

На правах рукописи



Ляховченко Никита Сергеевич

**«БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВИОЛАЦЕИНА НА
ОСНОВЕ БАКТЕРИИ *JANTHINOBACTERIUM LIVIDUM* ДЛЯ
ПРОИЗВОДСТВА БИОПРЕПАРАТОВ С
АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ»**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Белгород – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

Научный руководитель – **Соляникова Инна Петровна**

доктор биологических наук, ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ», директор Регионального микробиологического центра НИУ БелГУ.

Официальные оппоненты – **Маркова Юлия Александровна**

доктор биологических наук, ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН, заведующий лабораторией растительно-микробных взаимодействий;

Николаев Юрий Александрович

доктор биологических наук, ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», заведующий лабораторией выживаемости микроорганизмов.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук»

Защита состоится «18» декабря 2025 г. в 12:30 на заседании совета 24.2.287.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий» по адресу: 394036, Воронеж, пр-т Революции, д. 19, конференц-зал.

Отзывы на автореферат, заверенные гербовой печатью учреждения, просим присылать ученому секретарю совета 24.2.287.02.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «ВГУИТ». Полный текст диссертации размещен в сети «Интернет» на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ» www.vsuet.ru.

Автореферат размещен в сети Интернет на интернет-сайте ВАК Министерства науки и высшего образования РФ: vak.minobrnauki.gov.ru и на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ» www.vsuet.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.т.н.



_____ О.Л. Мещерякова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Биотехнология соответствует задачам Стратегии научно-технического развития РФ, обеспечивая переход к высокопроизводительному и экологичному сельскому хозяйству. Динамика рынка подтверждает тренд на биологизацию растениеводства: по данным Государственного каталога пестицидов, ассортимент микробных биопрепаратов за последние годы вырос на 40,39%, что в 4 раза превышает темпы роста химических средств (12,5%). Ожидается, что к 2030 году объем рынка биопрепаратов превысит 311,2 млрд рублей.

Развитие органического производства, регламентированное Федеральным законом № 280-ФЗ, также стимулирует спрос на биологические средства защиты. К 2030 году потребление органической продукции должно достичь 149,8 млрд рублей, а площадь соответствующих земель - 4,2 млн га. Рост числа производителей в реестре (с 203 до 237 за август-декабрь 2024 года) подтверждает эту тенденцию. Для дальнейшего расширения ассортимента биофунгицидов необходим поиск новых микроорганизмов-антагонистов патогенов растений.

Перспективным направлением является использование микробных пигментов, которые способны подавлять рост возбудителей заболеваний растений. Например, пигмент виолацеин, продуцируемый штаммом *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D, может лечь в основу новых препаратов. Однако его практическому применению препятствует недостаток данных о влиянии условий культивирования на биосинтез, методах выделения виолацеина из биомассы и его воздействии на сельскохозяйственные культуры, например, яровую пшеницу. Изучение этих аспектов является актуальной задачей.

Целью настоящей работы является выделение и характеристика штамма бактерий *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D, изучение признаков рода, получение фракции пигмента и изучение его биотехнологической значимости.

В задачи диссертационного исследования входило:

1. выделить пигментсинтезирующий штамм бактерий, изучить его таксономические признаки и охарактеризовать;
2. определить характеристики роста штамма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D в ходе периодического глубинного культивирования в зависимости от объема питательной среды;
3. выявить особенности условий биосинтеза виолацеина при культивировании штамма бактерий *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D;
4. изучить механизмы антимикробного действия виолацеина на тест-культуры плесневых грибов и бактерий;

5. оценить возможность использования штамма бактерий *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D и фракции пигмента в биотехнологии.

Научная новизна. Выявлено 39 новых признаков бактерий рода *Janthinobacterium*, а именно: отрицательные результаты реакций на уреазу, β -галактозидазу, аргининдигидролазу, лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу, триптофандеаминазу, образование ацетоина (реакция Фогес-Проскаура), образование H_2S , использование эритритола, D-арабинозы, L-ксилозы, D-адонитола, метил- β D-ксилопиранозида D-сорбозы, L-рамнозы, дульцитолола, метил- α D-маннопиранозида, метил- α D-глюкопиранозида, амигдалина, арбутина, салицина, D-целлобиозы, D-мелибиозы, гликогена, гентиобиозы, D-туранозы, D-тагатозы, D-фукозы, L-фукозы, L-арабита, калия глюконата и калия 5-кетоглюконата, а также положительные результаты тестов на использование D-рибозы, N-ацетилглюкозамина, эскулина (железа-цитрата), ксилита, D-ликсозы, D-арабита и калия 2-кетоглюконата.

Выявлено, что увеличение объема питательной среды влияет на характеристики роста штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D при периодическом глубинном культивировании. Показано, что в объеме 7000,0 мл длительность лаг-фазы (*L*) снижается, относительно культуры в объеме 1000,0 мл на 57,6%. При этом удельная скорость роста (μ) повышается на 8,7%, скорость деления (ν) на 9,0%. Время удвоения (*g*) плотности клеток в 7000,0 мл меньше, чем в 1000,0 мл на 7,8%. Масса лиофильно высушенной культуры увеличивается в 6,9 раза. Выдвинуто предположение о том, что повышение скорости роста и деления (μ , ν), снижение времени удвоения (*g*) и длительности лаг-фазы (*L*) является следствием более подходящих условий культивирования *J. lividum* ВКМ В-3705D.

Выявлено, что масса лиофильно высушенной культуры выросла в 6,9 раз, но выход пигмента – всего в 4,2 раза. Выдвинуто предположение, что снижение интенсивности биосинтеза виолацеина связано с увеличением объема питательной среды, изменением режима перемешивания или возникновением локального дефицита кислорода.

Выявлена зависимость снижения констант скорости роста культур плесневых грибов *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754 и *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864 на 53,7% и 46,3%, соответственно, от присутствия *J. lividum* ВКМ В-3705D. Удельный прирост (*R*) культуры *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402 при совместном культивировании с *J. lividum* ВКМ В-3705D снижается на 36,4%. Выявлена зависимость снижения активности АТФ-азы из *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402 на 22,0% от присутствия в реакционной смеси фракции виолацеина.

Теоретическая и практическая значимость. Получены новые и расширены существующие знания о признаках бактерий рода

Janthinobacterium; об особенностях роста культуры в условиях биореакторной системы в однокомпонентной жидкой питательной среде; о противомикробной активности *J. lividum* в отношении некоторых тест-культур при совместном культивировании; о снижении активности АТФ-азы штамма *Clavibacter michiganensis* ВКМ Ас-1402 в присутствии фракции виолацеина. Полученные данные дополняют существующие знания о роли пигментов, синтезируемых микроорганизмами, что способствует развитию новых направлений в микробиологии и биотехнологии.

В ходе исследования были адаптированы и усовершенствованы некоторые методики совместного и индивидуального культивирования микроорганизмов, которые могут быть использованы в поисковых научно-исследовательских работах.

Практическая значимость исследования заключается в том, что была выявлена противомикробная активность штамма *J. lividum* ВКМ D-3705D в отношении тест-культур возбудителей заболеваний растений. Среди них наиболее существенна бактериостатическая активность бактерии при совместном культивировании с *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402, так как этот вид входит в перечень микробов, подлежащих экспортному контролю. Полученные сведения в ходе исследования могут быть использованы для разработки биотехнологического процесса получения препаратов для средств защиты растений. Это позволит создать новый отечественный бренд биопрепаратов с новой категорией действующего вещества – пигмента микробного происхождения, и способствовать повышению технологического суверенитета.

Объекты данного исследования: оценку чувствительности к штамму *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D проводили с использованием 23 тест-культур грамположительных и грамотрицательных бактерий, полученных как из ВКМ, так и из рабочей коллекции: 1. *Pseudomonas aeruginosa* ML4262; 2. *P. putida* KT2442; 3. *P. protegens* 38a; 4. *P. chlororaphis* PCL1391; 5. *P. fluorescens* В 849; 6. *P. caryophylli* ВКМ 1290; 7. *Escherichia coli* S; 8. *E. coli* В; 9. *Erwinia herbicola* ATCC 27155; 10. *Alcaligenes faecalis* ВКМ 1518; 11. *Bacillus cereus* GA5T; 12. *B. weihnestephanensis* КВА4; 13. *B. subtilis*; 14. *B. shaericus* ВКМ В509-1; 15. *B. thuringiensis* ATCC 35646; 16. *B. flexus* 17. *Micrococcus luteus* В1891; 18. *M. roseus* В1236; 19. *Staphylococcus* sp. 35; 20. *Arthrobacter* sp. В52; 21. *Deinococcus radiodurans*; 22. *Achromobacter ruhlandii* В-1330; 23. *Clavibacter michiganensis* ВКМ Ас-1402.

В качестве тест-культур плесневых грибов: 1. *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864; 2. *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754.

В качестве тест-культур для определения цитотоксической

активности использовали линии клеток HeLa, Jurkat, Radji и TF-1, полученные из коллекции Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика Павлова.

Методы исследования. В диссертационной работе использовали общенаучные и специальные методы исследования:

1. молекулярно-генетические методы анализа 16S рРНК, используя универсальные праймеры для прокариот, а именно: 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') и 1525r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC3');

2. стандартные методы оценки культуральных и морфологических свойств изолята;

3. стандартные методы определения физиологических и биохимических свойств микроорганизмов;

4. биомассу *J. lividum* ВКМ В-3705D получали методом периодического глубинного культивирования;

5. фракцию виолацеина получали экстракцией изопропиловым спиртом из биомассы *J. lividum* ВКМ В-3705D;

6. стандартные методы оценки антагонистического потенциала *J. lividum* ВКМ В-3705D и фракции виолацеина.

Научные положения, выносимые на защиту:

- аборигенный штамм *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D является пигментсинтезирующим представителем водного сообщества реки Везёлка города Белгорода;

- штамм *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D обладает антимикробной активностью в отношении тест-культур некоторых возбудителей заболеваний растений;

- штамм *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D способен к росту в однокомпонентной жидкой питательной среде, состоящей из пептона мясного ферментированного, при $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ с аэрацией 8,0 л/мин, pH = 7,0-8,0 и скорости перемешивания до 300 об/мин;

- виолацеин, синтезируемый штаммом *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D, оказывает антимикробное действие в отношении *Clavibacter michiganensis* ВКМ Ас-1402 за счет снижения активности его АТФ-азы.

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 189 страницах машинописного текста, содержит 46 рисунков. Структура диссертации состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов исследований, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, состоящего из 211 наименований, в том числе 188 на иностранном языке, и приложений.

Личный вклад автора. Личное участие автора состоит в проведении поиска и анализе информации по исследуемой теме, выборе

направления исследований, непосредственное участие в постановке цели и задач исследовательской работы, планировании, подготовке и проведении экспериментов, а также анализе и обработке результатов. Автор подготовил публикации в международные научные журналы, а также представил итоги исследований в ходе конференций.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ: из них 1 статья в рецензируемом научном издании из перечня ВАК Минобрнауки России, 3 статьи, индексируемых в базах данных научного цитирования Scopus, РИНЦ, 2 статьи в сборниках материалов конференций, индексируемых в международных базах данных научного цитирования (Scopus, РИНЦ). Опубликовано 7 тезисов и материалов конференций (индексируемых РИНЦ). Получено 4 свидетельства охраны результатов интеллектуальной собственности (патентов).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе анализируются данные о микробных пигментах, вторичных метаболитах с защитными функциями, включая УФ-защиту и антимикробную активность. Особое внимание уделено виолацеину, его биосинтезу и регуляции. Подчеркивается его биотехнологический потенциал, в частности цитотоксичность против опухолевых клеток, что актуально для разработки новых препаратов.

Во второй главе описаны объекты и методы. Основной объект – штамм *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D, продуцент виолацеина. Приведены методы его выделения, идентификации, изучения роста в биореакторе, экстракции пигмента, оценки антимикробной активности и цитотоксичности на опухолевых клеточных линиях.

В третьей главе представлены, проанализированы и обсуждены результаты исследований, структурированные в тринадцать разделов.

1. Идентификация аборигенного штамма пигментообразующей бактерии.

В первом разделе показаны результаты выделения из воды реки Везёлка штамма, обозначенного как JF4 и его идентификации. Методом молекулярно-генетического анализа 16S рРНК с достоверностью 95,0% идентифицировали бактерию как *Janthinobacterium lividum*. Нуклеотидная последовательность депонирована в GenBank под номером MW244020, а штамм передан во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (ВКМ В-3705D).

Исследование физиологических свойств штамма ВКМ В-3705D показало, что он является облигатным аэробом, способным расти в диапазоне температур 4–28°C, что позволяет классифицировать его как факультативный психрофил. Оптимальный рост наблюдается при pH = 7,0. Штамм выдерживает концентрацию NaCl до 2,0% и способен расти на

среде Эшби без азота, что предполагает его способность к азотфиксации.

Культура утилизирует простые углеводы (D-глюкозу, D-фруктозу) и обладает протеолитической активностью (рост на казеине). Методом диффузии в агар, было показано, что штамм не обладает генами резистентности к большому числу применявшихся антибиотиков.

2. Подбор состава питательной среды.

Во втором разделе представлены результаты оптимизации состава питательной среды. Установлено, что максимальный удельный прирост культуры ($R = 34,4\%$) обеспечивает среда с содержанием пептона $3,0\%$. Статистический анализ подтвердил достоверность преимущества данной концентрации над контролем ($1,0\%$ пептона, $R = 33,7\%$; $t = 2,764 > t_{st} = 2,447$). Относительная погрешность измерений не превышала $1,0\%$. Данный состав был использован в работе в качестве ростовой среды.

3. Характеристика роста штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D при глубинном периодическом культивировании в биореакторной системе.

Во третьем разделе показаны результаты изучения влияния длительности культивирования посевного материала. Наибольший удельный прирост отмечен при использовании 8-часового инокулята; посевной материал старше 12 часов решено не использовать так как культура находится в стадии замедления роста.

Изучены кинетические параметры роста штамма при периодическом глубинном культивировании в объемах $1000,0$ мл и $7000,0$ мл (рис. 1). Увеличение объема до $7000,0$ мл значительно улучшило ростовые характеристики: длительность лаг-фазы (L) сократилась на $57,6\%$ (с $7,31$ до $3,1$ ч), удельная скорость роста (μ) возросла на $8,7\%$ (с $0,543$ до $0,590$ ч⁻¹), а время генерации (g) снизилось на $7,8\%$ (с $1,28$ до $1,18$ ч). В объеме $1000,0$ мл наибольшее потребление аминного азота ($75,0\%$) и максимальный удельный прирост наблюдались на 12 -м часу; отмечено защелачивание среды.

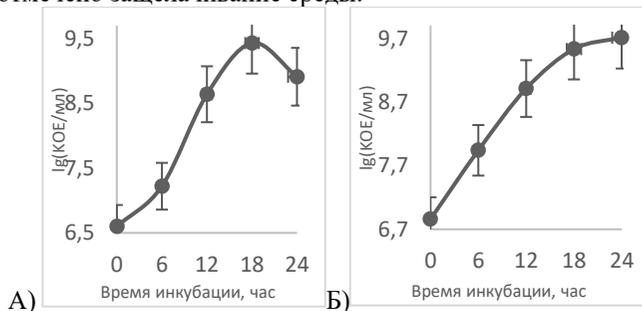


Рисунок 1. Кривые роста культуры *J. lividum* ВКМ В-3705D в биореакторной системе при периодическом глубинном культивировании в $1000,0$ мл (А) и $7000,0$ мл (Б) жидкой среды

Выход биомассы в объеме 7000,0 мл составил $4,43 \pm 0,05$ г лиофилизированных клеток, что в 6,9 раз превышает показатель для 1000,0 мл ($0,64 \pm 0,02$ г). Влажность биомассы во всех опытах составила 5,61–6,26%. Наибольшая концентрация виолацеина ($17,96 \pm 0,08$ мг/г сухой биомассы) достигнута в объеме 7000,0 мл, что в 4,2 раза выше, чем в 1000,0 мл ($4,3 \pm 0,001$ мг/г). Расхождение в кратности прироста биомассы (6,9) и пигмента (4,2) может быть обусловлено изменением условий (перемешивание, аэрация) в увеличенном объеме. В настоящее время в научной литературе отсутствуют сведения о результатах культивирования *J. lividum* в объеме 7000,0 мл, а приведенные выше характеристики роста получены впервые.

Для экстракции пигмента подобран метод с использованием изопропилового спирта и диметилсульфоксида (ДМСО), концентрация виолацеина в экстракте составила 28,4 мг/л. Идентификация подтверждена комплексом методов: спектрофотометрический анализ ($\lambda_{max} = 575$ нм), качественная реакция с серной кислотой (зеленое окрашивание), ТСХ (система ацетон-этилацетат, 1:1), ^1H ЯМР-спектроскопия (сигналы в области 6,7–9,0 м.д. приведенные на рисунке 2).

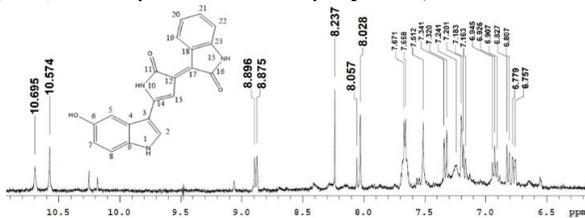


Рисунок 2. ^1H WET 1D спектр ЯМР экстракта пигмента *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D в ДМСО

Анализ литературы показал, что достигнутый выход виолацеина является конкурентоспособным. Научная новизна работы заключается в установлении зависимости кинетики роста и продуктивности штамма-продуцента от объема культивирования и в комплексной характеристике биосинтеза виолацеина штаммом *J. lividum* ВКМ В-3705D. Таким образом, оптимизация состава среды и объемно-кинетических параметров культивирования позволяет значительно увеличить выход как биомассы, так и целевого пигмента.

4. Противобактериальная активность *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D

В четвертом разделе приведены результаты исследования антибактериальной активности штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D против 23 тест-культур бактерий.



Рисунок 3. Оценка чувствительности *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 к *J. lividum* ВКМ В-3705D методом агаровых дисков

Выявлено, что *J. lividum* ВКМ В-3705D проявляет слабую антибактериальную активность. Зоны подавления роста у чувствительных культур были минимальны (1–2 мм в диаметре). Эффект наблюдался лишь в отношении ограниченного числа микроорганизмов: грамотрицательных *Pseudomonas putida* КТ2442 (2,0 мм) и *P. fluorescens* В 849 (1,0 мм), а также грамположительных *Micrococcus luteus* В1891 (1,0 мм) и *Achromobacter ruhlandii* В-1330 (1,0 мм). Большинство протестированных культур оказались нечувствительными.

Полученные данные позволяют предположить, что штамм не осуществляет активный выброс антибиотиков в культуральную жидкость. Наблюдаемый ограниченный эффект, вероятно, связан с действием внутриклеточного пигмента виолацеина, который не секретируется в среду в значительных количествах.

5. Чувствительность *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 к штамму бактерии *J. lividum* ВКМ В-3705D при совместном культивировании.

В пятом разделе приведены результаты изучения антагонистической активности штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D против фитопатогена *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402. Качественные методы (перпендикулярные штрихи, агаровые диски) выявили выраженный бактериостатический эффект без зарастания зоны ингибирования. На модельных фрагментах томата совместная инокуляция предотвратила порчу тканей, демонстрируя потенциал биоконтроля.

Количественный анализ выявил сложную динамику совместного культивирования. Через 12 часов численность фитопатогена в смешанной культуре достоверно снизилась на 3,8% ($p < 0,05$), однако к 24 часам превысила контроль на 11,8% ($p < 0,05$), что может указывать на адаптацию патогена.

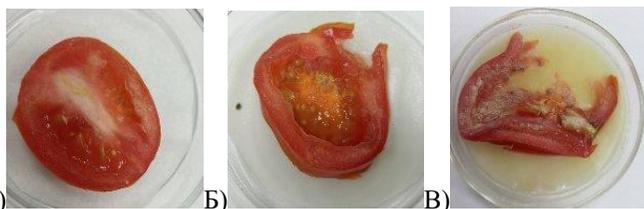


Рисунок 4. Культивирование исследуемых культур на томатах, где:
 А) фрагмент плода, инокулированный штаммом *J. lividum* ВКМ В-3705D;
 Б) фрагмент, инокулированный смесью
J. lividum ВКМ В-3705D-*C. michiganensis* ВКМ Ас-1402; В) фрагмент,
 инокулированный *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402

Кинетические параметры подтвердили антагонистическое влияние *J. lividum* ВКМ В-3705D в отношении *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402: удельный прирост снизился на 36,4%, константы скорости роста и деления - на 23,0% и 21,0% соответственно, время удвоения плотности культуры увеличилось на 28,6%. При этом ростовые показатели *J. lividum* ВКМ В-3705D улучшились: его удельный прирост возрос на 37,5%.

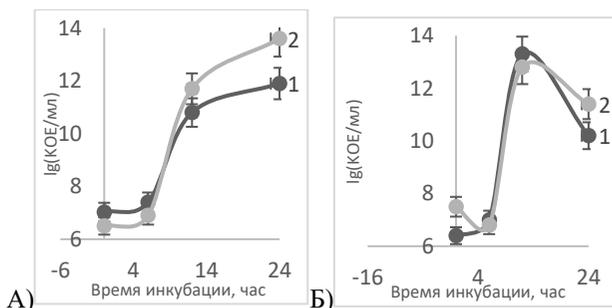


Рисунок 5. Изменение численности колониеобразующих единиц ($lg(KOE/мл)$) *J. lividum* ВКМ В-3705D (А) и *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 (Б) в чистой (1) и смешанной (2) культуре в течение 24 часов инкубации

Таким образом, доказана бактериостатическая активность штамма *J. lividum*, существенно изменяющая кинетику роста фитопатогена. Наблюдаемый временный характер эффекта требует дальнейшего изучения механизмов адаптации патогена для повышения эффективности биоконтроля.

6. Влияние фракции виолацена на ростовые свойства *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402.

В шестом разделе приведены результаты оценки чувствительности фитопатогена *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 к фракции пигмента,

полученной из штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D (рис. 7).

Метод дисков показал, что неразбавленная фракция пигмента (82,7 мкМ) обладает слабой ингибирующей активностью, образуя зону подавления роста радиусом 3,0 мм. Эффект достоверно отличался от контроля с чистым растворителем ($p < 0,05$). Снижение концентрации пигмента до 9,19 мкМ и 4,86 мкМ приводило к уменьшению антибактериального действия, подтверждая зависимость «доза-эффект».

В условиях глубинного культивирования *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 подтверждено бактериостатическое действие виолацена. Введение неразбавленного экстракта в концентрации 0,05% от объема снижало удельный прирост культуры на 37,9% ($p < 0,001$). Увеличение доли фракции до 0,1% и 0,15% усиливало ингибирование до 39,7% и 57,7% соответственно. Чистый растворитель (ДМСО) в концентрации 0,15% подавлял рост лишь на 11,8%, что подтверждает основную роль виолацена.

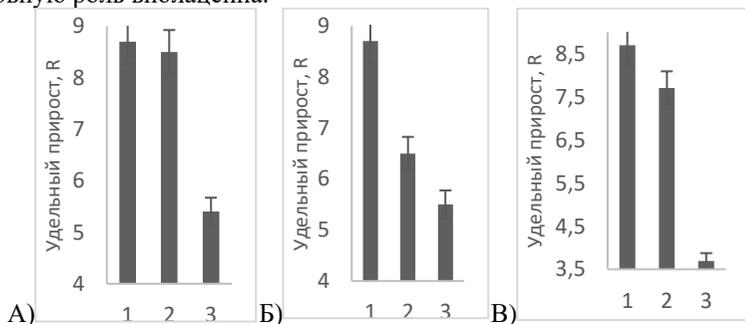


Рисунок 7. Удельный прирост *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 в чистой культуре - контроль (1), в присутствии ДМСО (2) и фракции виолацена в ДМСО (3), в концентрации 0,05% (А), 0,1% (Б) и 0,15% (В) от объема среды

Степень подавления не превышала 80,0% ни в одном варианте, что характерно для бактериостатического, но не для бактерицидного действия. Разбавленные образцы пигмента не оказывали значимого влияния на кинетику роста. Таким образом, доказано, что виолацен обладает выраженной бактериостатической активностью в отношении *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402, зависящей от его концентрации, что открывает перспективы его применения в биоконтроле возбудителей заболеваний растений.

7. Исследование влияния фракции виолацена на морфометрические свойства клеток *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 методом атомно-силовой микроскопии (АСМ).

В седьмом разделе приведены результаты исследования влияния

чистого растворителя (ДМСО) и фракции виолацеина на морфометрические характеристики клеток *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 методом атомно-силовой микроскопии (табл. 1).

Наиболее выраженное воздействие оказал чистый ДМСО: высота клеток уменьшилась на 42% ($p < 0,01$), шероховатость поверхности (S_a) - на 56,8% ($p < 0,01$). Разбавленный ДМСО вызывал аналогичные, но менее значительные изменения (табл. 1). Фракция виолацеина в ДМСО (9,19 мкМ) также приводила к статистически значимому снижению высоты клеток на 15% ($p < 0,05$) и шероховатости на 17% ($p < 0,05$), однако эти эффекты были менее выражены, чем у чистого растворителя. Разбавленная фракция значимого влияния не оказывала (табл. 1).

Таблица 1. Средние морфометрические свойства клеток *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 после культивирования с фракцией виолацеина и ДМСО

Варианты	Длина, μm	Высота, nm	S_a , nm	S , μm^2	V , μm^3
Контроль (15 клеток)	3,3±0,1	201,5±9,6	11,1±0,8	4,5±0,3	0,6±0,1
ДМСО (11 клеток)	3,0±0,2	116,9** ± 13,3	4,8**±0,5	4,2±0,3	0,5±0,1
Разбавленный ДМСО (4:0.5) (10 клеток)	3,0±0,2	159,9*±14,7	8,1*±2,3	4,6±0,4	0,6±0,1
Фракция виолацеина в ДМСО (19 клеток)	3,1±0,1	171,2*±10,3	9,2*±1	4,9±0,4	0,7±0,1
Разбавленная фракция виолацеина (4:0.5) (10 клеток)	3,1±0,2	194,4±10,3	9,9±1,3	4,6±0,5	0,7±0,2

Данные, представленные средними значениями ± SEM.; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Полученные данные свидетельствуют о снижении способности клеток к адгезии и поддержанию формы, что проявляется в их «провисании». Вероятно, это связано с увеличением проницаемости мембраны и утечкой клеточного содержимого. Известно, что виолацеин способен связываться с липидными мембранами, однако, в ходе эксперимента выявлено, что ДМСО оказывает больший эффект. Причина бактериостатической активности может быть связана со способностью снижать активность мембранных ферментов.

8. Скорости роста плесневых грибов *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864 и *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754 при совместном культивировании с штаммом бактерии *J. lividum* ВКМ В-3705D.

В восьмом разделе приведены результаты исследования, в результате которого выявлена умеренная противогрибковая активность штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D и его метаболита виолацеина. Штамм достоверно подавлял рост фитопатогена *Alternaria brassicicola*: диаметр колонии уменьшился на 10,0% (рис. 8).

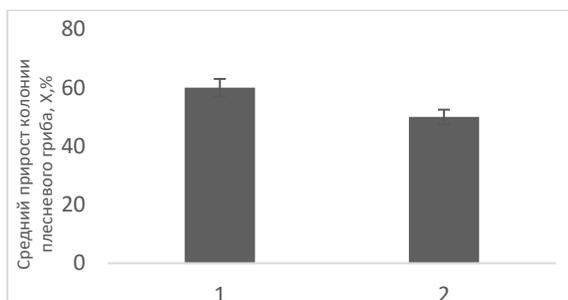


Рисунок 8. Средний прирост колонии плесневого гриба *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864 (контроль) (1) и в присутствии штамма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D (2)

Виолацин вызывал дозозависимое ингибирование среднего прироста колоний *A. brassicicola* ВКМ F-1864 до 18,0%. Наибольший эффект отмечен против *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754: скорость роста снижена на 46,3%, диаметр колонии - с 41,5 мм до 24,25 мм (рис. 9).

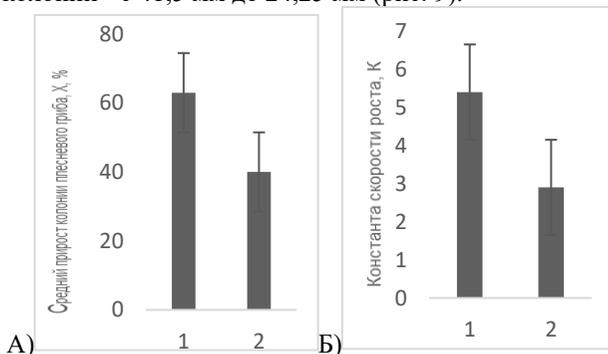


Рисунок 9. Средний прирост (А) и константа скорости роста (Б) колонии *A. unguis* ВКМ F-1754 как показатель противогрибковой активности *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D

Полученные данные демонстрируют перспективность использования штамма и виолацина в качестве экологически безопасных средств биоконтроля фитопатогенных грибов.

9. Активность аденозинтрифосфатазы (КФ 3.6.1.3) в бесклеточном экстракте бактерии *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 в присутствии фракции виолацина.

В девятом разделе приведены результаты исследования, которое показало, что фракция виолацина статистически значимо ($p < 0.001$)

ингибирует активность мембранной АТФ-азы фитопатогена *C. michiganensis*. Чистый ингибирующий эффект пигмента после учета действия растворителя составил 22,0% (табл. 2). Предполагается, что механизм действия связан с нарушением проницаемости мембраны и ионного транспорта. Подтверждена бактериостатическая активность штамма-продуцента *J. lividum* и установлено, что очищенный виолацеин *in vitro* подавляет удельный прирост патогена на 57,7%.

Таблица 2. Активность неочищенной аденозинтрифосфатазы (КФ 3.6.1.3) *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 в присутствии фракции виолацеина в ДМСО после инкубирования в течение 10 минут

Варианты	Относительная погрешность измерения, %	Активность фермента, МЕ/мин	Степень подавления активности фермента, IR	Критерий достоверности Стьюдента, t
Контрольный вариант без АТФ-аз (Бланк) ₍₁₎	1,68	-		
Контрольный вариант, содержащий АТФ-азу ₍₂₎	1,63	0,1		$t_{(1-2)} = 44,8^{***}$;
ДМСО неразбавленный ₍₃₎	1,33	0,09		$t_{(3-2)} = 4,17^{**}$;
Неразбавленная фракция в ДМСО ₍₄₎	1,27	0,07	$IR_{(2-3)} = 8,3\%$;	$t_{(4-2)} = 11,39^{***}$;
ДМСО-вода в соотношении 4:0,5 ₍₅₎	1,88	0,13		$t_{(5-2)} = 9,76^{***}$;
Фракция в ДМСО-вода в соотношении 4:0,5 ₍₆₎	1,00	0,1	$IR_{(2-4)} = 31,5\%$	$t_{(6-2)} = 2,1$;
ДМСО-вода в соотношении 4:0,25 ₍₇₎	0,68	0,1		$t_{(7-2)} = 1,4$;
Фракция в ДМСО-вода в соотношении 4:0,25 ₍₈₎	0,83	0,1		$t_{(8-2)} = 0,87$;
				$t_{(4-3)} = 16,65^{***}$

Примечание: * - различие статистически значимо при уровне $p < 0,05$ ($t_{ст} = 2,228$); ** - различие статистически значимо при уровне $p < 0,01$ ($t_{ст} = 3,169$); *** - различие статистически значимо при уровне $p < 0,001$ ($t_{ст} = 4,587$).

Результаты демонстрируют перспективность использования штамма и его метаболитов для разработки средств биоконтроля против карантинного патогена *Clavibacter michiganensis*.

10. Чувствительность *P. chlororaphis* ВКМ В-3546Д к штамму *J. lividum* ВКМ В-3705Д при совместном культивировании.

В десятом разделе приведены результаты исследования, в ходе которого установлено, что штамм *Pseudomonas chlororaphis* ВКМ В-3546Д проявляет бактериостатическую активность по отношению к *J. lividum* ВКМ В-3705Д. При этом, на 6 час инкубации численность культур

в смеси выше, чем у чистых. На твердой среде зафиксировано подавление пигментации у *J. lividum* ВКМ В-3705D, а в жидкой среде - ингибирование его роста при стабильной численности антагониста, что характерно для бактериостатического эффекта. Данный факт объясняется способностью *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D продуцировать антимикробные метаболиты (феназины, пирролнитрин, сидерофоры). Предположено, что *J. lividum* ВКМ В-3705D способна выступать в качестве стимулятора антагонистической активности псевдомонады, что подтверждает перспективность применения виолацеин-синтезирующего штамма в биотехнологии за счет стимулирования продукции антимикробных агентов у псевдомонады.

11. Антимикробная активность *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D в присутствии штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D.

В одиннадцатом разделе приведены результаты исследования, которые показали, что смесь штаммов *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D и *J. lividum* ВКМ В-3705D проявляет более высокую противогрибковую активность против *A. unguis* ВКМ F-1754, чем чистая культура псевдомонады (рис. 10).

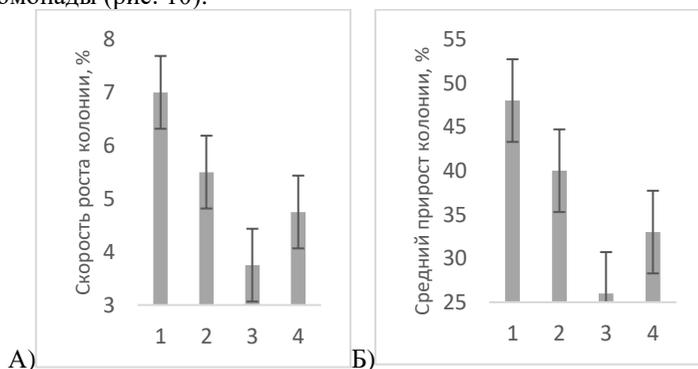


Рисунок 10. Скорость роста (А) и средний прирост (Б) колонии плесневого гриба *A. unguis* ВКМ F-1754, где: 1 – контроль (без исследуемых культур); 2 – в присутствии *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D; 3 – в присутствии *J. lividum* ВКМ В-3705D; 4 – в присутствии смеси «*P. chlororaphis* ВКМ В-3546D- *J. lividum* ВКМ 3705D».

Скорость роста гриба снижалась на 32,0% в присутствии смеси против 21,0% у чистой *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D (рис. 10. А). Однако чистая культура *J. lividum* ВКМ В-3705D была эффективнее смеси, снижая скорость роста на 46,0%.

Это объясняется подавлением синтеза виолацеина у *J. lividum* ВКМ В-3705D в присутствии *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D. При этом совместное культивирование стимулировало рост псевдомонад,

увеличивая их биомассу с меньшими ресурсными затратами. Таким образом, смешанное культивирование усиливает антагонистические свойства по сравнению с монокультурой *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D, но менее эффективно, чем чистая культура *J. lividum* ВКМ В-3705D, продуцирующая виолацелин.

12. Ростовые свойства пшеницы яровой в присутствии бактерий в лабораторных условиях.

В двенадцатом разделе приведены результаты исследования оценки влияния штаммов *J. lividum* ВКМ В-3705D и *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D на ростовые свойства пшеницы яровой (из расчета 10 л/т). Было выявлено, что усредненные значения длины стебля во всех вариантах несущественно различаются между собой (рис. 12). Показано, что средний прирост длины стебля пшеницы на 15 суток несущественно различается между вариантами.

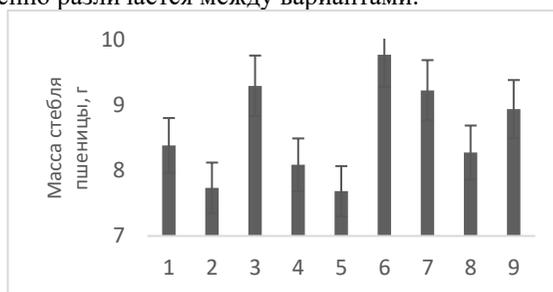


Рисунок 11. Масса стебля пшеницы, где: 1 – контрольный вариант; 2 – концентрированная суспензия *J. lividum* ВКМ В-3705D ($1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл); 3 – разбавленная суспензия *J. lividum* ВКМ В-3705D в соотношении 1:10; 4 – разбавленная суспензия *J. lividum* ВКМ В-3705D в соотношении 1:100; 5 – разбавленная суспензия *J. lividum* ВКМ В-3705D в соотношении 1:1000; 6 – концентрированная суспензия *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D ($1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл); 7 – разбавленная суспензия *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D в соотношении 1:10; 8 – разбавленная суспензия *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D в соотношении 1:100; 9 – разбавленная суспензия *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D в соотношении 1:1000

В ходе оценки массы надземной части (стебля) пшеницы, выявлено, что вариант, обработанный разбавленной суспензией *J. lividum* ВКМ В-3705D в соотношении 1:10, оказался тяжелее контрольного на 10,86% (рис. 11). В свою очередь, варианты, обработанные концентрированной суспензией *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D ($1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл) и разбавленной суспензией псевдомонады в соотношении 1:10, оказались тяжелее контрольного на 16,53% и 10,07%, соответственно.

Бактерии рода *Pseudomonas* известны как компоненты биологических средств защиты растений, так как псевдомонады способны вызывать системную устойчивость к стрессу и повышать ростовые свойства растений в неблагоприятных условиях окружающей среды. Добавление *J. lividum* ВКМ В-3705D может оказывать стимулирующее влияние на эффективность биопрепаратов.

13. Цитотоксическая активность фракции виолацеина на примере линий клеток опухолей.

В тринадцатом разделе приведены результаты исследования цитотоксичности фракции виолацеина против четырех линий опухолевых клеток человека. Выявлен выраженный дозозависимый эффект. Наибольшая чувствительность отмечена у клеток HeLa (карцинома шейки матки), где значение IC_{50} составило 504,02 мкМ, а при 1000 мкМ жизнеспособность снижалась на 99,6%. Для лимфоидных линий (Jurkat, Raji, TF-1) эффект был умеренным – ингибирование достигало ≈50% при максимальной концентрации. Клетки TF-1 проявили наибольшую устойчивость к низким дозам.

Полученные данные согласуются с известным противоопухолевым потенциалом виолацеина, механизмы действия которого могут включать индукцию апоптоза и окислительного стресса. В научной литературе описаны исследования противоопухолевой активности виолацеина в отношении линий клеток HeLa, Jurkat и TF-1, но для Raji эффект был показан впервые. Результаты подтверждают перспективность дальнейших исследований по созданию нанокomпозитных систем доставки для повышения эффективности и селективности виолацеина в онкологии.

ВЫВОДЫ

1) Из реки Везёлка города Белгород выделен штамм грамтрицательной подвижной и не образующей споры бактерии, способной к биосинтезу пигмента, задепонированный под номером ВКМ В-3705D. По результатам секвенирования гена 16S рРНК было выявлено, что степень идентичности с *Janthinobacterium lividum* составила 95,0%. Признаки *J. lividum* ВКМ В-3705D сходны с приведенными в литературе для бактерий рода *Janthinobacterium*, однако есть отличия: штамм не способен использовать инулин, D-лактозу и желатин. Дополнено 39 новых признаков.

2) Изучено влияние увеличения объёма питательной среды на кинетические характеристики роста штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D при периодическом глубинном культивировании в биореакторной системе. Установлено, что максимальное значение удельной скорости роста наблюдается при использовании среды с содержанием пептона 3,0%. Показано, что при

культивировании в объёме 7000,0 мл продолжительность лаг-фазы (L) на 57,6 % ниже, а удельная скорость роста (μ) и скорость деления (v) на 8,7 % и 9,0 % выше, соответственно, чем при культивировании в объёме 1000,0 мл. Время генерации (g) биомассы в объёме 7000,0 мл сократилось на 7,8 %. Масса лиофильно высушенной биомассы увеличилась в 6,9 раза. Улучшение кинетических показателей (μ , v), сокращение времени генерации (g) и продолжительности лаг-фазы (L) обусловлены, предположительно, созданием более оптимальных условий культивирования.

3) Изучены особенности условий биосинтеза виолацеина при культивировании штамма бактерий *J. lividum* ВКМ В-3705D в жидкой питательной среде, состоящей из пептона в количестве 1,0% и 3,0%. Выявлено, что, несмотря на то, что масса лиофильно высушенной культуры выросла в 6,9 раз, выход пигмента – всего в 4,2 раза. Выдвинуто предположение, что снижение интенсивности биосинтеза виолацеина при увеличении объёма питательной среды может быть обусловлено изменением гидродинамических условий (интенсивности перемешивания) или возникновением локального дефицита кислорода.

4) Изучен механизм антимикробного действия виолацеина на тест-культуры плесневых грибов и бактерий. Выявлено, что константа скорости роста тест-культур плесневых грибов *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754 и *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864 статистически значимо снизилась на 53,7% и 46,3%, соответственно. Удельный прирост (R) культуры *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 в смеси с *J. lividum* ВКМ В-3705D оказался ниже, чем для чистой культуры на 36,4%. Проведена оценка влияния фракции пигмента на активность аденозинтрифосфатазы (АТФ-азы), КФ 3.6.1.3 из *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402, установлено снижение активности АТФ-азы на 22,0% в присутствии фракции виолацеина.

5) Изучен биотехнологический потенциал штамма бактерий *J. lividum* ВКМ В-3705D. Установлено, что фракция виолацеина обладает выраженной противоопухолевой активностью. При максимальной исследуемой концентрации (1000 мкМ) ингибирование жизнеспособности клеток линии HeLa составило 99,6%, в то время как для линий Jurkat, Radji и TF-1 данный показатель достигал примерно 50%. Результаты указывают на возможность использования пигмента в составе терапевтического средства. Показана возможность применения штамма в составе средств защиты растений. В ходе оценки влияния на рост пшеницы яровой (*Triticum aestivum*) установлено, что обработка разбавленной суспензией *J. lividum* ВКМ В-3705D в соотношении 1:10 привела к увеличению массы растений на 10,86% по сравнению с контрольным вариантом. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D для разработки новых

биологических препаратов, в том числе средств защиты растений, что определяет его экономический и социальный потенциал.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России:

1. Ляховченко Н.С., Сенченков В.Ю., Никишин И.А., Соляникова И.П. Перспективы расширения ассортимента бактериальных штаммов-компонентов средств защиты растений биологического происхождения. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(4):103–106.

Статьи в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных научного цитирования (Scopus, РИНЦ):

1. Lyakhovchenko, N.S.; Abashina, T.N.; Polivtseva, V.N.; Senchenkov, V.Y.; Pribylov, D.A.; Chepurina, A.A.; Nikishin, I.A.; Avakova, A.A.; Goyanov, M.A.; Gubina, E.D.; et al. A Blue-Purple Pigment-Producing Bacterium Isolated from the Vezelka River in the City of Belgorod. *Microorganisms* 2021, 9, 102. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010102>;

2. Ляховченко Н.С., Травкин В.М., Сенченков В.Ю., Соляникова И.П. Бактериальный виолацеин: свойства, биосинтез и перспективы применения. Прикладная биохимия и микробиология, 2022, том 58, № 6, с. 568–577. DOI: 10.31857/S0555109922060071;

3. Lyakhovchenko, N.S.; Efimova, V.A.; Seliverstov, E.S.; Anis'kov, A.A.; Solyanikova, I.P. Bacteriostatic Activity of *Janthinobacterium lividum* and Purified Viocetin Fraction against *Clavibacter michiganensis*. *Processes* 2024, 12, 1116. <https://doi.org/10.3390/pr12061116>.

Статьи в сборниках материалов конференций, индексируемых в базах данных научного цитирования (Scopus, РИНЦ):

1. N.S. Lyakhovchenko, I.A. Nikishin, E.D. Gubina, D.A. Pribylov, V.Y. Senchenkov, A.A. Sirotn, I.P. Solyanikova, Assessment of the antifungal activity of the violacein-forming strain *Janthinobacterium* sp. B-3515 against the mould fungus *Alternaria brassicicola* F-1864, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Volume 908, IV All-Russian Conference with International Participation "Diversity of Soils and Biota of Northern and Central Asia" 15-18 June 2021. Ulan-Ude, Russia doi:10.1088/1755-1315/908/1/012006.;

2. V. Efimova, N. Lyakhovchenko, S. Akhapkina, A. Koreshkova and I. Solyanikova. Sensitivity of *Janthinobacterium lividum* to Low Concentrations of Hydrogen Peroxide and the Effect of Mild Oxidative Stress on Pigment Yield. BIO Web Conf., 57 (2023) 09006. DOI: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20235709006>.

Тезисы и материалы конференций (индексируемых РИНЦ):

1. Н.С. Ляховченко, В.Ю. Сенченков, В.А. Ефимова, С.С. Ахапкина, А.О. Селезнев, А.Е. Корешкова. *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3515 – перспективная тест-культура для поиска потенциальных микроорганизмов-антагонистов чувства кворума. Геномика и биотехнология микроорганизмов. Всероссийская научная молодежная конференция, Владивосток, 19–23 сентября 2022 г.: тезисы докладов / ТИБОХ ДВО РАН. – Владивосток: Издательство Дальневосточного федерального университета, 2022. – 68 с. – DOI <https://doi.org/10.24866/7444-5358-9>;
2. Ляховченко Н.С., Сенченков В.Ю. Противогрибковый потенциал пигментообразующих бактерий. Озик-овкат хавфсизлиги: Глобал ва миллий муаммолар. // IV халқаро микёсидаги илмий-амалий анжуман илмий ишлари тўплами. – Самарқанд. СамДУ, 2022. - 528 б;
3. Селезнев А.О., Ляховченко Н.С., Ефимова В.А., Ахапкина С.С., Сенченков В.Ю. Оценка взаимовлияния на ростовые свойства культур пигментообразующих аборигенных штаммов бактерий белгородской области *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3515 и *Pseudomonas chlororaphis* ВКМ В-3546D. Innovations in life sciences: сборник материалов IV международного симпозиума, г. Белгород, 25-27 мая 2022 г. / отв. ред. А.А. Присный – Белгород: ИД «БелГУ» НИУ «БелГУ», 2022. – 173-174 с.;
4. Ефимова В.А., Селезнев А.О., Ахапкина С.С., Сенченков В.Ю., Ляховченко Н.С. Противогрибковая активность аборигенного штамма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3515. В отношении плесневого гриба *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754. Innovations in life sciences: сборник материалов IV международного симпозиума, г. Белгород, 25-27 мая 2022 г. / отв. ред. А.А. Присный – Белгород: ИД «БелГУ» НИУ «БелГУ», 2022. – 153-154 с.;
5. Ляховченко Н.С., Ефимова В.А., Соляникова И.П. «Чувствительность *Clavibacter michiganensis* к *Janthinobacterium lividum* при совместном культивировании» V Международный симпозиум Innovations in life sciences, г. Белгород, 24-26 мая 2023 г.;
6. Н.С. Ляховченко, А.А. Чепурина, И.П. Соляникова, «Бактериостатическая активность экстракта пигмента микробного происхождения в отношении тест-культуры *Clavibacter michiganensis*» Всероссийская научная школа-конференция молодых ученых и студентов «Генетические технологии в исследованиях природных соединений», Владивосток, 3–7 октября 2023 г.;
7. Ляховченко Н.С. «Оценка чувствительности аденозинтрифосфатазы (КФ 3.6.1.3) тест-культуры *Clavibacter michiganensis* к фракции микробного пигмента штамма *Janthinobacterium lividum*». IX Всероссийская Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», 5-7 декабря 2023 г.

Свидетельства охраны результатов интеллектуальной собственности (Патенты):

1. Патент на изобретение № 2787118 Российская Федерация. Способ получения нанокapsул пигмента виолацеина: № 2787118: заявл. 22.07.2022: опубл. 14.11.2022 / И.П. Соляникова, Н.С. Ляховченко, В.Ю. Сенченков, А.О. Гоянов М.А., Прибылов Д.А., И.А. Никишин; заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»);

2. Патент на изобретение № 2812461 Российская Федерация. Способ получения экстракта виолацеина с использованием *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D: № 2023112610: заявл. 16.05.2023: опубл. 30.01.2024 / И.П. Соляникова, Н.С. Ляховченко, В.Ю. Сенченков, А.О., И.А. Никишин, Т.Н. Абашина, В.Н. Поливцева, Н.Е. Егорова; заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»).

3. Патент на изобретение № 2819794 Российская Федерация. Способ получения фракции виолацеина при поверхностном твердофазном культивировании штамма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D: № 2023129033: заявл. 09.11.2023: опубл. 24.05.2024 / И.П. Соляникова, Н.С. Ляховченко, В.Ю. Сенченков, А.О. Селезнев, С.С. Ахапкина, В.А. Ефимова, А.Е. Корешкова, И.А. Никишин, А.А. Чепурина/ заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»).

4. Патент на изобретение № 2842278 Российская Федерация. Композиция с бактериостатической активностью на основе пигмента микробного происхождения виолацеина (violacein) из биомассы *Janthinobacterium lividum*: № 2024125559: заявл. 30.08.2024: опубл. 24.05.2025 / Н.С. Ляховченко, А.О. Селезнев, И.П. Соляникова, А.А. Чепурина, В.А. Ефимова, С.С. Ахапкина, А.С. Выросткова, И.А. Никишин/ заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»).