritius</i> на коре пихты после CO ₂ -экстракции	12,7±1,4	11,7±0,7
<i>S.lateritius</i> на коре лиственницы	10,7±1,7	9,3±1,5
<i>S.lateritius</i> на древесной зелени после спиртовой экстракции	14,7±1,2	15,0±2,1
Контроль	0	0

Таким образом, кора хвойных после CO₂- экстракции и древесная зелень после спиртовой экстракции могут быть использованы в качестве субстрата для твердофазной ферментации, при этом сохраняется антагонистическая активность штамма 19/97М.

6 Оценка жизнеспособности биомассы *Streptomyces lateritius* при хранении

Использование микроорганизмов в биоконтроле предполагает не только получение и применение, но и сохранение их антибиотических свойств. Поэтому требуется обязательный контроль антибиотической активности и жизнеспособности биомассы штамма-антагониста.

Титр КОЕ препарата после сушки без хранения $3,65 \cdot 10^{11}$ КОЕ/г⁻¹ приняли за 100 %. Изучаемый штамм сохраняет свою жизнеспособность и активность в течение шести месяцев с численностью КОЕ $1,7 \cdot 10^{11}$ КОЕ/г⁻¹, что составляет 48,04 % от исходного значения. Количество КОЕ после шести месяцев хранения удовлетворяет требованиям для биологических препаратов, содержащих бактерии [Егоров, 1989].

Штамм также хорошо сохраняет свою жизнеспособность при культивировании на отходах лесной и лесоперерабатывающей промышленности. Установлено, что в течение шести месяцев хранения штамм в полученном биопрепарате сохраняется с титром: на древесной зелени пихты - $1,94 \cdot 10^7$, на коре лиственницы – $1,55 \cdot 10^7$, на коре пихты – $1,19 \cdot 10^6$ КОЕ·г⁻¹.

Независимо от способа культивирования, штамм сохраняет антагонистические и биологические свойства на необходимом уровне на протяжении всего срока хранения.

7 Динамика роста штамма 19/97М *Streptomyces lateritius* при культивировании на жидких средах

На процесс роста и развития продуцентов оказывают влияние многие факторы, к ним относятся температура и pH ферментационных жидкостей, способ и продолжительность культивирования, состав питательных сред.

При глубинном культивировании адаптация штамма 19/97М *Streptomyces lateritius* к источникам углерода и азота происходит значительно быстрее, чем при поверхностном, что подтверждается более коротким латентным периодом: лаг фаза

сокращается с 24-36 до 18-20 ч. Удельная скорость роста в период экспоненциальной фазы роста культуры при глубинном и поверхностном культивировании составляет $(0,068 \pm 0,014) \text{ ч}^{-1}$ и $(0,057 \pm 0,017) \text{ ч}^{-1}$ соответственно. Количество образующейся биомассы в стационарной фазе не зависит от способа культивирования. К моменту выхода в стационарную фазу роста экономический коэффициент максимален, на 4-е сутки при глубинном культивировании и составляет $(25,77 \pm 3,74) \%$, а при поверхностном на 6-е сутки и составляет $(22,53 \pm 1,32) \%$. В связи с этим культивирование штамма 19/97M *S.lateritius* целесообразно проводить в течение пяти суток в условиях глубинного культивирования и шести суток поверхностного культивирования.

В условиях поверхностного культивирования биомасса штамма формируется преимущественно в виде поверхностных колоний, на поздних стадиях роста в виде поверхностной пленки. В условиях глубинного культивирования штамм формирует сферические колонии, распределенные в толще среды.

Важной характеристикой для накопления биомассы является обеспеченность культуры источниками углерода, являющимися строительным материалом и источником энергии для клетки. В результате жидкофазного поверхностного и глубинного культивирования было установлено, что штамм 19/97M *Streptomyces lateritius* способен использовать различные субстраты в качестве источника углерода. Штамм успешно растет на средах, содержащих моно-, дисахариды и сахароспирты, обладает способностью утилизировать глицерин, этиловый спирт. Однако максимальное накопление биомассы $(2,16 \pm 0,131) \text{ г/л}$ было достигнуто при культивировании на среде с крахмалом, несмотря на то, что удельная скорость этого процесса была несколько ниже, чем на маните или глюкозе (таблица 2). Возможно, низкая скорость роста связана со скоростью утилизации амилозы и амилопектина, входящих в состав крахмала.

При разработке биотехнологии препаратов защиты растений важным аспектом является подбор питательных сред с использованием растительных и животных субстратов – отходов сельского хозяйства, пищевой и лесоперерабатывающей промышленности. К тому же сведения о культивировании актиномицетов на питательных средах, содержащих зерновые экстракты и нейтрализаты, немногочисленны [Андреюк 1981; Jicheng, 2008].

Для культивирования штамма на зерне использовали отфильтрованный экстракт из размолотого зерна пшеницы сорта Тулунская 12 с добавлением в среду минеральных компонентов. В качестве питательной среды из древесных растений использовали нейтрализат следующего химического состава: - гексозы (глюкоза, манноза, галактоза) – 2,4-2,6 %, пентозы (ксилоза, арабиноза) – 0,40-0,60 %, органические кислоты – 0,17%, фурфурол – 0,022-0,3 %, pH – 3,9-4,1.

Исследования показали, что максимальное накопление биомассы штаммом на пшеничном экстракте, происходит на 7-е сут культивирования и соответствует $(1,88 \pm 0,09) \text{ г/л}$. На нейтрализате прирост биомассы культуры был низкий, стационарная фаза наступила уже на 4-е сутки культивирования, при этом биомасса в культуральной жидкости составила $(0,21 \pm 0,05) \text{ г/л}$.

На основании проведенных исследований установлено, что для накопления биомассы актиномицета следует использовать крахмалосодержащие натуральные среды.

Таблица 2 - Основные кинетические параметры процессов культивирования штамма на различных источниках углерода

	Удельная скорость роста, ч ⁻¹	Общая скорость роста, г/ч	Экономический коэффициент, %	M _{max} ч ⁻¹	K _s , г/л	Максимальное количество биомассы, г/л
Крахмал	0,057±0,017	0,015	22,53±0,132	0,086	5,600	2,16±0,131
Сахароза	0,074±0,014	0,009	19,86±0,254	0,112	7,266	1,27±0,055
Глюкоза	0,064±0,004	0,010	20,13±0,007	0,096	6,251	1,23±0,062
Маннит	0,085±0,001	0,009	19,72±0,045	0,128	8,363	1,10±0,066
Сорбит	0,042±0,014	0,008	18,38±0,037	0,063	4,116	1,05±0,009
Глицерин	0,014±0,000	0,003	5,62±0,015	0,021	1,338	0,38±0,051
Нейтрализат	0,058±0,017	0,002	2,10±0,139	0,087	5,675	0,21±0,027
Зерновой экстракт 1 фаза	0,043±0,004	0,011	23,48±0,231	0,065	4,226	1,88±0,09
2 фаза	0,028±0,075			0,043	2,768	

Важнейшим элементом всех живых систем является азот, т.к он входит в состав аминокислот и участвует в образовании пептидных связей белка. Анализ роста культуры на средах, включающих в себя неорганические источники азота, показал, что штамм *S. lateritius* способен усваивать как соли аммония, так и нитратов, осуществляя ассимиляционную нитратредукцию. Несмотря на то, что наилучшими источниками азота для многих актиномицетов считаются протеины, пептоны и аминокислоты (Звягинцев 1987, Зенова 1989), рост штамма на средах с пептоном и дрожжевым экстрактом обнаружен не был. Лучшим источником азотного питания для штамма был сульфат аммония. Количество биомассы на питательной среде, содержащей этот источник азота, составило (2,25±0,045) г/л, удельная скорость роста (0,052±0,002) ч⁻¹.

Кислотность среды является важным фактором при культивировании всех микроорганизмов. Она влияет на свойства клеточных стенок, транспорт питательных веществ, скорость роста и т.д. Для решения проблемы нейтрализации образуемых штаммом кислых продуктов метаболизма и создания постоянного pH использовали буферные системы со значениями pH=7.0: буфер Серенсена (Na₂HPO₄/KH₂PO₄) и фосфатно-щелочной буфер (KH₂PO₄/NaOH). Замена карбоната кальция в составе среды на буферную систему приводит к улучшению процесса накопления биомассы продуцентом. Наибольший рост биомассы штамма был отмечен на средах с фосфатно-щелочным буфером (K₂HPO₄/NaOH).

Для подбора оптимального значения pH использовали фосфатно-щелочной буфер со значениями pH 6-8 (шаг варьирования 0,5), культивирование проводили на крахмало-аммиачной среде. Установлено, что максимальное накопление биомассы штаммом 19/97М *S.lateritius* в период культивирования достигается при значении pH=7,2.

Согласно проведенным исследованиям в состав синтетической питательной среды для культивирования актиномицета *S.lateritius* 19/97М в качестве источника углерода целесообразно включать крахмал, а в качестве субстрата-источника азота - сульфат аммония.

При анализе кинетических характеристик роста культуры были определены условия для оптимизации процесса накопления биомассы штаммом. В качестве параметров оптимизации были выбраны: X_1 – температура культивирования, °С; X_2 – концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в субстрате, г/л; X_3 – концентрация крахмала в субстрате, г/л, Y – концентрация биомассы, г/л. Согласно проведенным исследованиям установлено, что оптимальной для получения максимального количества биомассы является среда с концентрацией крахмала 12,5 г/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0 г/л. Температура (27 ± 1) °С, pH - 7.2. Для поддержания оптимальной кислотности следует использовать фосфатно-щелочной буфер.

Оптимизация условий культивирования позволила увеличить выход биомассы исследуемого штамма *Streptomyces lateritius* 19/97М. При поверхностном культивировании продуцента концентрация биомассы и удельная скорость роста культуры увеличились и составили $(2,57 \pm 0,61)$ г/л и $(0,069 \pm 0,02)$ ч⁻¹ соответственно.

8 Твердофазное культивирование штамма *Streptomyces lateritius* 19/97М

В Красноярском крае остается актуальным вопрос переработки отходов растительного сырья, образующихся в процессе лесозаготовок. Известны работы по использованию растительных отходов для получения биопестицидов на основе антагонистически активных штаммов грибов рода *Ttichoderma* [Лунева, 2008; Рязанова 2000; Садыкова, 2003; Шкаликов 1994]. Для получения биопрепаратов на основе актиномицетов подобные исследования не проводились. Поэтому представляло интерес оценить способность штамма 19/97 М *Streptomyces lateritius* к росту на твердых питательных субстратах.

Основываясь на предварительных исследованиях в качестве субстратов, использовали кору пихты после углекислотной экстракции, древесную зелень пихты после извлечения спирторастворимых веществ, кору лиственницы и некондиционное зерно сорта Тулунская-12.

В результате исследований установлено, что самые высокие показатели накопления биомассы были отмечены на измельченном зерне $-18,6 \cdot 10^{11}$ КОЕ/г⁻¹. При росте на древесной зелени и коре лиственницы численность КОЕ достигает на 30-е сутки культивирования $2,19 \cdot 10^{11}$ и $1,59 \cdot 10^{11}$ КОЕ, г⁻¹ соответственно (таблица 3).

Таблица 3 - Динамика численности штамма 19/97 М *Streptomyces lateritius* на растительных субстратах

Субстрат	Титр штамма 19/97 М <i>S. lateritius</i> на растительных субстратах, 10^{11} КОЕ/ г ⁻¹ , при культивировании в течение					
	5 сут	10 сут	15 сут	20 сут	30 сут	40 сут
Древесная зелень	-	1,91	-	1,99	2,19	2,19
Кора лиственницы	-	1,50	-	1,59	1,64	1,59
Кора пихты	-	0,10	-	0,10	0,11	0,11
Некондиционное зерно	9,8	18,6	16,9	-	-	-
Примечание – прочерк означает, что численность КОЕ показывает начало фазы отмирания или не достоверность от предыдущего значения						

Как показали исследования, на коре пихты продуктивность штамма была значительно ниже в сравнении с таковой на других субстратах. Это, вероятно, связано с большим содержанием в коре труднодоступных соединений, которые не утилизируются штаммом.

В массе коры лиственницы, на некондиционном зерне и древесной зелени, начиная с четвертых суток культивирования, появляется пигмент, синтезируемый продуцентом, что указывает на то, что выбранные субстраты не влияют на процессы биосинтеза вторичных метаболитов штаммом.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что для получения биопрепарата на основе штамма *S.lateritius* 19/97М возможно успешное использование не только синтетических сред, но и натуральных субстратов.

9 Оценка эффективности использования штамма актиномицета *Streptomyces lateritius* 19/97М в биологическом контроле сеянцев и злаков

Установлено, что штамм 19/97М *S. lateritius* в процессе своей жизнедеятельности кроме антибиотиков может синтезировать и другие биологически активные вещества, обеспечивающие ростостимулирующие свойства. Известно, что эти свойства актиномицетов используют в растениеводстве для повышения урожайности и стимулирования прорастания семян [Красильников 1958, Шкаликов 1994], в том числе, хвойных [Demain 1983]. Исследования в лабораторных условиях показали, что штамм оказывает ростостимулирующее действие на семена хвойных. Так, энергия прорастания и всхожесть семян *Larix sibirica* L, *Picea obovata* L и *Pinus sylvestris* L, обработанных культуральной жидкостью продуцента, увеличивается (таблица 4). Активность штамма сохраняется и при твердофазном культивировании на растительных субстратах. При обработке семян лиственницы водными экстрактами, полученными после культивирования штамма на древесной зелени, энергия прорастания составляла 79 %, тогда как в контроле – 37 %.

Таблица 4 – Оценка ростостимулирующего действия штамма 19/97М *Streptomyces lateritius* на семена хвойных

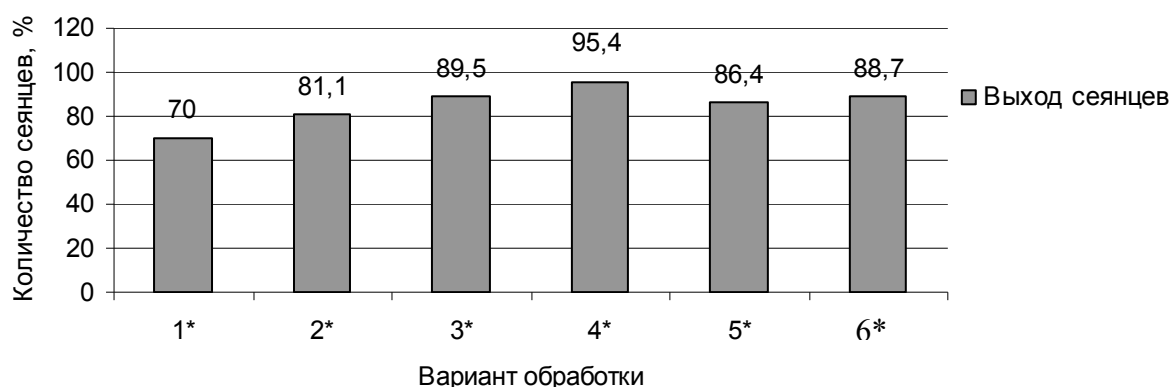
Семена, обработанные культуральной жидкостью штамма 19/97М	Энергия прорастания семян, %	Всхожесть, %	Средняя длина побега, мм
<i>Larix sibirica</i> L	51,0±2,7	54,0±1,3	42,1±5,3
Контроль (стерильная вода)	19±3,3	39±2,7	29,7±7,2
<i>Picea obovata</i> L	38,6±2,6	83,1±4,4	14,2±5,4
Контроль (стерильная вода)	33,6±2,3	61,3±3,5	12,0±1,3
<i>Pinus sylvestris</i> L	56,7±3,4	79,1±3,9	18,7±2,6
Контроль (стерильная вода)	44,1±3,6	66,8±2,3	17,0±2,4

Эффективность различных форм биопрепарата на основе штамма 19/97М оценивали в лесном питомнике. Результаты испытаний обработки семян и внесения различных форм препарата на основе штамма в посевы *Picea obovata* L показали, что всхожесть семян и выход сеянцев значительно увеличились в сравнении с

контрольными вариантами. Наибольшее влияние оказала обработка семян метаболитами. Грунтовая всхожесть увеличивается на 32,3 %. Послевсходовый выпад сеянцев при использовании культуральной жидкости штамма составил 4,6 %, при этом в контрольных вариантах – 30 %, т.е выход здоровых сеянцев при обработке был более 95 % (рисунок 3). Эффективное действие оказала комбинированная обработка посевов с биопрепаратом на основе антагонистически активного штамма МГ6 *T.asperellum*. Выход здоровых сеянцев *Picea obovata* L при совместном использовании двух штаммов составил 92,7 %, что в 1,5 раза выше контрольных значений.

Таким образом, в полевых испытаниях доказано, что антагонистически активный штамм *S.lateritius* является перспективным для получения биологических препаратов на его основе с целью оздоровления и увеличения объемов лесопосадочного материала.

В ходе лабораторных исследований было показано, что метаболиты штамма 19/97М стимулируют всхожесть и снижают уровень инфицируемости семян пшеницы сорта КС-15 и ячменя сортов Красноярский–80 и Кедр. Водные экстракты из биомассы, полученной после культивирования продуцента на коре лиственницы и древесной зелени, оказывают на прорастание семян злаковых лучшее действие, чем после культивирования на коре пихты.



* 1 – контроль; 2 - обработка КЖ *S. lateritius*, полученной на среде с мелом; 3 - обработка КЖ *S. lateritius*, полученной на среде с фосфатным буфером; 4 - обработка КЖ *S. lateritius*, полученной на среде с фосфатно-щелочным буфером, 5- обработка иммобилизованной на цеолите КЖ *S.lateritius*, полученной на среде с фосфатно-щелочным буфером, 6 - внесение препарата, полученного при культивировании *S. lateritius* на древесной зелени пихты

Рисунок 3 – Выход здоровых сеянцев при обработке почвы лесного питомника метаболитами штамма (процент от числа проросших семян).

Полевые испытания, проведенные на посевах злаков в условиях ОПХ «Минино» в период 2006-2007 гг., показали, что при обработке культуральной жидкостью штамма семян злаков урожайность в опытных посевах пшеницы увеличилась в 1,5 раза, а ячменя в 3,5 раза.

Оценка внутренней инфекции урожая семян, выращенных при использовании препарата, показала значительное снижение инфицированности, в среднем 2,5-4 раза, чем на контрольных семенах.

Технологическая часть

На основании результатов исследований разработаны схемы получения биопрепарата в двух формах:

- в виде спорового материала получаемого методом глубинного культивирования на оптимизированной крахмало-аммиачной среде;
- в виде гранул получаемых методом твердофазной ферментации штамма на измельченных отходах сельского хозяйства, лесной и лесоперерабатывающей промышленности.

Технология получения препарата глубинным культивированием.

Производительность цеха составляет 14,5 тонн в год чистого мицелиально-спорового материала. Производство работает в периодическом режиме, 64 цикла в год из расчета на 320 рабочих дней. Один цикл составляет пять суток.

Технология получения препарата методом глубинного культивирования представлена на рисунке 4. С помощью дозаторов для сыпучих веществ основные компоненты среды поступают в смеситель для приготовления сред и емкости для приготовления буфера. Полученный буфер (рН 7,2) поступает в смеситель для приготовления среды. Подготовленная для культивирования среда подается на стерилизацию паром в стерилизатор, затем после охлаждения в холодильнике поступает в основной ферментер. Ферментер с мешалкой снабжен рубашкой, для поддержания постоянной температуры ферментации 27 °С. Посевной мицелиально – споровый материал, с помощью дозаторов подается в ферментационный аппарат. Засев проводят из расчета 5% от объема препарата получаемого за один цикл. После достижения стационарной фазы роста КЖ выводится из нижней части ферментера и поступает на сепараторы первой, а затем второй ступени. Суспензия концентрируется, из нижней части сепараторов выходит отработанная КЖ и поступает в бак для ее сбора. Далее суспензия подается на сушку в сушильный шкаф, имеющий систему отвода воздуха. Затем биопрепарат поступает на упаковку и хранение. Упакованный препарат хранится в сухом темном помещении при комнатной температуре. Срок хранения препарата 6 месяцев. Количество готового продукта составляет 240 кг за один цикл работы цеха. В таблице 5 приведены текущие затраты для получения готового биопрепарата.

Таблица 5 – Текущие затраты на получение мицелиально-спорового препарата

Наименование	Количество на 230 кг продукта, т	Суммарная стоимость, руб	Количество на 14,5 т продукта, т	Суммарная стоимость, руб
Крахмал	1,1	16780	71,6	1073930
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2	430	11,5	27493
NaCl	0,1	70	5,7	4468
K ₂ HPO ₄	0,7	117273	44,7	7505482
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1	2864	5,7	183284
NaOH	0,1	2205	8,0	141129
Вода	89,5	901	5727,6	57677
Электроэнергия, кВт·ч	92,0	127	5888,0	8125
Всего		140650		9001587

Технология получения препарата твердофазной ферментацией

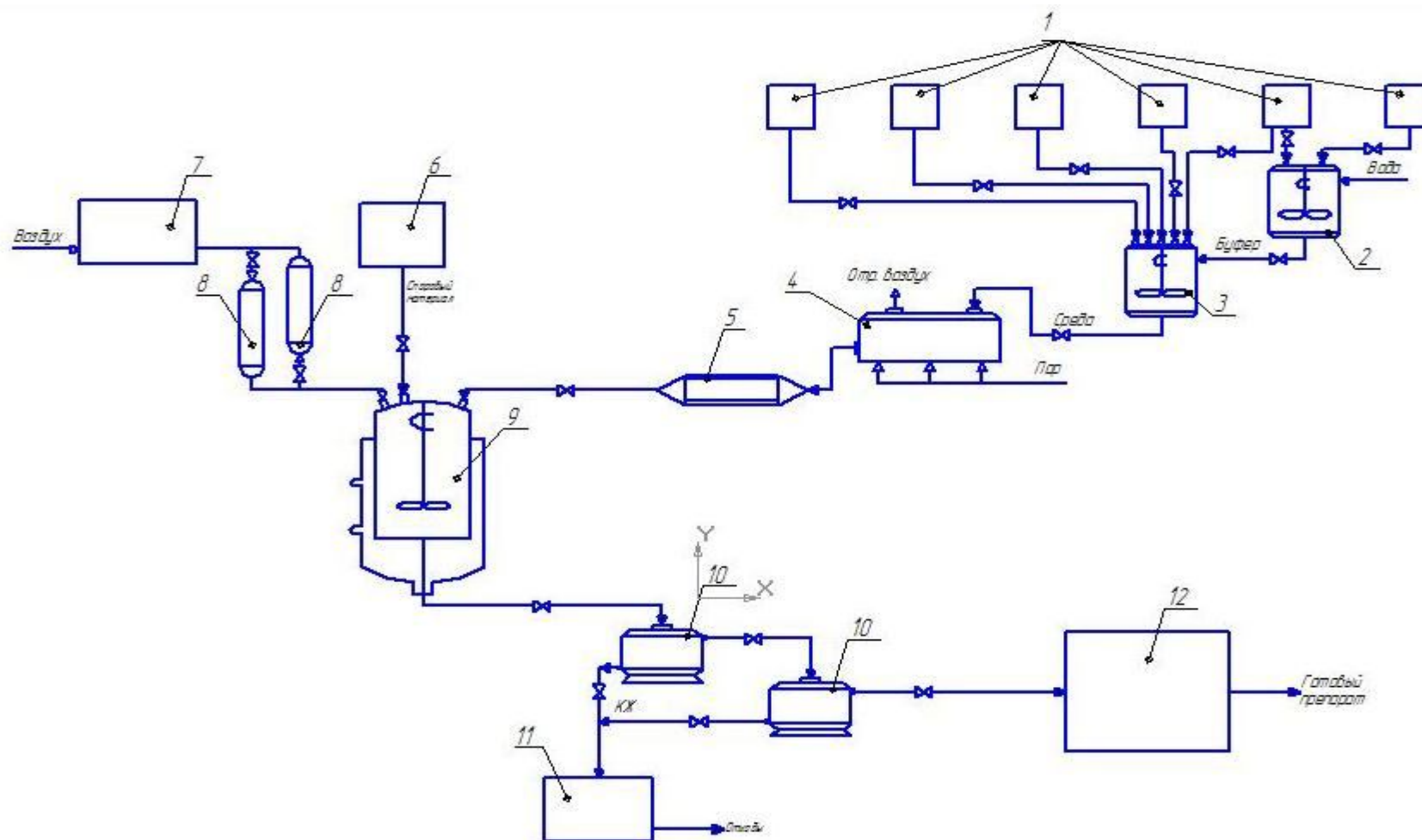
Производительность цеха составляет 14,5 тонн в год препарата. Производство работает в периодическом режиме, 32 цикла в год из расчета на 320 рабочих дней. Один цикл составляет десять суток.

Технологическая схема получения препарата методом твердофазной ферментации показана на рисунке 5. Установка должна быть полностью герметизирована и смонтирована в особом герметичном помещении. Измельченный до 3-5 мм. растительный субстрат (древесная зелень после спиртовой экстракции) обогащается 2 %-м $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ –и поступает в стерилизатор, где стерилизуется паром. Затем с помощью шнека поступает в растительную камеру, субстрат охлаждается с помощью кондиционера до температуры 27 °С. Перед На подающей и вытяжной линии воздуха устанавливают фильтры для бактериальной очистки. Культивирование штамма проводят в течение 10-ти суток при постоянной температуре и аэрации стерильным воздухом. После окончания процесса полученный препарат подается с помощью ленточного конвейера в бункер узла упаковки и далее на фасовку и упаковку. Над ленточным конвейером устанавливается вытяжной зонт, воздух с которого поступает на очищение в циклоны. Затем препарат упаковывают в бумажные мешки и хранят в сухом темном помещении при комнатной температуре. Срок хранения препарата составляет 6 месяцев. Количество готового продукта составляет 460 кг за один цикл работы цеха. В таблице 6 приведены текущие затраты для получения готового биопрепарата.

Таблица 6 – Текущие затраты на получение мицелиально-спорового препарата

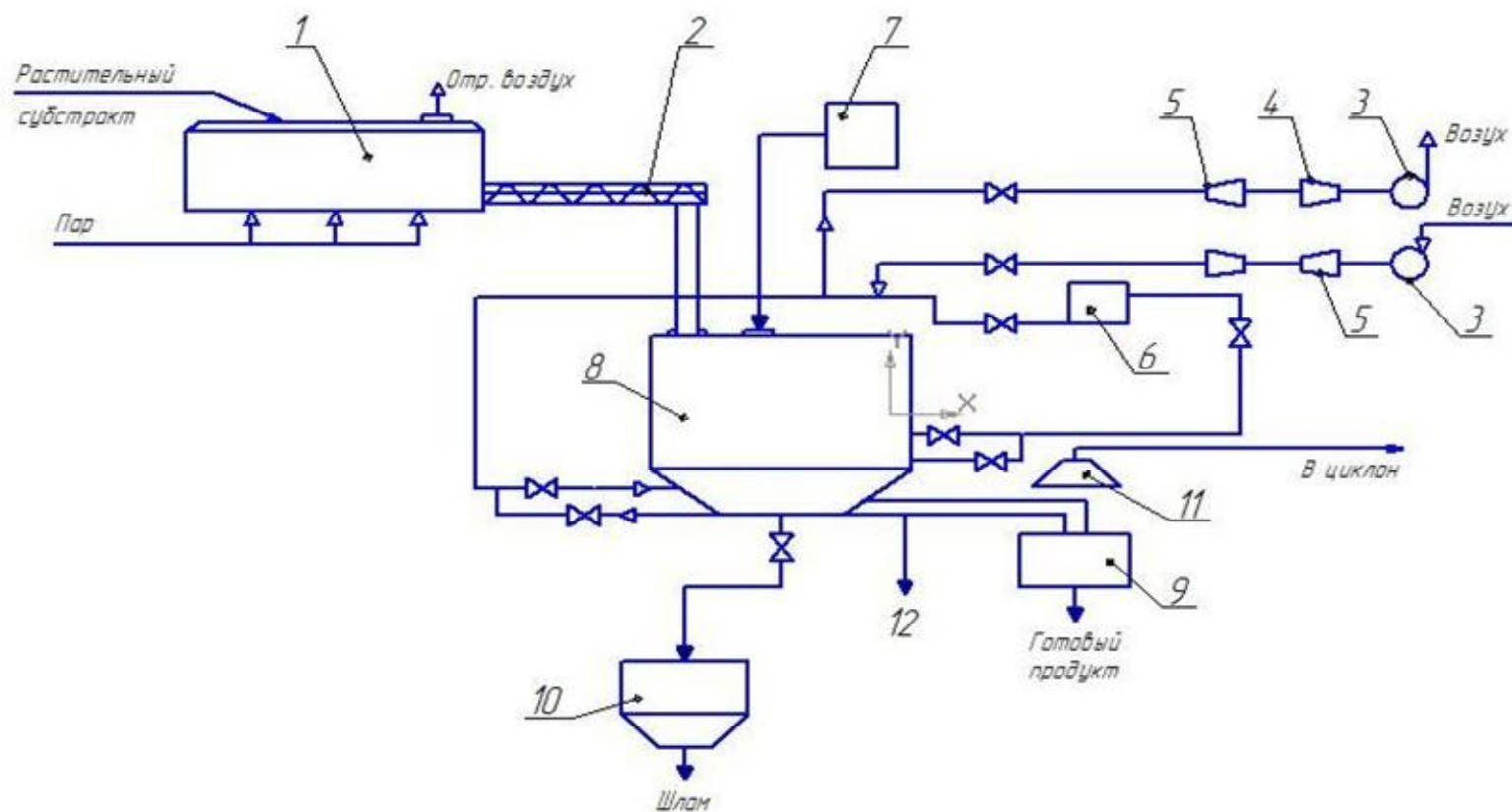
Наименование	Количество на 460 кг продукта, т	Суммарная стоимость, руб	Количество на 14,5 т продукта, т	Суммарная стоимость, руб
Древесная зелень после спиртовой экстракции	0,46	138,0	14,7	4416, 0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,09	193,5	2,9	6192,0
Вода	0,45	0,6	14,4	19,8
Электроэнергия, кВт·ч	92,0	126,9	2944	4062,7
Всего		459,1		14690,5

Сравнительный анализ основных экономических характеристик получения препарата глубинным жидкофазным и поверхностным твердофазным культивированием, показал перспективность получения препарата в промышленных объемах, независимо от способа культивирования. К увеличению себестоимости в первом случае ведут значительные материальные затраты на компоненты питательной среды и оборудование, при этом срок окупаемости производства достаточно короткий. Спорово-мицелиальная биомасса и гранулированный препарат имеют ряд преимуществ по отношению друг к другу. Поэтому, не смотря на разницу себестоимости, ожидается стабильный потребительский интерес в отношении обеих форм препарата.



1 – дозатор, 2 – емкость для приготовления буфера, 3 – емкость для приготовления среды, 4 – стерилизатор, 5 – теплообменник, 6 – дозатор спорового материала, 7 – компрессорная установка, 8 – бактериологический фильтр, 9 – ферментер, 10 – сепаратор, 11 – сборник КЖ, 12 – сушильный шкаф.

Рисунок 4– Технологическая схема получения препарата глубинным культивированием



1 – стерилизатор, 2 – шнековый транспортёр, 3 – вентилятор, 4 – бактериальный фильтр, 5 – фильтр Река, 6 – кондиционер, 7 – посевной материал, 8 – растительная камера, 9 – бункер узла упаковки, 10 – сборник шлама, 11 – зонт с вытяжной трубой, 12 – ленточный конвейер.

Рисунок 5 – Технологическая схема получения препарата твердофазной ферментацией

Выводы

1. Изучены биотехнологические особенности штамма *S. lateritius* 19/97М при поверхностном и глубинном культивировании. Установлено, что штамм способен использовать различные субстраты в качестве источника углерода крахмал, моно-, дисахариды и сахароспирты, глицерин, этиловый спирт. Удельная скорость роста штамма составила: на средах содержащих манит - 0,085 ч⁻¹, сахарозу - 0,074 ч⁻¹, глюкозу - 0,064 ч⁻¹, крахмал - 0,057 ч⁻¹. Лучшим для роста штамма является аммонийный источник азота.

2. Для максимального получения биомассы культивирование штамма *S.lateritius* 19/97 целесообразно проводить при pH 7,2 и температуре 27 °С на питательной среде состава: крахмал -12,5 г/л, (NH₄)₂SO₄ - 2 г/л, NaCl – 1 г/л, K₂HPO₄ – 1 г/л, MgSO₄ x 7H₂O – 1 г/л, буфер (K₂HPO₄/NaOH) – 1л. Для нейтрализации кислых продуктов метаболизма рекомендовано использовать фосфатно-щелочной буфер (K₂HPO₄/NaOH).

3. Оптимизация среды и условий культивирования позволила увеличить выход биомассы мицелия исследуемого штамма до концентрации (2,57±0,61) г/л, удельная скорость роста культуры составила (0,069±0,02) ч⁻¹

4. Установлено, что биологически активными соединениями продуцента 19/97М являются окрашенные пигменты розово-красного цвета, относящиеся к группам хинонов и антрациклинов. Штамм *S.lateritius* 19/97М не синтезирует антибиотики пенициллинового, тетрациклинового ряда, стрептомицина, хлорамфеникола, карнамицина, что дает основание использовать его в защите растений.

5. Доказана антагонистическая активность в отношении фитопатогенов рода *Fusarium* и ростостимулирующая активность в отношении семян хвойных и злаковых культур при культивировании на различных источниках углерода и азота сохраняющиеся при длительном хранении продуцента.

6. Установлено, что штамм хорошо культивируется на твердых субстратах, сохраняя длительный период свою жизнеспособность и биологическую активность. Наиболее перспективно использование древесной зелени пихты для получения биопрепарата на основе штамма 19/97 М *S.lateritius* с титром 1,91·10¹¹ КОЕ·г⁻¹.

7. Нарботаны различные формы биопрепарата на основе продуцента 19/97 М *S.lateritius*, содержащие биомассу и культуральную жидкость штамма. Проведенные опытно-производственные испытания показали, что использование биопрепаратов на основе продуцента увеличивает урожайность злаков в 1,2 раза и выход здоровых сеянцев в лесном питомнике в 9,5 раз.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. **И. И. Гайдашева**, Т. И. Громовых, В. М. Ушанова, Г. А. Сизых, Ю. А. Литовка, В. С. Садыкова. Перспективы получения биопрепарата на основе активного штамма 19/97М *Streptomyces lateritius* для защиты сеянцев хвойных // Хвойные бореальной зоны. – 2007. – Т. XXIV, № 4-5. – С. 482-486.
2. **И. И. Гайдашева**, В. С. Садыкова, П. Н. Бондарь, Н. В. Зобова, Т. И. Громовых. Перспективы использования новых биопрепаратов для защиты злаков в Средней Сибири // Вестник КрасГАУ. – 2008. – № 1 (22). – С. 74-78.
3. **И. И. Гайдашева**, И.Н. Третьякова, В. С. Садыкова, Н. Е. Носкова, П. Н. Бондарь, Т. И. Громовых, А. С. Иваницкая, М. В. Ижболдина, А. В. Барсукова. Ростстимулирующая активность штаммов рода *Streptomyces lateritius* и

- Trichoderma* и перспективы их использования для микрклонального размножения хвойных // Биотехнология. – 2009. – № 1. – С. 39-41.
4. *Тулунина И. И. Изучение биологических свойств нового продуцента биопрепарата защиты растений *Streptomyces lateritius* 19/97М / П. П. Кормилец, И. И. Тулунина, Г. А. Сизых, Н. Р. Габидулина, И. Р. Габидулина // Экология и проблемы окружающей среды : XI всерос. науч. конф. – Красноярск, 2004. – С. 24-25.
 5. Гайдашева, И. И. Оптимизация условий культивирования продуцента биопрепаратов защиты растений штамма 19/97М *Streptomyces lateritius* / И. И. Гайдашева, П. П. Кормилец // Рациональное природопользование: материалы Всерос. науч. конф. аспирантов и студентов по приоритетному направлению. – Ярославль, 2005. – С. 13-18.
 6. Гайдашева, И. И. Оптимизация параметров культивирования штамма 19/97М *Streptomyces lateritius*, продуцента биопрепарата защиты растений / И. И. Гайдашева, П. П. Кормилец, Т. В. Августинovich // Лесной и химический комплексы - проблемы и решения: ст. всерос.науч.-практ. конф. – Красноярск, 2006. – Т. 3. – С. 56-58.
 7. Гайдашева, И. И. Разработка биотехнологии продуцента биопрепарата «Латерин» для защиты растений / И. И. Гайдашева, Т. И. Громовых // Развитие инновационной деятельности в промышленном комплексе города Красноярска : материалы гор. науч.-практ. конф. – Красноярск, 2007. – С. 71-74.
 8. Гайдашева, И. И. Оценка продуктивности и биологической активности штамма 19/97М *Streptomyces lateritius* на различных источниках углерода / И. И. Гайдашева, Т. И. Громовых // Актуальные проблемы технологии живых систем : II междунар. науч.-техн. конф. молодых ученых. – Владивосток, 2007. – С. 10-13.
 9. Гайдашева, И. И. Влияние биопрепаратов защиты растений на продуктивность злаков в средней Сибири / П. Н. Бондарь, И. И. Гайдашева // Живые системы и биологическая безопасность населения : материалы VII Междунар. науч. конф. студ. и молодых ученых. – М. : МГУПБ, 2008. – С. 5-7.
 10. Гайдашева, И. И. Влияние метаболитов штамма актиномицета *Streptomyces lateritius* 19/97М на рост и развитие злаков в лабораторных условиях / И. И. Гайдашева, Т. И. Громовых // Лесной и химический комплексы - проблемы и решения: ст. всерос.науч.-практ. конф. – Красноярск, 2009.
 11. Гайдашева, И. И. Изучение химического состава и биологической активности вторичных метаболитов антагонистически активного штамма *Streptomyces lateritius* 19/97 М / И. И. Гайдашева, Т.И. Громовых // Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее: Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием. М., 2011.- с. 29.
- * - 02.07. 2005 года сменила фамилию на Гайдашева в связи с регистрацией брака.