

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(НИУ «БелГУ»)

На правах рукописи

Ляховченко Никита Сергеевич

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

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., Соляникова Инна Петровна

БЕЛГОРОД 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Пигменты – вторичные метаболиты микроорганизмов.....	12
1.2. Разнообразие и распространенность виолацеинсинтезирующих микроорганизмов.....	31
1.3. Биосинтез виолацеина.....	35
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
2.1. Микроорганизмы, используемые в исследовании.....	46
2.2. Питательные среды, используемые в исследовании.....	47
2.3. Выделение пигментообразующей бактерии из реки Везёлка города Белгород.....	48
2.4. Молекулярно-генетические исследования пигментообразующей бактерии из реки Везёлки города Белгород.....	49
2.5. Определение оптимальных условий роста культуры.....	49
2.6. Изучение культуральных и морфологических признаков бактерии...	50
2.7. Изучение тинкториальных признаков бактерии.....	50
2.8. Изучение физиологических и биохимических признаков бактерии...	51
2.9. Подбор состава питательной среды для периодического глубинного культивирования штамма <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D.....	52
2.10. Подготовка посевного материала <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D.....	56
2.11. Культивирование штамма <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D в биореакторной системе глубинным периодическим способом.....	56
2.12. Расчет кинетических параметров роста штамма <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D в условиях периодического глубинного культивирования в биореакторной системе.....	58
2.13. Получение фракции виолацеина в диметилсульфоксиде из биомассы <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D.....	60

2.14. Изучение антибактериальной активности <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D.....	60
2.15. Определение чувствительности <i>P. chlororaphis</i> ВКМ В-3546D к штамму <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D при совместном культивировании.....	64
2.16. Изучение противогрибковой активности бактерии <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D.....	65
2.17. Изучение противогрибковой активности смеси штаммов <i>P. chlororaphis</i> ВКМ В-3546D и <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D.....	67
2.18. Изучение активности аденозинтрифосфатазы (КФ 3.6.1.3) в бесклеточном экстракте бактерии <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 в присутствии фракции виолацеина.....	68
2.19. Изучение ростовых свойств пшеницы яровой в присутствии бактерий в лабораторных условиях.....	70
2.20. Изучение цитотоксической активности фракции виолацеина на примере линий клеток опухолей.....	71
2.21. Методы статистического анализа.....	74
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	77
3.1. Идентификация аборигенного штамма пигментообразующей бактерии.....	77
3.2. Подбор состава питательной среды.....	90
3.3. Характеристика роста штамма <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D при глубинном периодическом культивировании в биореакторной системе.....	91
3.4. Противобактериальная активность <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D.....	100
3.5. Чувствительность <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 к штамму бактерии <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D при совместном культивировании.....	101
3.6. Влияние фракции виолацеина на ростовые свойства <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402.....	108

3.7. Исследование влияния фракции виолацеина на морфометрические свойства клеток <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 методом атомно-силовой микроскопии (АСМ).....	115
3.8. Скорости роста плесневых грибов <i>Alternaria brassicicola</i> ВКМ F-1864 и <i>Aspergillus unguis</i> ВКМ F-1754 при совместном культивировании со штаммом бактерии <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D.....	116
3.9. Активность аденозинтрифосфатазы (КФ 3.6.1.3) в бесклеточном экстракте бактерии <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 в присутствии фракции виолацеина.....	122
3.10. Чувствительность <i>P. chlororaphis</i> ВКМ В-3546D к штамму <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D при совместном культивировании.....	130
3.11. Антимикробная активность <i>P. chlororaphis</i> ВКМ В-3546D в присутствии штамма <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D.....	132
3.12. Ростовые свойства пшеницы яровой в присутствии бактерий в лабораторных условиях.....	134
3.13. Цитотоксическая активность фракции виолацеина на примере линий клеток опухолей.....	138
ВЫВОДЫ.....	150
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	152
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	179

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В настоящее время биотехнология соответствует задачам, обозначенным в Стратегии научно-технического развития Российской Федерации (утвержденной Указом Президента РФ от 28.01.2024 г. № 145 [1]), поскольку позволяет перейти к высокопроизводительному и экологически чистому агро- и аквахозяйству посредством разработки и внедрения новых средств биологической защиты растений, животных и объектов аквакультуры.

Согласно официальной информации [2-5], ассортимент биопрепаратов на основе микроорганизмов за последние годы увеличился на 40,39%. За тот же период количество препаратов химического происхождения увеличилось на 12,5%. Средний годовой прирост общего количества биологических средств составляет 17,37%, что в 4 раза выше, чем для химических (4,35%). Приведенные данные свидетельствуют о том, что растениеводство переживает процесс биологизации. Подтверждением служат данные открытых источников: к 2030 году рынок биопрепаратов превысит 311,2 млрд рублей. Кроме того, согласно целевым показателям Стратегии развития органического производства в Российской Федерации, к 2030 году объем потребления органической продукции достигнет 149,8 млрд руб. против 24,4 млрд руб. в 2021 году. Экспорт такой продукции может составить 27,8 млрд руб. против 3,7 млрд руб. в 2021-м, а площадь земель, на которых применяется технология органического земледелия, достигнет 4,2 млн га против 655,5 тыс. га. Тренд прослеживается уже сейчас: на август 2024 года, в Едином государственном реестре органических производителей России числилось 203 производителя, тогда как по состоянию на 27 декабря – уже 237. Для предотвращения заболеваний растений производители органической продукции используют биологические средства защиты. Это позволяет увеличить выпуск качественной готовой продукции, которая соответствует Федеральному закону 03.08.2018 № 280-ФЗ «Об органической продукции и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации». В

связи с этим необходим поиск новых микроорганизмов-перспективных антагонистов возбудителей болезней растений. Это позволит расширить ассортимент биофунгицидов.

Пигменты микробного происхождения, как и традиционные антибиотики, могут ингибировать рост болезнетворных организмов [6]. Это важно для различных сфер сельского хозяйства, где строго регламентируется применение антибиотиков. Бактерии рода *Janthinobacterium* и синтезируемый ими пигмент виолацеин (violacein), потенциально могут быть компонентами препаратов, подавляющих развитие возбудителей заболеваний растений за счет подавления активности некоторых ферментов. Однако в литературе недостаточно сведений о влиянии условий культивирования и состава питательной среды на биосинтез пигмента у *Janthinobacterium lividum*, а также мало данных об условиях получения фракции виолацеина из сухой биомассы. Кроме того, неизвестно влияние раствора пигмента на ростовые свойства яровой пшеницы.

Степень разработанности темы. Виолацеин впервые выделен и описан в 1944 году из биомассы *Chromobacterium violaceum* [7]. В последующие годы значительный вклад в исследования в области биосинтеза пигмента, а также его биотехнологической значимости внесли отечественные и зарубежные ученые: С. В. Мартьянов, с соавт. [8], Захарова Ю.Р., с соавт. [9], Abhay Bajaj, с соавт. [10], Ambrozic Avgustin, J., с соавт. [11], Antonio R.V., Creczynski-Pasa T.B. [12], Aranda, S., Montes-Borrego, M., Landa, B.B. [13], Bromberg N., с соавт. [14], Choi S.Y., с соавт. [15].

Однако, несмотря на достаточно большое количество исследований и экспериментальных данных, на сегодняшний день все еще нет сведений о противомикробных свойствах *J. lividum* в отношении плесневых грибов *Alternaria brassicicola*, *Aspergillus unguis* и *Clavibacter michiganensis* при совместном культивировании; не описаны 39 признаков бактерий рода *Janthinobacterium*; не описаны условия для роста *J. lividum* в биореакторных системах вместимостью более, чем 2,0 литра; в настоящее время нет сведений

о влиянии фракции пигмента на активность ключевых ферментов штаммов-мишеней.

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

Задачи научного исследования:

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-цетилглюкозамина, 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) 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 тест-культур плесневых грибов *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754 и *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864 на 53,7% и 46,3%, соответственно, от присутствия янтинобактерии. 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 янтинобактерии при совместном культивировании с *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402, так как бактерии этого вида входят в перечень микробов, подлежащих экспортному контролю. Полученные сведения в ходе исследования могут быть использованы для разработки биотехнологического процесса получения культуры для средств защиты растений. Это позволит создать новый отечественный бренд биопрепаратов с новой категорией действующего вещества – пигмента микробного происхождения, и способствовать повышению технологического суверенитета.

Положения, выносимые на защиту.

1. Аборигенный штамм *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D является пигментсинтезирующим представителем водного сообщества реки Везёлка города Белгорода.
2. Штамм *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D обладает антимикробной активностью в отношении тест-культур некоторых возбудителей заболеваний растений.
3. 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, рН = 7,0-8,0 и скорости перемешивания до 300 об/мин.

4. 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.

Степень достоверности полученных результатов. Основные результаты исследования подтверждены с использованием методов анализа и статистической обработкой исходных данных, полученных в ходе экспериментов.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на конференциях: «Геномика и биотехнология микроорганизмов. Всероссийская научная молодежная конференция» (Владивосток, 2022 г.), «IV халқаро миқёсидаги илмий-амалий анжуман илмий ишлари тўплами» (Самарканд, 2022 г.), «IV международного симпозиума» (Белгород, 2022 г.), «V Международный симпозиум Innovations in life sciences» (Белгород, 2023 г.), «Генетические технологии в исследованиях природных соединений» (Владивосток, 2023 г.), «IX Всероссийская Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»» (Пущино, 2023 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационное исследование соответствует п.п. 3, 17 и 25 паспорта специальности 1.5.6. – «Биотехнология».

Структура и объем 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 наименования, 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. 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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Пигменты – вторичные метаболиты микроорганизмов

В настоящее время в сфере науки, посвященной исследованиям вторичного обмена микроорганизмов, накоплены обширные знания о путях, функциях и генетических кластерах, отвечающих за биосинтез продуктов. Известно, что существует множество метаболических путей, приводящих к образованию веществ, которые свойственны ограниченному количеству видов. Эти реакции обозначены термином «вторичный обмен», а синтезируемые вещества – «продукты вторичного обмена» [16].

Они обеспечивают продуцентам преимущества в процессах преобразования вещества, энергии и информации. В частности, пигменты бактериального происхождения способствуют защите микроорганизмов от неблагоприятных воздействий, таких как УФ-излучение, окислительный стресс, воздействие тяжелых металлов и изменения температуры. Кроме того, многие из пигментов обладают антагонистической активностью, что делает их перспективным для разработки новых противомикробных средств [17, 18].

Единого термина, который мог бы охватить все пигменты, в настоящее время не существует. Однако, можно обобщить, что пигменты – это соединения, у которых химическая структура лежит в основе способности к избирательному поглощению света определенной длины волны. Это свойство придает им определенный цвет [19]. Пигменты несут биологическую функцию, в том числе и способствуют выживанию в неблагоприятных условиях для организма [19]. Стоит отметить, что во многих случаях, одни и те же пигменты могут синтезироваться разными микроорганизмами.

Направления исследований микробных пигментов в научном сообществе привлекают к себе внимание. Так, по запросу «microbial pigments» в базе данных PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) в период с 2012 по 2022 год обнаружено 1 911 результатов (рис. 1). Это может быть связано с тем, что открываются новые направления практического применения с одной стороны, и развиваются технологии и методологии, которые позволяют не

только обнаружить и идентифицировать пигменты, но и изучить пути их биосинтеза.

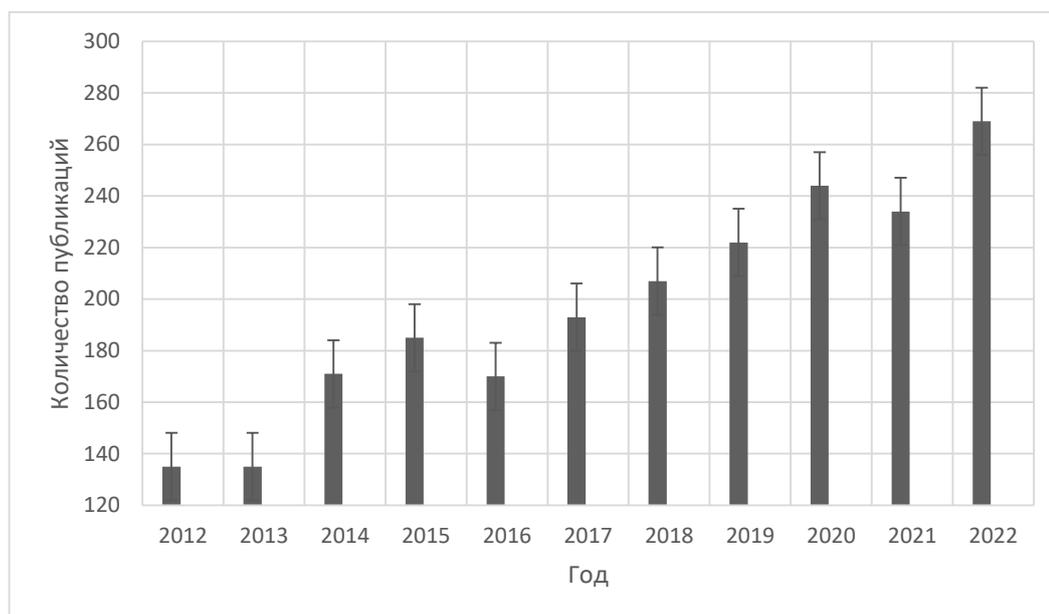


Рисунок 1. Количество публикаций по запросу «microbial pigments», размещенных в базе данных PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) в период с 2012 по 2022 год

Некоторые пигменты биологического происхождения рассматриваются в качестве возможных натуральных красителей [20, 21, 22]. До появления синтетических пигментов они были единственным способом окрашивать материалы (шерсть, хлопок, шелк, меха, акварели и т.д.). В настоящее время активно развивается направление «зеленой» химии, которое опирается на создание экологически безопасных технологий получения окрашивающих веществ, что стимулирует интерес к микробным пигментам [20].

Спрос на натуральные красители растет из-за вредного воздействия синтетических аналогов на здоровье и окружающую среду. Согласно данным Subhash Kumar с соавт., мировой рынок пигментов оценивается в более чем 32,9 млрд долларов США и, по прогнозам, будет расти со среднегодовым темпом 5,1% до 2028 года [23]. Ожидается, что к 2026 году рыночная стоимость одних только каротиноидов достигнет 2,0 млрд долларов, а к 2027

объем рынка натуральных пищевых красителей в целом составит 3,5 млрд долларов США [23].

Способность к образованию пигментов широко распространена среди растений, бактерий, плесневых грибов, цианобактерий и микроскопических водорослей. Значительное разнообразие этих соединений по составу, механизмам биосинтеза, а также физико-химическим свойствам, объясняет отсутствие единой классификации пигментов микробного происхождения [24]. Разработка такой классификации является актуальной задачей, поскольку многие из этих соединений обладают биотехнологической и фармакологической значимостью, а их систематизация позволит полноценно оценить потенциал их практического применения.

В работе Malik K. с соавторами приводится классификация пигментов на основе их строения [25]:

- рибофлавин (riboflavin, витамин B2 и лактофлавин) представляет собой водорастворимый пигмент желтого цвета (рис. 2). Как предшественник кофакторов флавинмононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД), он играет ключевую роль в метаболизме [26, 31]. Рибофлавин синтезируется такими микроорганизмами, как *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Ashhbya gossypii*, *Candida famata* и др. [26-28, 31].

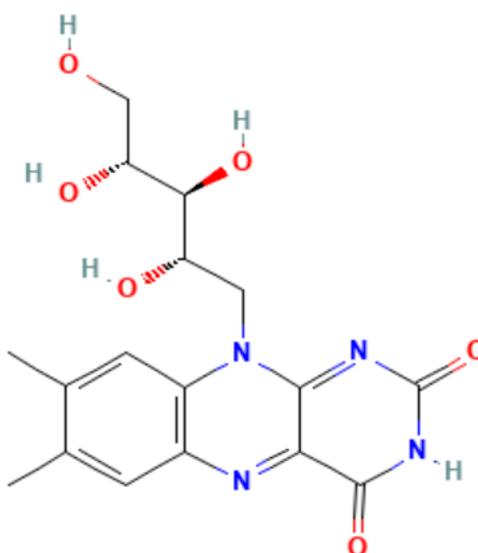


Рисунок 2. Структурная формула рибофлавина [31].

- каротиноиды (carotenoids) – это обширная группа терпеноидных жирорастворимых пигментов желтого, оранжевого и красного цветов. На сегодняшний день известно более 1200 каротиноидов, и их количество продолжает увеличиваться (актуальный список и классификация доступны на специализированном ресурсе <http://carotenoiddb.jp>). Известно, что каротиноиды подразделяют на две основные группы: каротины (α -каротин, β -каротин, γ -каротин и ликопин) и ксантофиллы [32]. Данные пигменты синтезируются растениями, микроорганизмами и некоторыми макроорганизмами [28, 33]. Их структура включает алифатическую полиеновую цепь, состоящую, как правило, из восьми изопреновых звеньев (рис. 3), и содержит систему сопряженных двойных связей, обуславливающую способность к поглощению света [34, 36].

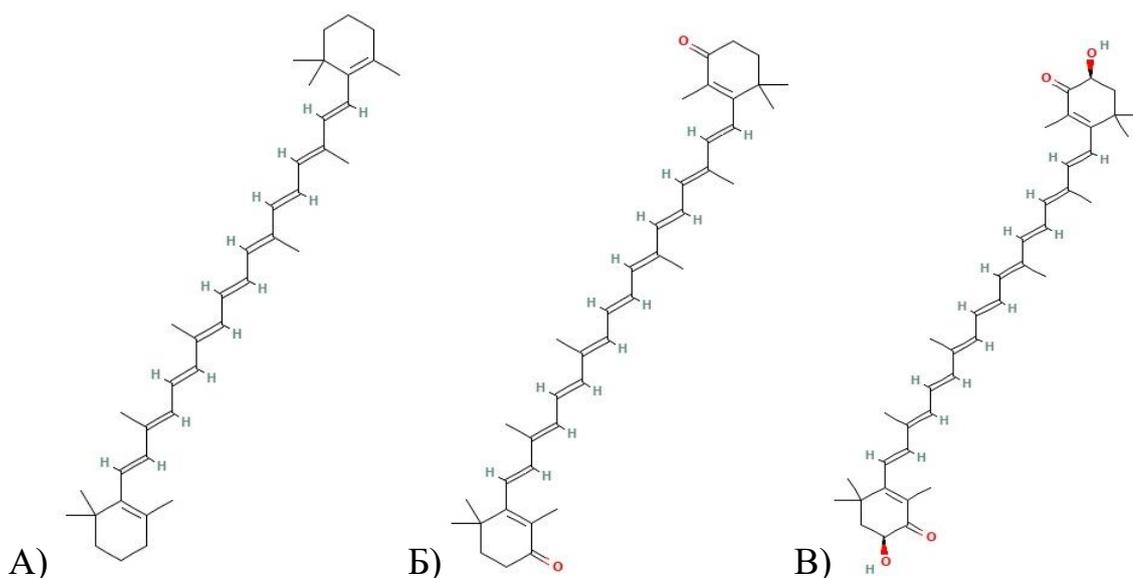


Рисунок 3. Структурная формула (А) β -каротина, (Б) кантаксантина, (В) астаксантина [36-38]

Растения и многие другие фотоавтотрофы используют каротиноиды для улавливания рассеянного света и защиты фотосинтетического аппарата. Кроме того, каротиноиды служат предшественниками для синтеза абсцизовой кислоты и ретиноидов (например, ретиналь и ретиноевая кислота). Согласно данным Avalos, J. и соавт., ретиналь выступает хромофором зрительных

опсинов, а ретиноевая кислота является важным морфогеном, необходимым для развития позвоночных [34].

Кантаксантин (canthaxanthin), или 4,4'-дикето- β -каротин (рис. 3, Б), представляет собой каротиноид оранжево-красного цвета. Он является промежуточным продуктом в биосинтезе астаксантина из β -каротина. Молекула кантаксантина содержит девять сопряженных двойных связей, оканчивающихся двумя оксо-заместителями [32]. Этот пигмент обладает способностью к нейтрализации свободных радикалов и не является предшественником витамина А.

Астаксантин (astaxanthin) – это каротиноид, растворимый в жирах, дихлорметане, хлороформе, ацетоне, диметилсульфоксиде и других неполярных растворителях [39]. В кристаллической форме он представляет собой темно-фиолетово-коричневый порошок. Астаксантин превосходит многие другие каротиноиды по стабильности и антиоксидантной активности, способен преодолевать гематоэнцефалический барьер и используется в качестве мощного природного красителя [39];

- азафилонны (azaphylones) – это грибные пигменты из группы поликетидов, для которых характерно наличие бициклического пирахинонового ядра, хирального четвертичного центра и гидроксильных групп. Типичными продуцентами азафилоннов являются грибы рода *Monascus* [40]. У представителей этого рода идентифицировано около сотни азафилоновых соединений, различающихся по цвету: анкафлавин и монасцин (желтые), монаскорубин и рубропунктатин (оранжевые), монаскорубрамин и рубропунктамин (красные) [40].

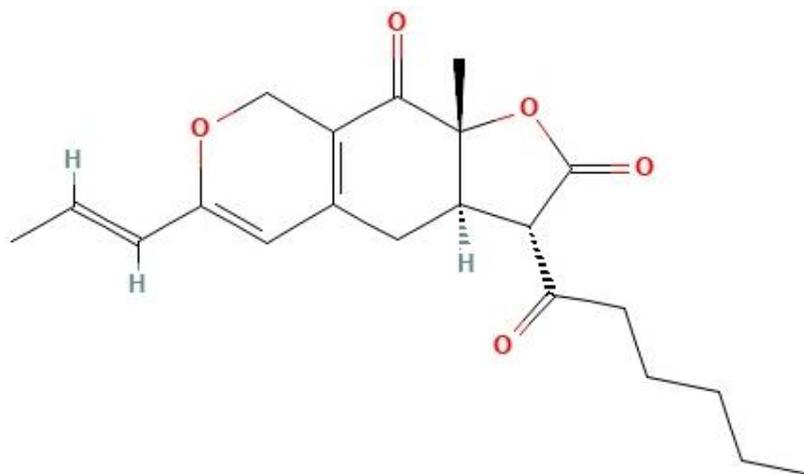


Рисунок 4. Структурная формула монасцина [40]

Пигменты азафилонового ряда проявляют антибактериальную, противогрибковую и противоопухолевую активность [40].

- флексирубины (flexirubins) – это бактериальные пигменты желто-оранжевого цвета, характеризующиеся терминальным алкильным замещением. Их структура состоит из хромофора ω -фенилоктаеновой кислоты, этерифицированного резорцином (рис. 5). Впервые флексирубин был выделен в 1974 году из *Flexibacter elegans*, а впоследствии аналогичные пигменты были обнаружены у представителей родов *Cytophaga*, *Sporocytophaga*, *Cryseobacterium*, *Flavobacterium* и других [41, 42].

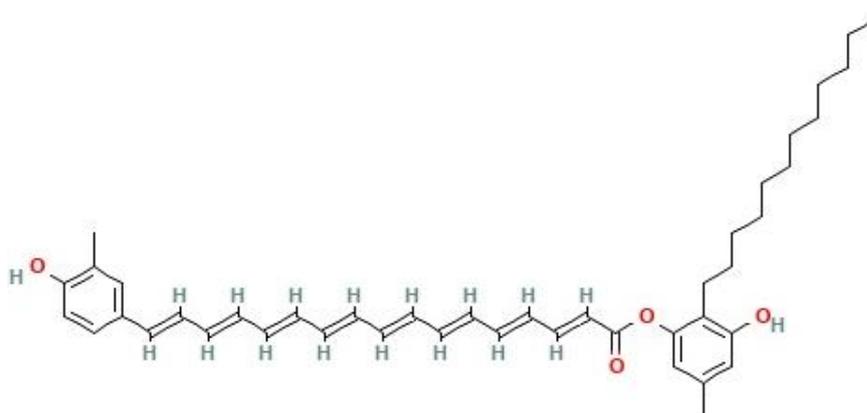


Рисунок 5. Структурная формула флексирубина [43]

Флексирубины обладают рядом биотехнологически значимых свойств, таких как антиоксидантная и противомикробная активность [41].

- меланины (melanins) – это отрицательно заряженные гидрофобные макромолекулы, образующиеся при полимеризации фенольных или индольных соединений и имеющие черную, коричневую или красную окраску [18].

- феназины (phenazines) – это обширная группа азотсодержащих гетероциклических пигментов как природного, так и синтетического происхождения. Известно более 150 природных производных и свыше 6000 синтетических производных феназина, обладающих широким спектром биологической активности [44]. Среди наиболее изученных природных производных - феназин-1-карбоновая кислота, 2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота, 2-гидроксифеназин, феназин-1-карбоксамид, аэругинозин А и В, а также пиоцианин, характерный для *Pseudomonas aeruginosa* [44]. Продуценты феназинов широко распространены в природе и встречаются в наземных, пресноводных и морских экосистемах. Эти бактерии часто входят в состав микробиоты макроорганизмов. Феназины обладают разнообразной биологической активностью, включая антибактериальную, противогрибковую, инсектицидную, противоопухолевую, противомаларийную и противопаразитарную [44].

Пиоцианин (pyocyanin) – пигмент из группы феназинов синего цвета (рис. 6, Б). Он синтезируется у 90-95% штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и вносит существенный вклад и вирулентность этого микроорганизма [45]. Пиоцианин представляет значительный интерес для биотехнологии и медицины благодаря своим уникальным свойствам [45]. Изучение регуляции его биосинтеза имеет важное значение для разработки новых терапевтических стратегий [48].

- продигиозин (prodigiosin) и его производные (рис. 8) представляют группу ярко-красных пигментов, в которую входят продигиозин, циклопродигиозин, бутил-мета-циклопродигиозин, метациклопродигиозин, циклононилпродигиозин. Впервые продигиозин был обнаружен у *Serratia marcescens* [52]. Согласно данным Islan G.A. и соавт., продигиозины синтезируются широким кругом микроорганизмов, включая грамотрицательные бактерии (*Alteromonas rubra*, *Hahella chejuensis*, *Janthinobacterium lividum*, *Pseudoalteromonas denitrificans*, *Pseudomonas magnesorubra*, *Rugamonas rubra*, *Vibrio gazogenes*, *V. psychroerythrous*) и грамположительные актиномицеты (*Streptomyces coelicolor*, *S. fusant*, *S. longisporus ruber* и *Streptoverticillium rubrirectuli*), а также дрожжи *Zooskela rubidus*. Среди представителей рода *Serratia* продуцентами являются *S. marcescens*, *S. plymuthica* и *S. rubidaea* [53].



Рисунок 8. Структурная формула продигиозина [54]

Продигиозин обладает широким спектром биологической активности, включая антибактериальную, антикокцидийную, противомаларийную и противогрибковую [55]. В частности, показана его эффективность в отношении *Staphylococcus aureus* [55]. Хотя вирулентность *S. marcescens*, вызывающая инфекции различных органов и порчу пищевых продуктов, связана с биосинтезом липополисахаридов, поглощением железа и продукцией гемолизина [56], биологическая роль пигментации остается существенной. Важность пигмента подтверждается, в частности, его способностью ингибировать функцию аппарата Гольджи [57].

- виолацеин (violacein) и его производные (оксивиолацеин и дезоксивиолацеин) – пигменты сине-фиолетового цвета, продуцируемые бактериями родов *Chromobacterium*, *Janthobacterium*, *Iodobacter*, *Collimonas*, *Duganella*, *Massilia*, а также некоторыми представителями *Alteromonas* и *Pseudomonas* [58].

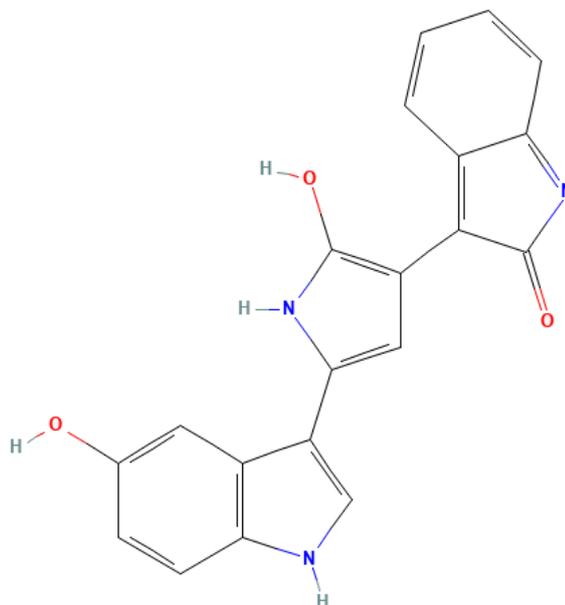


Рисунок 9. Структурная формула виолацеина [59]

Виолацеин обладает широким спектром биологической активности, включая противоопухолевую, антибактериальную, антимикозную, антипротозойную и противопаразитарную, что определяет его практическую значимость. Кроме того, показана противовирусная активность в отношении вируса простого герпеса [58].

Таким образом, универсального и общепринятого варианта классификации пигментов в настоящее время не существует. Развитие инструментов на основе искусственного интеллекта (ИИ) позволяет консолидировать большое количество данных. Категоризация ключевых признаков молекул позволит объединить их в семейства по множеству свойств. Однако, необходимы более углубленные исследования с применением ИИ.

Пигментообразование представляет собой адаптивную реакцию микроорганизмов на действие неблагоприятных факторов окружающей среды. Например, пигментация обеспечивает устойчивость к окислительному стрессу у фитопатогенного представителя *Ralstonia solanacearum* [18]. Меланины участвуют в защите патогенных микроорганизмов от иммунного ответа хозяина, а ксантомонадины – желтые пигменты, продуцируемые возбудителем черной гнили крестоцветных *Xanthomonas campestris*, – играют важную роль в развитии фитопатологии [60]. Кроме того, многие пигменты проявляют выраженную антимикробную активность в отношении плесневых грибов, бактерий, некоторых простейших [20].

Таким образом, микроорганизмы продуцируют огромное разнообразие пигментов, многие из которых обладают значительным биотехнологическим потенциалом. Эти соединения выполняют многочисленные защитные функции: так, виолацеин у *Janthinobacterium lividum* и *Chromobacterium violaceum* обеспечивает защиту от бактериоядных животных (*Spumella* sp., *Ochromonas* sp. и *Bodo saltans*); пиовередин *P. fluorescens* участвует в транспорте железа [30]; многие пигменты способствуют устойчивости УФ-излучению и окислительному стрессу, а также опосредуют взаимодействия между микроорганизмами и макроорганизмами [61, 62]. Многофункциональность пигментации и разнообразие биологических свойств микробных пигментов определяют их практическую значимость для различных областей биотехнологии [30]. Согласно стратегии научно-технологического развития Российской Федерации, стоит вызов достижения суверенитета в сфере биоэкономики. В том числе, необходимо решить задачи по наращиванию фармацевтических препаратов.

Во всем мире злокачественные новообразования (ЗНО) представляют одну из наиболее серьезных проблем для человечества. Согласно данным, начиная с 2016 года, в Российской Федерации они занимают второе место среди причин смертности населения [64-66]. Исследователи приводят убедительные данные об экономической значимости онкологических

заболеваний, которые включают как прямые экономические потери, так и объемы финансирования разработки методов борьбы с ЗНО. Благодаря предпринимаемым мерам, хотя глобальный годовой темп прироста заболеваемости составляет около 2%, в последние годы наблюдается тенденция к снижению смертности [64]. Эти факты свидетельствуют о том, что борьба с онкологическими заболеваниями является одним из приоритетных направлений здравоохранения, что нашло отражение в национальной стратегии Российской Федерации. Целью данной стратегии является разработка и реализация комплекса мер государственной политики в области онкологии [66].

Согласно имеющимся данным, в 2020 году доля смертности от онкогематологических заболеваний (злокачественные заболевания крови и кроветворной ткани, гемобластозов) среди всех ЗНО составила 7,1% в мире и 5,7% в РФ [67]. Авторы приводят обширные статистические данные, свидетельствующие о том, что значительная доля случаев приходится на неходжинские лимфомы, в частности лимфома Беркитта (ЛБ) и острый Т-лимфобластный лейкоз.

Лимфома Беркитта – заболевание, названное в честь хирурга Дениса Беркитта, который в 1950-х годах описал быстро прогрессирующие опухолевые образования челюстей у детей Уганды [68, 69]. Согласно классификации Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), выделяют три основных подтипа лимфомы Беркитта: эндемическая, спорадическая и связанное с иммунодефицитом [68]. Развитие заболевания ассоциировано с вирусом Эпштейна-Барр и иммунодефицита человека (ВИЧ), а также с хромосомными транслокациями, приводящими к сверхэкспрессии онкогена С-МУС [68]. Несмотря на существование утвержденных программ терапии, лечение рецидивов заболевания остается серьезной медицинской проблемой [70].

Острый Т-лимфобластный лейкоз представляет собой агрессивное злокачественное заболевание системы кроветворения. По данным Sin C.F. с

соавт., современные протоколы лечения позволяют достичь долговременной ремиссии у 75-80% детей и 50-60% взрослых пациентов [71]. Однако значительная часть больных сталкивается с рецидивами или развитием рефрактерной формой заболевания после проведения химиотерапии [71]. Для обоих заболеваний - лимфомы Беркитта и острого Т-лимфобластного лейкоза - основной проблемой остается отсутствие эффективных методов терапии рецидивов и рефрактерных форм. Это обуславливает актуальность поиска новых соединений для разработки противоопухолевых препаратов, эффективных против резистентных форм заболеваний.

Цитотоксические препараты широко применяются в клинической практике для лечения онкологических заболеваний. Их механизм действия направлен на нарушение метаболических процессов в опухолевых клетках, что приводит к индукции апоптоза. В работе Benjamin B. представлена классификация цитотоксических соединений [72], включающая следующие группы:

- алкилирующие вещества: азотные иприты, этиленимины, алкилсульфонаты, нитромочевины, триазены, метилгидразины и соединения платины;
- антиметаболиты: аналоги/антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пириимидина, цитидина и пуринов;
- вещества естественного происхождения: соединения, повреждающие микротрубочки (некоторые алкалоиды, эрибулин, таксаны, эстрамустин, эпотилоны), аналоги камптотецина (топотекан и иринотекан), эпиподофиллотоксины (среди них этопозид, тенипозид), противораковые антибиотики;
- прочие соединения (например, митотан, ретиноиды и др.).

Несмотря на большое разнообразие существующих препаратов, их применение связано с существенными побочными эффектами, что обуславливает необходимость поиска новых соединений с улучшенным профилем безопасности. Согласно данным ресурса NCBI PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=cytotoxic%20activity&filter=years.2018->

2022&timeline=expanded), в 2018-2022 годах наблюдается значительный рост числа исследований в области цитотоксической активности: по соответствующему запросу найдено более чем 54 тысяч научных публикаций, из которых более 11 тысяч были опубликованы только в 2022 году.

Перспективным направлением является разработка препаратов природного происхождения [74-78]. В частности, Malarz J. с соавт. провели сравнительную оценку цитотоксической активности экстрактов растения *Carpesium divaricatum*, культивируемого в природных условиях и *in vitro*. Авторы продемонстрировали, что, хотя эффективность экстрактов была сопоставимой, образцы, полученные из *in vitro* культур, проявляли более селективное действие [79]. Еще одним перспективным направлением является разработка онколитических вирусных вакцин на основе штаммов вирусов кори. В исследованиях Николаевой Е.Ю. и соавт. описаны перспективные результаты изучения цитотоксичности таких препаратов в отношении клеточных линий глиобластомы, нейробластомы и мезотелиомы [80, 81].

Перспективным источником для разработки новых противоопухолевых препаратов являются микроорганизмы - продуценты цитотоксических соединений [82-86]. В частности, показано, что представители рода *Nocardia* способны синтезировать внеклеточные метаболиты, обладающие активностью в отношении клеточных линий меланомы В16 [87].

Многие микроорганизмы продуцируют пигменты, которые характеризуются широким спектром биологической активности, включая цитотоксическую [88, 89]. Например, установлено, что продигиозин, синтезируемый бактериями рода *Serratia*, проявляет антипролиферативную и цитотоксическую активность в отношении клеточных линий рака яичников, толстой кишки, легких и почек и лимфоцитарного лейкоза [90].

Особый интерес представляет пигмент виолациен, или [3-(1,2-дигидро-(5-гидрокси-1H-индол-3-ил)-2-оксо-3H-пиррол-3-илидена)-1,3-дигидро-2H-индол-2-он], который синтезируется рядом микроорганизмов, включая

Janthinobacterium lividum. Показана способность виолацеина индуцировать апоптоз в различных клеточных линиях, а также установлены другие потенциальные механизмы его противоопухолевого действия [90].

В исследовании Davi da Silva Barbirato, и соавт., была оценена потенциальная защитная роль виолацеина, продуцируемого *Chromobacterium violaceum*, в отношении пародонтита [7]. На модели животных было показано, что пероральное введение суспензии бактерий (концентрация 10^6 КОЕ/мл) в течение первых 30 дней жизни значимо снижало потерю костной массы при пародонтите в зубах с лигатурой. Авторы предполагают, что этот эффект может быть связан со способностью *C. violaceum* синтезировать виолацеин, поскольку экстракт пигмента также проявлял ингибирующую активность в отношении резорбции кости. Кроме того, *in vitro* исследования подтвердили способность виолацеина подавлять рост *Porphyromonas gingivalis* [7]. Следует отметить, что низкая растворимость виолацеина в воде требует использования специальных растворителей, что может влиять на его биологическую активность и затрудняет изучение механизмов его действия.

Таким образом, поиск цитотоксически активных соединений и разработка устойчивых источников их получения остаются актуальными задачами современной науки. Одним из наиболее перспективных направлений являются биотехнологическое производство компонентов противоопухолевых препаратов на основе соединений микробного происхождения.

Активные формы кислорода (АФК) представляют собой высокореакционные молекулы, способные окислять органические и неорганические соединения. Примером такого воздействия является перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот в клеточной мембране, при котором атака АФК на двойные связи инициирует цепную реакцию с образованием липопероксильных радикалов и других активных соединений. Эти процессы приводят к структурным повреждениям клеточных мембран, что в конечном итоге может вызвать их разрыв и гибель клетки [91]. Воздействие АФК на аминокислоты и белки вызывает их окислительную

модификацию, приводящую к нарушениям работы сигнальных белков, мембранных рецепторов, транспортеров и элементов цитоскелета.

Ярким примером воздействия перекиси водорода на биологические молекулы является окисление железо-серных кластеров (Fe-S кластеров) в ходе реакции Фентона, приводящее к образованию высокореакционных гидроксильных радикалов. Данный процесс вызывает серьезные метаболические нарушения вследствие инактивации ферментов и карбонилирования белков. Повреждения структуры ДНК под действием активных форм кислорода могут приводить к мутациям и нарушениям реализации генетической информации. Кроме того, АФК оказывают негативное влияние на окислительно-восстановительные процессы в клетке, в частности на клеточное дыхание [91, 92].

Следует отметить, что активные формы кислорода выполняют и важные регуляторные функции в организмах, участвуя в процессах передачи сигналов и реализации иммунного ответа при различных патологических процессах, включая инфекционные заболевания [93, 94]. Однако микроорганизмы, в том числе фитопатогены, способны развивать адаптивные реакции в условиях окислительного стресса. Показано, что предварительная обработка бактерий низкими концентрациями перекиси водорода и других оксидантов индуцирует экспрессию функционально связанных генов, что повышает их устойчивость к последующему воздействию высоких доз этих соединений [95].

Биосинтез пигментов представляет собой один из ключевых адаптивных механизмов защиты микроорганизмов от неблагоприятных условий окружающей среды, таких как окислительный стресс и ультрафиолетовое излучение [18, 96]. Ярким примером является фитопатоген *Ralstonia solanacearum*, вызывающий заболевания у более чем 200 видов растений из 50 семейств (включая бурую гниль картофеля и увядание томатов, табака и баклажанов). Данный микроорганизм синтезирует меланины в условиях голодания в стационарной фазе роста, что способствует повышению его устойчивости к окислительному стрессу [18]. Другим примером являются

каротиноиды (астаксантин, лютеин, β -каротин, диглюкозид сарцинаксантина), проявляющие выраженную антиоксидантную активность. В частности, *Streptomyces mediolani* продуцирует фенольный каротиноид 3,3'-дигидроксиизорениератен, обладающий мощными антиоксидантными свойствами [30].

Спектр физиологических функций микробных пигментов чрезвычайно широк. Например, виолацеин способен защищать клеточные мембраны от перекисного окисления [97]. В то же время, некоторые бактериальные пигменты способны усиливать окислительный стресс. Так, пиоцианин, продуцируемый *Pseudomonas aeruginosa*, способен к акцепции электронов от биологических восстановителей (НАДФН и глутатион), что приводит к генерации АФК и усилению окислительного стресса. Вероятно, данный механизм вносит значительный вклад в вирулентность синегнойной палочки, что подтверждается снижением инфекционной активности у мутантных штаммов, не способных к синтезу пиоцианина [97].

Таким образом, пигменты, продуцируемые микроорганизмами способны как обеспечивать защиту от окислительного стресса, так и стимулировать повышение его интенсивности. Можно предположить, что для реализации защитной функции бактерии увеличивают биосинтез пигментов в условиях слабого окислительного стресса. При этом у культуры-продуцента может проявляться устойчивость к воздействию синтезируемого вторичного метаболита (в частности, у *P. aeruginosa* к пиоцианину) благодаря адаптации к АФК, а фактор ингибирования роста продуктами метаболизма нивелируется.

Разнообразие биологических функций микробных пигментов позволяет им играть противоположные роли, что определяется их химической природой. В частности, одни пигменты обладают иммуносупрессивной активностью, а другие, напротив, способны ее подавлять. Соединения, обладающие иммуносупрессивной активностью, используются в качестве иммунодепрессантов – класса препаратов, подавляющих активность иммунной системы. Их применяют для снижения риска отторжения

трансплантата. Известно, что ряд иммунодепрессантов получен из природных источников [98].

Согласно Вебера, Н.Т. и соавт., красный пигмент гидрохлорид циклопродигиозина, синтезируемый *Pseudoalteromonas denitrificans*, ингибирует пролиферацию Т-клеток линии Jurkat, индуцированную фторбол-12-миристан-13-ацетатом. Другой пример – подавление продигиозином реакции «трансплантант против хозяина», вызванной конканавалином А. По мнению авторов, эти эффекты свидетельствуют об иммуносупрессивной активности микробных пигментов [99]. В работе Flieger, J. и соавт., в свою очередь, сообщается, что каротиноиды (наряду с эндогенными пигментами человека, такими как меланин) обладают способностью противодействовать иммуносупрессии [99]. Речь, по-видимому, идет о нейтрализации иммуносупрессивного эффекта, вызванного воздействием на кожу человека и сопутствующего окислительного стресса. Защищая клетки от фотоповреждения, каротиноиды могут нивелировать подавления иммунного ответа.

Таким образом, микробные пигменты могут проявлять значимость как за счет иммуносупрессивной, так и за счет иммуностимулирующей активности. Однако в научной литературе до сих пор недостаточно данных о разнообразии пигментов с подобными свойствами, что указывает на необходимость дальнейших исследований, включая применение методов молекулярно-генетического анализа.

Согласно исследованию Engelman A. и соавт., ВИЧ-1 и ВИЧ-2 инфицируют более 30 миллионов человек по всему миру. Вирулентность этих вирусов связана с активностью ферментов, участвующих в репликации [100]. Многие противовирусные препараты представляют собой ингибиторы данных ферментов, и к их числу относятся пигменты микробного происхождения. Сообщается, что соединения, выделенные из видов рода *Phoma*, проявляют ингибирующую активность по отношению к интегразы ВИЧ. Кроме того, виолацеин способен подавлять не только репликацию ВИЧ, но и развитие

лимфомы, ассоциированной со СПИДом [30, 101]. В работе Vaishnavi M. и соавт. описан штамм актиномицетов, выделенный из леса Сабаримала в Западных Гатах (Индия), который синтезирует водорастворимый пигмент, активный в отношении ВИЧ, с величиной IC_{50} 8,75 мкг/мл [102]. Имеются также данные о том, что фикобилипротеины, выделенные из красных водорослей и цианобактерий, проявляют активность в контексте болезни Альцгеймера [30].

Таким образом, широкий спектр вторичных метаболитов определяет их высокий фармакологический потенциал, что иллюстрируется, например, их активностью против болезни Альцгеймера и ВИЧ. Это обуславливает необходимость дальнейшего изучения их значимости.

В литературе мало сведений об антилипопероксидантной и противоязвенной активности микробных вторичных метаболитов. Однако известно, что виолацеин проявляет антилипопероксидантные свойства в печени крыс (ингибирование на 40,0% при IC_{50} 125,0 и 505,0 мкМ), а флексирубин, синтезируемый представителями родов *Chryseobacterium* и *Flavobacterium*, снижает риск развития хронических кожных заболеваний, язвы желудка и экземы [30].

Behera Н.Т. и соавт. сообщают, что противовирусной активностью обладают следующие микробные пигменты: феназины (продуцируются *Pseudomonas* и *Streptomyces*), виолацеин, антрахиноны, бензохиноны и нафтохиноны, меланин, а также флексирубин, синтезируемый *Flavobacterium* sp. [30]. В исследовании Gomes M. и соавт. описана чувствительность ряда тест-культур фитопатогенных и оппортунистических грибов (*Endothia parasitica*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Cryptococcus gastricus*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*, *Candida albicans*) к пигментам, продуцируемым бактериями родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Collimonas* и *Chromobacterium* [103].

В научной литературе приведены данные о том, что многие пигменты обладают выраженной антимикробной активностью. Ярким примером служат феназины, синтезируемые представителями рода *Pseudomonas*. Эти бактерии обладают значительным биотехнологическим потенциалом и широко используются в качестве активного компонента биологических средств защиты растений [104]. Кроме того, они способны стимулировать рост растений благодаря продукции индол-3-уксусной кислоты (ИУК) и других факторов [105-108]. Известно более 6000 феназиновых соединений, но лишь менее 100 из них имеют естественное происхождение [109]. В зависимости от характера и положения заместителей в гетероциклическом кольце, эти соединения имеют несколько максимумов поглощения в УФ-диапазоне и, как минимум, один — в видимой области спектра [109]. Большинство из них способны подавлять рост микроорганизмов.

1.2. Разнообразие и распространенность виолацеинсинтезирующих микроорганизмов

С 2007 года род *Chromobacterium* расширился от одного вида (*C. violaceum*) до *C. subtsugae* [110], *C. aquaticum* [111], *C. haemolyticum* [112], *C. piscinae* [113], *C. pseudoviolaceum* [113], *C. vaccinii* [114], *C. amazonense* [115], *C. rhizoryzae* [116] и *C. sphagni* [117]. Последний представляет собой грамотрицательную подвижную палочковидную бактерию с инсектицидными свойствами, выделенную из болот в Западной Вирджинии и Мэн (США) [117].

Бактерия *C. subtsugae* была впервые выделена из лесной почвы в районе горы Катоктин штата Мэриленд. Авторами было показано, что она проявила пероральную токсичность для личинок колорадского жука и некоторых других видов насекомых [110]. Из образцов родниковой воды, собранных в горе Ян-Мин, округ Тайбэй, Тайвань, выделена бактерия, которая представляет новый вид - *C. aquaticum* [111]. В 1972, в Сунгай, Малазия, и в 1953 (происхождение неизвестно) годах были выделены штаммы микроорганизмов, идентифицированные как *C. violaceum*, но позже были

замечены различия, позволившие классифицировать эти бактерии как два новых вида, а именно *C. piscinae*, *C. pseudoviolaceum* [113]. Большое число признаков, различающихся у видов *C. violaceum* и *C. fluviatile* привело к тому, что в 1989 Ниал Логан разместил бактерию *C. fluviatile* в отдельный род *Iodobacter*. В последствие *C. fluviatile* стал известен как *Iodobacter fluviatile* [118].

В 2013 году опубликована работа, описывающая выделение и изучение изолята микроорганизма из осадка арктического озера [119]. Согласно полученным данным, результаты физиологических и биохимических тестов и генотипические данные стали основанием определить этот вид как *Iodobacter limnosediminis* [119]. Спустя несколько месяцев, опубликована статья, в которой авторы предлагают новый вид рода, выделенного из осадка талых вод арктического ледника – *I. articus* [120].

Таким образом, можно отметить, что род *Iodobacter* развивается, дополняясь новыми видами, в том числе и виолацеин-продуцирующими. Такие виды характеризуются уникальными комбинациями свойств, вызывающими интерес к изучению условий их формирования.

В 2010 года опубликована работа, в которой описан штамм-продуцент красного пигмента *Janthinobacterium lividium* BR01 – первый пример продуцента продигозина среди β -протеобактерий, выделенный из промерзшей почвы Аляски [121]. В статье приведена характеристика генного кластера, кодирующего синтез пигмента данного штамма [121]. Соединение красного цвета оказалось смесью продигозина и гептилпродигозина. Существование бактерий с такими свойствами может расширить портрет микробного мира. Однако, бактерии *J. lividium* являются широко распространенными продуцентами виолацеина. Известно, что образование биопленки и виолацеина у *J. lividium* связано с общим метаболическим путем и зависит от источника углерода, а также могут представлять собой реакцию на воздействие окружающей среды в качестве механизма выживания [122].

Из образцов ледникового льда с острова Шпицберген в Арктике была выделена бактерия, по своим признакам схожая с *J. lividium*, но характеризующаяся заметной темно-красной пигментацией с градиентом от коричневого до черного. На основании этого факта и филогенетического анализа, основанного на анализе последовательности генов 16S рРНК и тестах ДНК-ДНК гибридизации, сделан вывод о том, что данный штамм принадлежит к новому виду, отличному от уже известных *J. lividium* и *J. agaricidamnosum*, и предложено название *Janthinobacterium svalbardensis* [11].

В России бактерии рода *Janthinobacterium* были обнаружены в водах Кандалашского залива Белого моря [123], среди микробных ассоциантов гаметофитов сфагновых мхов Ленинградской области и Западной Сибири [124], пробы донного осадка источника Буксыкена Северного Прибайкалья [125], болота Томской области [126], Рыбинском водохранилище [127], воды реки Везелка города Белгорода [128] и др.

В 1997 году была опубликована работа Акира Хираиши с соавторами, в которой предложено реклассифицировать *Zoogloea ramigera* на основании анализа последовательностей 16S рибосомальной рДНК, в новом таксоне *Duganella zoogloeoides* [129]. Это привело к формированию нового рода *Duganella*. Из образцов лесной почвы провинции Юньнань, Китай, выделены бактерии, которые сформировали новый вид рода *Duganella*, а именно *Duganella violaceinigra*, образующие фиолетово-черный пигмент [130]. Из ризосферы диких и культивируемых оливок Испании выделены бактерии рода *Duganella*, образующие фиолетового цвета пигмент, этанольный экстракт которого характеризуется пиком при 570 нм, а также положительной качественной реакцией с 10%-ной серной кислотой (образуется раствор зеленого цвета) [13]. В 2011 году опубликована работа, в которой было предложено переклассифицировать *D. violaceinigra* как вид нового рода *Pseudoduganella*: *P. violaceinigra*, на основании низкого сходства последовательностей 16S рРНК с другими видами рода *Duganella* [113].

В 2004 году была опубликована работа, в которой описан новый род и вид *Collimonas fungivorans* [131]. Позже, в 2009 году, опубликована работа, описывающая виолацеин-продуцирующие бактерии рода *Collimonas* из планктонной морской зоны побережья в Трэнделаге, Норвегия [132].

Из культуры крови 25-летнего мужчины, госпитализированного с прогрессирующей фебрильной мозжечковой атаксией, в больнице, находящейся в Марселе, выделена аэробная грамотрицательная бактерия. Идентификация и анализ последовательностей 16S рНК изолята показал большое сходство с *D. zoogloeoides* и *Telluria mixta*, но дальнейшее изучение индивидуальных свойств привело авторов работы к предложению нового рода и вида *Massilia timonae* [133]. В 2018 году опубликована работа, расширяющая род микроорганизмом-продуцентом виолацеина, для которого предложено название *M. violaceinigræ*. Бактерия выделена из ледника вечной мерзлоты [134]. В 2019 опубликована работа, в которой описано выделение ещё одного микроорганизма рода из почвы в Хэфэй, Китай. Для него было предложено название *M. atriviolaceæ* [135].

Таким образом, существует множество виолацеинсинтезирующих микроорганизмов различных родов класса β -протеобактерий семейств *Neisseriaceæ* и *Oxalobacteriaceæ*. И их биоразнообразие расширяется. Все они являются грамотрицательными подвижными палочковидными аэробными или факультативно анаэробными бактериями, образующие виолацеин из триптофана, различающиеся своими индивидуальными свойствами, которые могут обладать биотехнологической значимостью. Следует отметить, что микроорганизмы, которые способны к биосинтезу пигмента растут при низкой температуре. Можно предположить, что клетки таких бактерий образуют белки и вторичные метаболиты, которые позволяют ей функционировать в такой среде.

1.3. Биосинтез виолацеина

Известно, что биосинтез виолацеина осуществляется при участии пяти генов: *vioA*, *vioB*, *vioC*, *vioD*, и *vioE* (табл. 1), которые обеспечивают конденсацию двух молекул L-триптофана и синтез пигмента [134].

Таблица 1. Гены *vio* оперона биосинтеза виолацеина [90]

Ген	Обозначение	Функция	Молекулярная масса	Размер (п.о.)	Номер в PDB
<i>vioA</i>	CV_RS16140	Флавинзависимая триптофан 2-монооксигеназа	48	1257	5G3S
<i>vioB</i>	CV_RS16135	Синтаза димера иминофенил-пируват	111	2997	–
<i>vioC</i>	CV_RS16130	FAD-зависимая монооксигеназа	48	1290	2WBO
<i>vioD</i>	CV_RS16125	Флавин-зависимая монооксигеназа	42	1122	3C4A
<i>vioE</i>	CV_RS16120	Изомеразы, отвечающая за конверсию флаванона в изофлаван	22	576	2ZF3

Производное виолацеина - дезоксивиолацеин (ДВЦ) образуется дикими штаммами бактерий как побочный продукт биосинтеза виолацеина (рис. 11). Его отличие от виолацеина в отсутствии 1 атома кислорода в 6 положении индольного кольца. Экстракты виолацеина, продуцируемого дикими штаммами, обычно содержат до 10% дезоксивиолацеина. Оксивиолацеин (рис. 11) является еще одним структурным аналогом виолацеина, содержащим дополнительный атом кислорода в положении 20 индольного кольца. Оксивиолацеин может быть получен при использовании экзогенного 5-гидрокси-1-триптофана (5-НТР) в качестве предшественника, что связано с широкой субстратной специфичностью ферментов биосинтеза виолацеина [136].

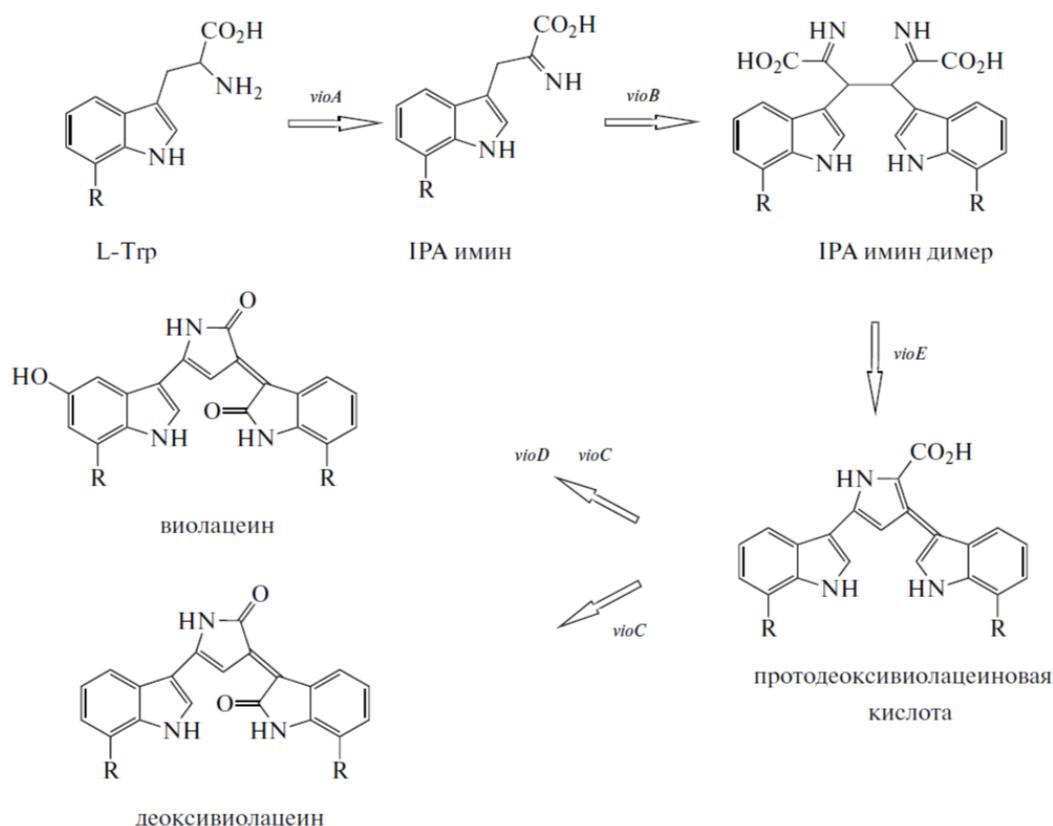


Рисунок 11. Пути биосинтеза бактериального виолацеина [90]

Несмотря на то, что превращение 5-НТР в оксивиолацеин катализируется теми же ферментами, что и превращение L-триптофана в виолацеин (рис. 11), скорость образования 5-НТР выше, чем скорость образования виолацеина в L-триптофан [137].

В ходе исследования биосинтеза виолацеина двумя сконструированными штаммами *Escherichia coli* авторы оценивали метаболические адаптации штаммов к изменениям окружающей среды (температура, наличие питательных веществ) и генетическим воздействиям (индукция экспрессии изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом, ИПТГ, англ. IPTG) [138]. Данные подтверждают, что бактериям свойственна жесткость топологии метаболической сети, которая заключается в сохранении основного пути превращения соединений углерода. Метаболическая ригидность является широко распространенным свойством, о чем свидетельствуют данные о том, что как бактериальные, так и дрожжевые клетки поддерживают жесткое распределение потоков, устойчивое к нулевым мутациям. Это

подтверждает общее правило, регуляции клеточного метаболизма: клетки стремятся минимизировать перестройку цикла, несмотря на генетические и экологические нарушения. Такая защита позволяет бактериям избежать энергетически затратной адаптации и, таким образом, способствует их выживанию и эволюции. Считается, что основными эволюционными приобретениями, обеспечивающими высокую устойчивость клеток к внешним воздействиям, являются механизмы обратной связи, метаболическая избыточность и модульность [138].

В 2010 был охарактеризован кластер генов, ответственный за биосинтез виолацеина у штамма бактерии, выделенного из почв Аляски. первоначально с помощью случайного мутагенеза было установлено, что инактивация гена *stpB* приводит к потере способности к пигментообразованию, однако идентифицировать гены, ответственные за биосинтез пигмента, в этой работе не удалось. Последующие исследования показали, что прототипный биосинтетический кластер виолацеина состоит из пяти генов, обозначаемых как оперон *vioABCDE*. Целенаправленный мутагенез этих генов подтвердил их роль, приводя к образованию непигментированных мутантов [138]. Согласно литературным данным, виолацеин является респираторным пигментом, и его синтез возможен только в аэробных условиях, так как требует поступление кислорода [13].

Предположительно, способность к биосинтезу виолацеина позволяет микроорганизмам быть устойчивее к неблагоприятным условиям среды. Возможно, эффект является косвенным, что требует более углубленных исследований. Однако, опубликован ряд исследований, которые свидетельствуют о биотехнологической значимости пигментов.

В ходе исследования антагонистических свойств *S. violaceum* в отношении *Staphylococcus aureus* при совместном культивировании было обнаружено, что пигмент выделяется в среду, будучи упакованный в везикулы [15]. Везикулы наружной мембраны (outer membrane vesicles, OMV) представляют собой сферические наноструктуры, ограниченные двуслойным

липидным слоем, которые постоянно секретируются грамотрицательными бактериями во внеклеточное пространство. Этот процесс обеспечивает взаимодействие типа «патоген-хозяин» и адаптацию к неблагоприятным условиям окружающей среды. Методом ВЭЖХ (при длине волны 572 нм) было установлено, что пигмент высвобождается в окружающую среду в составе OMV. Авторы обнаружили, что в очищенных экстрактах OMV содержался виолацеин, тогда как в супернатанте, лишенным везикул, пигмент отсутствовал. В качестве контроля использовали мутантный штамм, неспособный к образованию пигмента. Исследование также показало, что биосинтез виолацеина стимулирует процесс синтеза везикул у *C. violaceum*. Кроме того, было показано, что OMV опосредуют антагонистическое действие в отношении грамположительных бактерий [139].

В научной литературе приводятся данные о том, что синтез виолацеина у бактерий тесно связан с системой чувства кворума (QS) [90, 128]. Известен механизм у *C. violaceum* [90], который основан на том, что при достижении высокой плотности клеточной популяции накапливается ацилгомосериновый лактон (AHL), выступающий в роли аутоиндуктора, который стимулирует образование пигмента. Система QS на основе AHL состоит из синтетазы AHL CviI и рецептора CviR. После связывания с AHL белок CviR, выполняющий функцию активатора транскрипции оперона *vioABCDE*, кодирующего ферменты биосинтеза виолацеина.

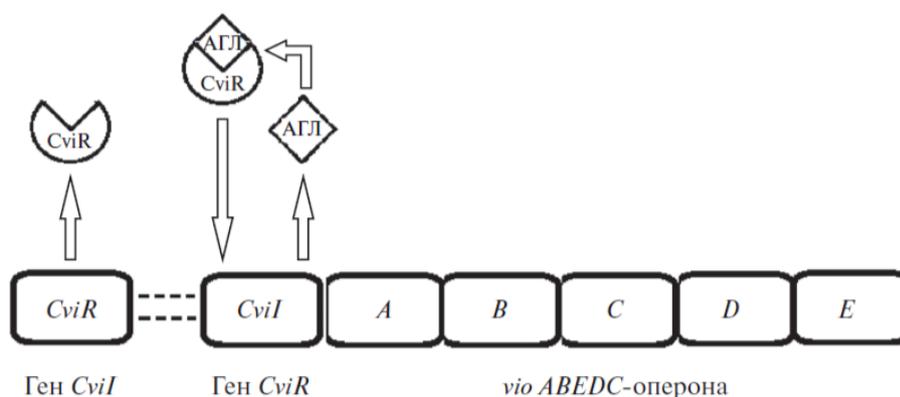


Рисунок 12. Кворум-зависимый синтез виолацеина у *Chromobacterium violaceum* [90]

Наличие системы QS обеспечивает бактериям *C. violaceum* конкурентное преимущество [90]. Это подтверждается данными о том, что QS-зависимый трансмембранный насос CdeAB-OprM обеспечивает защиту хромобактерии от антибиотика, продуцируемого *Burkholderia thailandensis* [140]. Чувство кворума представляет собой форму межклеточной коммуникации у микроорганизмов, опосредованную сигнальными молекулами (аутоиндукторами) и позволяющую координировать групповое поведение клеток [141].

При повышении плотности микробных клеток в популяции и концентрации сигнальных молекул в окружающей среде бактерии координируют свое поведение, активируя экспрессию генов, отвечающих за реализацию определенных физиологических функций и регуляторных механизмов [128, 141]. Известно, что у грамотрицательных бактерий синтезируется множество аутоиндукторов, наиболее распространенным из которых является *N*-ацилгомосериновый лактон (*AHL*). Молекула состоит из *N*-ацилгомосеринового лактонового кольца с высоким содержанием серина, содержащего 4-18 карбонильных цепей [141]. Длина цепи влияет на качество сигнала. Биосинтез *AHL* катализируется ферментом *LuxI*-синтазой, которая соединяет ацильный остаток с белком-носителем и *S*-аденозинметионином (*SAM*) [141]. Согласно опубликованным исследованиям, аутоиндукторы обладают рядом ключевых свойств: способность свободно диффундировать через бактериальную мембрану, связывание со специфическими рецепторами во внутриклеточных мембранах и цитоплазме, вариативность комбинации генов, поддерживающих различные физиологические процессы, а также установления кольца прямой связи для обеспечения синхронной экспрессии генов в популяции [141]. В качестве примера атипичных аутоиндукторов у грамотрицательных бактерий выступают молекулы семейства *DSF* (факторы диффузированного сигнала), представляющие собой *cis*-2-ненасыщенные жирные кислоты с разной длиной и разветвленностью цепи. Согласно

литературным данным, *DSF*-молекулы обнаружены у таких микроорганизмов, как *Xantomonas campestris* (*цис*-11-метил-2-додекаеновая), *X. oryzae* (*цис*-2-додециленовая кислота, *цис*-11-метил-2,5-диеновая кислота, *цис*-11-метилдодекарбонат 2,5-диеновая кислота), *Burkholderia* sp. (*цис*-2-додециленовая кислота), *Pseudomonas aeruginosa* (*цис*-2-декановая кислота) и *Xylella fastidiosa* (*цис*-2-14 углеродная олефиновая кислота) [141]. Аутоиндукторы этих микроорганизмов связаны с вирулентностью, образованием биопленок и устойчивостью к антибиотикам. В отличие от грамотрицательных, у грамположительных бактерий в качестве сигнальных молекул *QS* выступают модифицированные олигопептиды (autoinducing peptides, *AIP*). Они секретируются во внешнюю среду с помощью специальных транспортеров. *QS*-системы на основе олигопептидов обычно являются двухкомпонентными: сенсорные киназы, расположенные на поверхности клеток, при связывании с *AIP* запускают каскад фосфорилирования, который в конечном итоге регулирует транскрипцию генов-мишеней, когда концентрация *AIP* достигает порогового значения [141].

Виолацеин, как вторичный метаболит *QS*-системы, демонстрирует широкий спектр биологической активности, включая противоопухолевую, антибактериальную, антимикозную, антипротозойную и противопаразитарную активность, что обосновывает его высокую практическую значимость. Кроме того, пигмент обладает противовирусной активностью в отношении вируса простого герпеса [142]. Согласно литературным данным, цитотоксичность пигмента оценивали на моделях колоректального рака человека. Показано, что виолацеин индуцирует окислительный стресс, выступающий ключевым медиатором апоптоза, а также нарушает ход клеточного цикла [142]. Исследование на мышинной модели с внутрибрюшным введением виолацеина в течение 12 дней показало значительное увеличение продолжения жизни животных с опухолями. В том же источнике описаны антибактериальные и антимикозные свойства виолацеина [142]. Пигмент проявлял антимикробную активность в отношении

21 штамма бактерий, при этом наименее чувствительными оказались пять грамотрицательных штаммов и один штамм *Bacillus subtilis*. Виолацеин также был эффективен против фитопатогенного гриба *Rosellina necatrix* - возбудителя белой корневой гнили шелковицы. Антимикобактериальная активность пигмента в отношении *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra была сопоставима с эффективностью стандартного противотуберкулезного химиотерапевтического средства. Кроме того, имеются данные о противомаларийной активности виолацеина [58].

Для оценки цитотоксичности виолацеина в качестве маркера жизнеспособности клеток использовали активность фосфатаз [44]. Исследование выявило, что один из возможных механизмов подавления активности лимфоцитов связан с модификацией сульфгидрильных групп в активном центре белка тирозинфосфатазы. Кроме того, предполагается, что гидрофобные взаимодействия между виолацеином и специфическими доменами фермента также могут способствовать его инаktivации [44]. Эти предположения основаны на экспериментальных данных: после 20-минутной инкубации с виолацеином в концентрации 10,0 мкмоль/л наблюдалась 20%-ная активация общей активности протеинфосфатаз, экстрагированных из лимфоцитов человека [44]. При последующей инкубации в тех же условиях было достигнуто 30%-ное подавление активности внутриклеточных протеинтирозинфосфатаз [44]. Чувствительность трансмембранной тирозинфосфатазы к виолацеину, по-видимому, зависит от её конформации, которая изменяется при выделении фермента из мембранных липидов [44]. Активность фосфатаз имеет критическое значение для клетки, поскольку фосфорилирование и дефосфорилирование белков - это универсальный механизм регуляции клеточных процессов, включая рост, дифференцировку и метаболизм, а также передачи сигналов [44].

Исходя из опубликованных исследований, биотехнологическая значимость виолацеин-продуцирующих бактерий расширяется за счёт данных о том, что *Chromobacterium subtsugae* (выделенная из лесной почвы в

Мэриленде) проявляет инсектицидную активность в отношении колорадского жука, непарного шелкопряда, а также личинок ромбовидной моли и комаров [143]. Однако прямые доказательства роли самого виолацеина в инсектицидной активности *C. subtsugae* в настоящее время отсутствуют.

Согласно литературным данным, виолацеин обладает антилейшманиозной активностью [144]. Исследование показало, что в образцах, содержащих виолацеин, жизнеспособность культуры *Leishmania* снижалась на 50,0% по сравнению с контролем без ингибитора. При этом активность виолацеина была ниже, чем у стандартного препарата пентамидина, который оказывал 100,0% биоцидное действие. Важно отметить, что при обработке самцов мышей виолацеином в концентрации 10 мкмоль/л в течение семи дней побочных эффектов выявлено не было, в то время как пентамидин проявил выраженную токсичность [144].

Опубликованы сведения [145] о том, что предпринята попытка разработки комбинированного препарата на основе виолацеина и антагониста *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100, направленного против полимикробной ассоциации, включавшей *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus* и *Klebsiella pneumoniae*. Антагонистическая эффективность отдельных компонентов - виолацеина и *B. bacteriovorus* HD100 - составила 19,0% и 68,0% соответственно, тогда как их совместное применение обеспечило синергический эффект, достигший 99,98% [145]. При этом виолацеин не оказывал ингибирующего действия на рост и активность *B. bacteriovorus* HD100 [145]. Таким образом, полученные результаты обосновывают значительный интерес для конструирования новых комплексных средств с выраженным антимикробным потенциалом.

Среди опубликованных исследований биоактивных свойств виолацеина - эффективность контроля клеточного цикла и увеличение продукции рекомбинантного иммуноглобулина G (*IgG*) в клетках яичника китайского хомячка (СНО), которые используются в качестве клеток-хозяев для получения промышленных моноклональных антител (*mAb*) [146]. Это

направление очень важно для фармацевтической области производства [128]. Контроль клеточного цикла представляет собой эффективный подход к увеличению продукции *mAb* в культуре клеток. В исследовании, по сравнению с контролем, присутствие 0,9 мкМ виолацеина в 14-дневной культуре с подпиткой увеличивало максимальную концентрацию *IgG* на 37,6% за счет увеличения удельной скорости продукции и продолжительности жизни клеток [146]. Анализ клеточного цикла показал, что виолацеин индуцировал остановку фазы G1 и G2 / M. Однако арест G1 наблюдался только в первый день, в то время как задержка G2 / M длилась более 3 дней, что позволяет предположить, что задержка G2 / M опосредует индуцированное виолацеином усиленное производство *IgG*. Более того, в соответствии с повышенной экспрессией белка, уровни экспрессии мРНК *IgG* и скорость метаболизма питательных веществ также были увеличены [146]. На профили N-связанного гликозилирования и вариантов заряда обработка виолацеином практически не влияла. Результаты исследования показывают, что виолацеин влияет на клеточный цикл клеток СНО и увеличивает выработку *IgG* без изменения качества продукта, показывая перспективу в качестве усилителя продукции *mAb* в клетках СНО [146]. Исследование дает представление об использовании виолацеина в промышленном производстве *mAb* и может помочь в разработке передовых эффективных технологий производства *mAb* с использованием культур клеток СНО [146]. Полученные авторами результаты обладают фармацевтической значимостью, так как иммуноглобулины широко востребованы в терапии онкологии.

В ходе анализа литературы было выявлено, что биотехнологический потенциал способности микроорганизмов к пигментообразованию проявился в неожиданном аспекте. Основываясь на существовании зависимости между концентрацией индуктора и продукцией виолацеина, путь его биосинтеза был реконструирован в бактериях *E. coli* под контролем промотора T7 *lac* таким образом, чтобы экспрессия генов регулировалась Pb(II)-зависимым металлорегулятором *PbrR* [147]. В результате был сконструирован Pb(II)-

индуцируемый цельноклеточный биосенсор, обеспечивающий специфическое детектирование ионов свинца с высокой селективностью и устойчивостью к помехам со стороны других ионов металлов [147]. Преимущество данной системы заключается в том, что изменение цвета, обусловленное внутриклеточным накоплением виолацеина, можно визуальным образом оценить невооруженным глазом непосредственно после воздействия высокой концентрации свинца, а также количественно определить путем измерения оптической плотности при 575 нм (максимум поглощения виолацеина) после экстракции бутанолом [147]. Согласно опубликованным исследованиям [147], был получен линейный диапазон детекции концентраций Pb(II) от 0,1875 до 1,5 мкМ. Новый цельноклеточный биосенсор на основе пигмента способен обнаруживать концентрации Pb(II) до 0,1875 мкМ *in vitro*. Результаты показывают, что генетически запрограммированный биосинтез виолацеина позволяет создать чувствительную визуальную систему для качественного и количественного мониторинга биодоступного Pb(II) в загрязненных субстратах [147].

Бактерии, способные к синтезу виолацеина, часто выступают в качестве модельных объектов при исследовании антибактериальных веществ, нацеленных на подавление системы чувства кворума (QS) [148]. Известно, что *Chromobacterium violaceum* использовали в качестве тест-культуры для изучения антибактериальной и антикворумной активности вторичных метаболитов семян *Annona senegalensis*. В ходе исследования было выявлено, что под действием этих метаболитов подавляется синтез виолацеина, что свидетельствует об ингибировании кворум-зависимых путей [148].

Опубликован значимый факт по итогам исследования: *C. violaceum* способна расти в присутствии цианида калия (KCN) и продуцировать синильную кислоту (HCN), что приводит к гибели личинок комаров *Anopheles gambiae* [150]. Кроме того, бактерии рода *Chromobacterium* способны к биосинтезу поли-3-гидроксибутирата (ПГБ) из растительных масел [150]. Биотехнологический потенциал этих бактерий также включает возможность

их использования в процессах биоизвлечения золота из вторичного сырья, например, из электронных отходов [150]. На основе *S. violaceum* были сконструированы два штамма (*pBAD* и *pTAC*) путем сайт-специфической интеграции дублированного оперона *hcnABC* под контролем экзогенных промоторов *pBAD* и *pTAC* соответственно, с целью повышения эффективности биовыщелачивания [151].

Таким образом, вторичные метаболиты микроорганизмов представляют собой перспективную основу для создания препаратов широкого спектра действия. Показано, что виолацеин обладает рядом биотехнологически значимых свойств, включая противомикробную, противоопухолевую и антиоксидантную активность. Широкое распространение виолацеин-продуцирующих микроорганизмов в природе, их поиск, всестороннее изучение и разработка эффективных биотехнологических процессов получения виолацеина позволят расширить ассортимент биопрепаратов, в том числе для применения в сельском хозяйстве в качестве средств защиты растений.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Микроорганизмы, используемые в исследовании

Штамм *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D, выделен из воды прибрежной зоны реки Везёлка города Белгород. Питательная среда для выделения содержала массовую долю пептона 3,0% [153]. Штамм задепонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ).

Наличие антагонистической активности у штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D оценивали на примере 23 тест-культур грамположительных и грамотрицательных бактерий, полученных как из ВКМ, так и из рабочей коллекции: 1. *Pseudomonas aeruginosa* ML4262; 2. *P. putida* КТ2442; 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. flexsus* 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 использовали *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864 и *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.

2.2. Питательные среды, используемые в исследовании

1. Выделение пигментообразующей бактерии из воды реки Везёлка проводили на питательной среде следующего состава, г/л: пептон – 30,0; агар микробиологический – 20,0 [153].
2. Для проведения скрининга антагонистической активности штамма использовали питательные среды [153]:
 - 2.1. питательная среда LB: триптон – 10,0 г/л; дрожжевой экстракт – 5,0 г/л; NaCl – 10,0 г/л; агар микробиологический – 20,0 г/л [153];
 - 2.2. для оценки противогрибковой активности использовали питательную среду Сабуро: глюкоза – 40,0 г/л; пептон – 10,0 г/л; дрожжевой экстракт – 5,0 г/л; агар – 20,0 г/л [153].
3. Для определения условий оптимального роста бактерий использовали жидкую полноценную среду 5/5. Среда содержала (г/л): экстракт сои – 30,0, гидролизат казеина – 5,0, дрожжевой экстракт – 1,0 и аминокислоты – 60,0 мл/л (pH 7.2).
4. Способность штамма к гидролизу казеина оценивали на агаризованном молочном оброте: стерильное обезжиренное центрифугированием, при 8000 об/мин, молока и 2,0% агара микробиологического [153].
5. Липолитическую активность оценивали с использованием питательной среды, содержащей (г/л): твин-80 – 10,0 мл; пептон – 10,0 г; NaCl – 5,0 г; CaCl₂·H₂O – 0,1 г [153].
6. Уреазную активность оценивали с использованием жидкой питательной среды составом (г/л): (NH₂)₂CO – 5,0, K₂HPO₄ – 0,5, цитрат Na – 5,0. Карбамид вносили после автоклавирования. Под пробку размещали пропитанную стерильной водой лакмусовую бумажку [153].
7. В эксперименте по подбору ростового субстрата использовали среды:
 - 7.1. питательный бульон (Nutrient Broth, NB), составом (г/л): 5,0 г пептона, 2,0 г дрожжевого экстракта, 5,0 г NaCl [154].
 - 7.2. жидкую питательную среду с массовой долей пептона 1,0%;
 - 7.3. жидкую питательную среду с массовой долей пептона 3,0%.

2.3. Выделение пигментообразующей бактерии из реки Везёлки города Белгород

Общая схема исследования таксономических признаков и индивидуальных свойств представлена на рисунке 13. Пробы воды из прибрежной зоны реки Везёлка (координаты: 50.593728, 36.568453) отбирали в стерильные ёмкости [153].

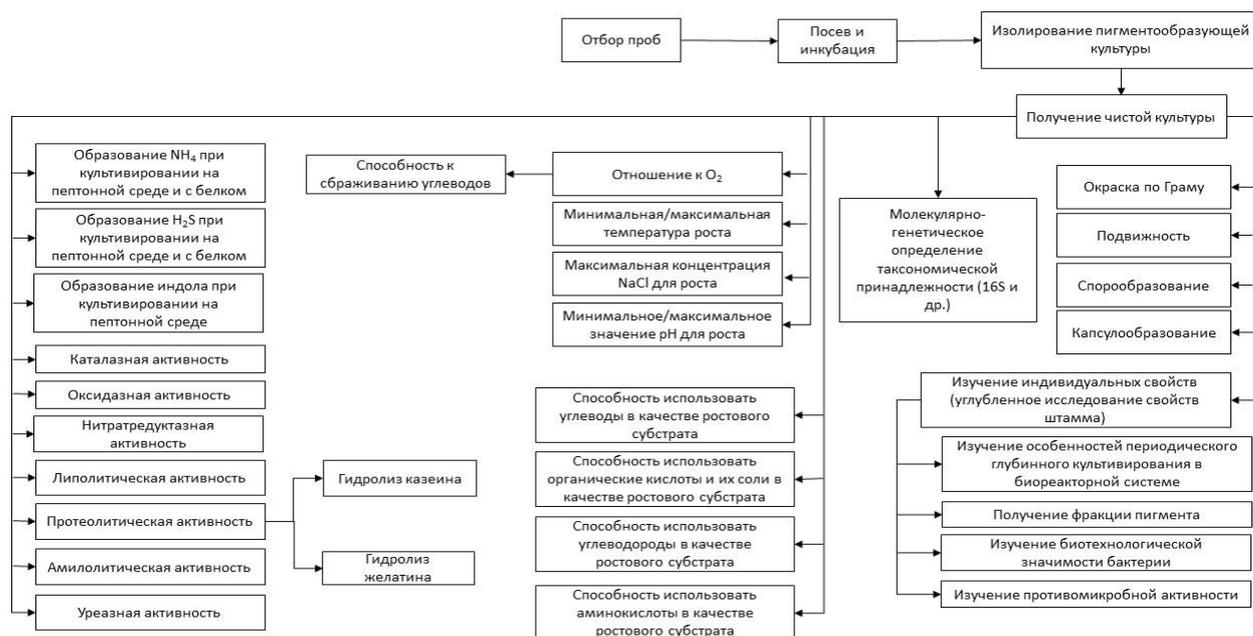


Рисунок 13. Общая схема исследования таксономических признаков и индивидуальных свойств пигментообразующей бактерии, выделенной из реки Везёлка города Белгород

В лабораторных условиях по 100,0 мкл пробы вносили «газоном» на поверхность агаризованной питательной среды в чашках Петри. Использовали агаризованную питательную среду с массовой долей пептона 3,0% [153]. Инкубацию проводили при $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 7 суток. Изолированные пигментированные колонии пересеивали в чистую культуру методом микробиологического штриха [153].

2.4. Молекулярно-генетические исследования пигментообразующей бактерии из реки Везёлка города Белгород

Геномную ДНК выделяли из клеток с помощью набора Fungal/Bacterial DNA Kit (ZymoResearch, США) в соответствии с рекомендацией производителя. Для амплификации в ПЦР гена 16S рРНК, использовали универсальные для 16S рРНК прокариот праймеры: 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') и 1525r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC3') [155]. Амплифицированную ДНК очищали, используя набор Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (ZymoResearch, США). ПЦР-фрагменты ДНК секвенировали на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer.

Первичный филогенетический скрининг полученных последовательностей проводили с использованием программы BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>] в базе данных EzBioCloud (www.ezbiocloud.net). В качестве референсов для филогенетического анализа были использованы последовательности гена 16S рРНК, взятые из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Полученные для штамма FM3 нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК выравнивали вручную с последовательностями референтных штаммов ближайших микроорганизмов с помощью программы CLUSTAL W [156].

2.5. Определение оптимальных условий роста культуры

Условия оптимального роста культуры бактерий определяли с использованием жидкой полноценной среды 5/5. Температурный оптимум определяли по характеру роста в диапазоне 4,0–45,0°C [153].

Галотолерантность изолятов определяли при выращивании культур в среде 5/5, с содержанием NaCl в интервале от 0,0 до 10,0% [153]. Интенсивность роста культур оценивали по оптической плотности, измеряя при длине волны 590 нм и толщине кюветы 5 мм в спектрофотометре «UV

Specord» («Carl Zeiss», Германия). Каждый вариант опыта был выполнен в 3-х повторях.

Отношение изолята *J. lividum* ВКМ В-3705D к кислороду определяли стандартным методом посева уколом в столбик агара [153]. Для этого, агаризованной питательной среды с массовой долей пептона 3,0%, заливали в пробирки по 8,0 мл. После автоклавирования, засекали уколом в застывший агар. По характеру роста в толще среды судили об отношении культуры к O₂ [153].

2.6. Изучение культуральных и морфологических признаков бактерии

Культуральные и морфологические признаки [153] проводили с использованием стереоскопического микроскопа МИКРОМЕД II (Россия) и микроскопа Nikon Eclipse Ci microscope («Nikon», Япония) с камерой ProgRes SpeedXT («Jenoptic», Германия), иммерсионный маслянный объектив с фазовым-контрастом с увеличением x100.

Диаметр колоний бактерии рассчитывали с использованием формулы [128, 157]:

$$s = \sqrt{\frac{\sum V^2}{n}}, \quad (1)$$

где S – средняя квадратическая, V – дата, n – число повторов. Число повторов - 100 значений диаметра колоний.

2.7. Изучение тинкториальных признаков бактерии

Окраску по Граму проводили стандартным методом [128, 153]. Для обнаружения капсул был использован негативный метод Бурри. Подвижность бактериальных клеток определяли методом «висячей капли» [128, 153].

2.8. Изучение физиологических и биохимических признаков бактерии

Для определения образования каталазы у бактерии *J. lividum* ВКМ В-3705D, наносили на ее колонию 3,0% раствор перекиси водорода [128]. О наличии каталазы судили по образованию пузырьков воздуха [153].

По способности штамма к гидролизу казеина на агаризованном молочном оброте судили о протеолитической активности штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D [128]. О результате судили по зоне просветления среды около штриха культуры [158].

Липолитическую активность бактерии *J. lividum* ВКМ В-3705D оценивали с использованием среды, содержащей твин-80 [128, 153].

О наличии уреазы судили по выделению аммиака, который изменяет цвет лакмусовой бумажки на синий цвет при культивировании штамма. Кроме того, наличие аммиака в культуральной жидкости определяли с использованием реактива Несслера. В качестве контроля может выступать реакция сернокислого аммония с гидроксидом натрия, в результате чего выделяется аммиак [128, 153].

Определение способности культуры образовывать индол в жидкой питательной среде с пептоном проводили с использованием реакции Сальковского [128, 153]. Штамм культивировали в течение суток. После чего культуральную жидкость, содержащую микробные клетки, центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 20 минут. Надосадочную жидкость (5,0 мл) отбирали и использовали для анализа. Для этого, к исследуемому образцу приливали 1,0 мл 0,5% NaNO_3 и по каплям добавляли концентрированную серную кислоту. По образованию вишневой окраски судили о наличии индола в культуральной жидкости [128].

Способность к образованию аммиака на питательной среде с пептоном определяли с использованием реактива Несслера [153].

Способность культуры *J. lividum* ВКМ В-3705D к растворению неорганического фосфата определяли при росте изолята на питательной среде,

содержащей ортофосфат кальция [128]. По образованию зон обесцвечивания около посева судили о способности бактерии к растворению фосфата [153].

Активность ферментов и спектр ассимилируемых субстратов для штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D также, определяли с использованием коммерческих наборов API 20E («bioMérieux», Франция) согласно инструкции производителя [128].

Для определения спектра утилизируемых бактерией субстратов был использован набор API 50 CH («bioMérieux», Франция), предназначенный для изучения углеводного метаболизма микроорганизмов, согласно инструкциям фирмы-производителя [128].

Для анализа устойчивости штамма к антибиотикам на чашки Петри с плотной питательной средой 5/5 наносили по 100,0 мкл исследуемой культуры в экспоненциальной стадии роста и равномерно распределяли по всей поверхности чашки с помощью шпателя. Диски (производства ЗАО НИЦФ, Россия) выкладывали поверх исследуемой культуры на равном удалении друг от друга и от краев чашки. Результаты оценивали через 24 часа культивирования при $25\pm 0,5^\circ\text{C}$ по наличию зоны ингибирования вокруг диска [128].

2.9. Подбор состава питательной среды для периодического глубинного культивирования штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D

Питательную среду подбирали по наибольшему значению удельного прироста (R) колониеобразующих единиц ($\lg\text{КОЕ}/\text{мл}$) при $25\pm 0,5^\circ\text{C}$; интенсивности потребления амминного азота в культуральной жидкости; содержанию пигмента; влажности и сухой массе культуры, полученной в жидких питательных средах различного состава [153]. Для этого готовили по 100,0 мл среды Сабуро, сред с массовой долей пептона 1,0% и 3,0%, LB и NB. Во всех вариантах доводили pH до 7,0. Автоклавировали при $115\pm 0,15^\circ\text{C}$ в течение 30 минут и остужали до $25\pm 0,5^\circ\text{C}$ с использованием термостата.

Активную культуру *J. lividum* ВКМ В-3705D инокулировали в стандартную жидкую среду с массовой долей пептона 3,0% и культивировали в течение 18 часов. Выросшую суспензию, объемом по 1000,0 мкл вносили в подготовленные питательные среды и тщательно перемешивали. Посевы культивировали при $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 12 часов, при перемешивании 150 об/мин. Соблюдая условия асептики, на 0 и 12 часы инкубации, отбирали по 1000,0 мкл и высевали на агаризованную питательную среду с массовой долей пептона 3,0% методом Коха [153]. Посевы термостатировали при $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 48 часов и подсчитывали выросшие колонии.

Колониеобразующие единицы (*KOE/мл*) рассчитывали по формуле [153]:

$$N = \frac{M_a \cdot 10^n}{V}, \quad (2)$$

где: M_a – среднее арифметическое количество колоний на чашке Петри; n – коэффициент разведения; V – объем аликвоты, мл. Для упрощения расчетов использовали десятичный логарифм $\lg KOE/мл$.

Удельный прирост (R) $\lg KOE/мл$ рассчитывали по формуле:

$$R = \frac{\lg KOE/мл_1 - \lg KOE/мл_0}{\lg KOE/мл_0}, \quad (3)$$

где $\lg KOE/мл_0$ – численность колониобразующих единиц (*KOE*) в 1 мл культуральной жидкости на момент начала культивирования, а $\lg KOE/мл_1$ – на момент завершения.

На 0 и 12 часы культивирования отбирали 1000,0 мкл культуры в трех повторах. Взвесь выросшей бактерии осаждали центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 10 минут, а в надосадочной жидкости оценивали содержание аминного азота йодометрически, методом Стивенсона и Попа [159]. Для этого использовали свежеприготовленные растворы [159]:

1. 27,30 г хлорида меди растворяли в дистиллированной воде в мерной колбе, вместимостью 1000,0 мл;
2. 64,50 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ растворяли в свежеприготовленной дистиллированной воде. Добавляли 7,20 NaOH, переносили в мерную колбу,

вместимостью 1000,0 мл и доводили до метки дистиллированной водой при $20 \pm 0,05^\circ\text{C}$;

3. 57,21 г буры растворяли в 1500,0 мл дистиллированной воды. Добавляли 100,0 мл 1н HCl и доводили до метки, до объема 2000,0 мл;

4. 200,0 г щелочи растворяли в 800,0 мл дистиллированной воды;

5. 77,44 мл ледяной уксусной кислоты доводили дистиллированной водой до объема 100,0 мл;

6. 0,25 г вносили в 100,0 мл этилового спирта;

7. в 100,0 мл дистиллированной воды растворяли 40,0 г йодида калия;

8. 0,001 н раствор тиосульфата натрия готовили перед использованием из 0,1 н раствора;

9. 1,0 г растворимого крахмала вносили в 5,0 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивали. Полученную суспензию небольшими порциями вносили в 3М раствор KCl (80,0 мл) и кипятили в течение 5 минут. Охлаждали до комнатной температуры, переносили в мерную колбу на 100,0 мл и доводили до метки раствором KCl.

Аминный азот [159] в культуральной жидкости оценивали в 20,0 мл пробы. Для этого, аликвоту вносили в колбу, вместимостью 50,0 мл. Вносили 2 капли тимолфталейна и несколько капель 20%-го раствора NaOH, до появления голубой окраски. В готовую смесь добавляли 10,0 мл ортофосфата натрия, боратного буферного раствора и 5,0 мл раствора хлорида меди. Объем доводили до метки дистиллированной водой. Полученную суспензию быстро фильтровали через плотный складчатый фильтр, сразу же повторяя процедуру [159].

Полученный раствор титровали йодометрически. Для этого, 10,0 мл фильтрата вносили в коническую колбу. Добавляли 0,5 мл 80% уксусной кислоты и 5,0 мл раствора йодида калия. Выделившийся йод оттитровали 0,01 н раствором тиосульфата натрия до бледно-жёлтого цвета, затем добавили 2 капли раствора крахмала и титровали до исчезновения синей окраски. Содержание аминного азота рассчитывали по формуле [159]:

$$NH_2\% = \frac{0,28 \cdot V_m \cdot P \cdot V_k \cdot 100}{a \cdot b \cdot 1000}, \quad (4)$$

где, V_m - объем тиосульфата натрия 0,01 н., пошедший на титрование, мл; P – степень разбавления пробы в колбе на 100,0 мл; V_k - вместимость колбы для подготовки пробы к титрованию, мл; a - количество разбавленного образца для анализа, мл; b - объем фильтрата, мл [159]. Посевы термостатировали еще 18 часов в тех же условиях для оценки влияния состава среды на влажность и биосинтез виолацеина, так как было показано, что пигментация инициируется при высокой плотности клеток в культуре [128].

Содержание пигмента в концентрированном этилацетатном экстракте оценивали фотометрически с использованием спектрофотометра (Shimadzu, UV-1900i, Япония). Для этого, выросшую окрашенную культуру осаждали при 10000 об/мин в течение 15 минут. Надосадочную жидкость сливали, а массу промывали в стерильной дистиллированной воде. Повторно центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 минут, сливали и повторяли процедуру 3 раза. Измеряли влажную массу и ресуспендировали в 20,0 мл воды. Взвесь разливали в стерильные чашки Петри и замораживали в течение 12 часов. Замороженную культуру высушивали с использованием лиофильной сушки (АК5-4.0, ГК «ПрофЛаб», Россия). Режим включал в себя 4 этапа: 1. параметры этапа 1: давление в камере – 0,30 мбар; температура полок - -20°C ; длительность – 41 мин; 2. параметры этапа 2: давление в камере – 0,20 мбар; температура полок - 10°C ; длительность – 19 часов; 3. параметры этапа 3: давление в камере – 0,15 мбар; температура полок - 20°C ; длительность – 3 часа; 4. параметры этапа 4: давление в камере – 0,10 мбар; температура полок – 30°C ; длительность – 1 час.

Влажность лиофильно высушенной культуры *J. lividum* ВКМ В-3705D оценивали с использованием анализатора WBA-110M (WISD, Корея), высушивая до постоянной массы при температуре $60 \pm 0,15^{\circ}\text{C}$, согласно инструкции производителя.

2.10. Подготовка посевного материала *J. lividum* ВКМ В-3705D

Штамм активировали на агаризованной питательной среде с массовой долей пептона 3,0% в течение 18 часов при $25\pm 0,5^\circ\text{C}$. Суспендировали в 5000,0 мкл с использованием микробиологической петли в асептических условиях, и по 1000,0 мкл вносили в 100,0 мл жидкой среды. Процедуру повторяли четыре раза. Посевы инкубировали при $25\pm 0,5^\circ\text{C}$, перемешивая при 150 об/мин. На 8, 12, 27, 33 часы культивирования, соблюдая асептические условия, отбирали 2000,0 мкл полученного посевного материала и вносили в 200,0 мл свежей стерильной питательной среды. Термостатировали при $25\pm 0,5^\circ\text{C}$. Скорость перемешивания составляла 150 об/мин, а аэрации 500 мл/мин в течение 6 часов. На 0 и 6 час оценивали содержание амминного азота (в соответствии с формулой 4), $\lg\text{KOE}/\text{мл}$ (рассчитанного по формуле 2), оптическую плотность при длине волны $\lambda = 600$ нм (ОП_{600}) и рН. Удельный прирост (R) рассчитывали с использованием формулы 3. По наибольшему значению прироста судили о наиболее подходящей длительности культивирования посевного материала.

2.11. Культивирование штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D в биореакторной системе глубинным периодическим способом

Активную суточную культуру *J. lividum* ВКМ В-3705D суспендировали в стерильном физиологическом растворе, отбирали 1,0 мл и вносили в 100,0 мл жидкой питательной среды с массовой долей пептона 3,0% [153]. Посев термостатировали при $25\pm 0,5^\circ\text{C}$ и перемешивании 150 об/мин в течение 12 часов. Соблюдая асептические условия, отбирали 10,0 мл жидкой культуры *J. lividum* ВКМ В-3705D и вносили в подготовленную емкость биореакторной системы (Biocanvas LFD V1,5L, Centrion, Корея) с 990,0 мл стерильной питательной среды. Культивировали в течение 24 часов. Значения рН поддерживали на уровне $7\pm 0,15$, а содержание растворенного кислорода (DO) 70-80%, аэрируя при 0,5 – 3,0 л/мин. Перемешивали мешалкой с верхним приводом (в зависимости от показателя DO) со скоростью 200-900 об/мин и при температуре $25\pm 0,5^\circ\text{C}$ [128]. Процесс культивирования контролировали в

автоматическом режиме, с использованием программного обеспечения Mplus (Centrion, Корея).

Каждые 4 часа оценивали содержание влажной биомассы в 5,0 мл, численность $lgKOE/мл$ (рассчитанной с использованием формулы 2). Каждые 2 часа оценивали содержание аминного азота (с использованием формулы 4) и оптическую плотность при длине волны (λ) 600 нм. По окончании культивирования всю полученную культуру осаждали центрифугированием при 8000 об/мин в течение 15 минут. Надосадочную жидкость сливали, оценивали влажную массу осадка и высушивали, с использованием лиофильной сушилки.

Для изучения влияния увеличения объема питательной среды на характеристики роста штамм *J. lividum* ВКМ В-3705D культивировали в биореакторной системе (ФА-10, Россия) в периодическом глубинном культивировании. Использовали жидкую питательную среду с массовой долей пептона 3,0%, объемом 7000,0 мл. Суспензию активной культуры пересеивали в 100,0 мл жидкой среды и инкубировали в течение 12 часов при $25\pm 0,5^\circ C$ и перемешивании со скоростью 150 об/мин для активации. Полученный посевной материал объемом 70,0 мл, соблюдая меры асептики, вносили в 6930,0 мл среды в ёмкости биореактора. Культивировали при $25\pm 0,5^\circ C$, $pH = 7,0\pm 0,5$, при перемешивании 300 об/мин и аэрации 8,0 л/мин. Каждые 2 часа отбирали пробу и оценивали оптическую плотность ($ОП$) при 600 нм, содержание $lgKOE/мл$, влажной массы и аминного азота.

По окончании культивирования, всю полученную культуру осаждали центрифугированием (при 10000 об/мин в течение 10 минут) и высушивали, с использованием лиофильной сушилки в тех же условиях, что и для массы, полученной в 1000,0 мл среды.

Для оценки содержания пигмента, синтезируемого штаммом *J. lividum* ВКМ В-3705D, отбирали 1,0 г лиофилизата в трех повторах, в 20,0 мл дистиллированной воды. Гомогенизировали с использованием ультразвука, в течение 1,5 минуты (мощность составляла 100%, длительность обработки

составляла 3 секунды, а паузы – 2 секунды), затем остужали и смешивали с 40,0 мл этилацетата. Смесь перемешивали в течение 10 минут, давали расслоиться и отбирали верхнюю фракцию, содержащую пигмент. Нижнюю фракцию повторно смешивали с 40,0 мл этилацетата. Процедуру повторяли до её обесцвечивания. Полученный этилацетатный экстракт обезвоживали безводным сульфатом натрия в течение 12 часов и концентрировали в роторном испарителе при $80 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Полученный концентрат разбавляли этилацетатом до 50,0 мл, и оценивали концентрацию пигмента в 1000 мкл фотометрически (Shimadzu, UV-1900i, Япония), при $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и при длине волны $\lambda = 575$ нм, с использованием формулы [160]:

$$C = M \times \frac{A}{\varepsilon \times l}, \quad (5)$$

где: C - концентрация раствора, г/л; ε - молярный коэффициент экстинкции ($0,05601 \text{ мл} \cdot \text{мкг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$); l - толщина поглощающего слоя, см (1 см); A - оптическая плотность поглощающего вещества в растворе; M - молярная масса, г/моль (343,3 г/моль)

2.12. Расчет кинетических параметров роста штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D в условиях периодического глубинного культивирования в биореакторной системе

Используя исходные данные кривой роста, определяли логарифмическую фазу, с использованием удельного прироста численности $\lg\text{КОЕ/мл}$, и оптической плотности (ОП_{600}) [161]:

$$R = \frac{\text{ОП}_1 - \text{ОП}_0}{\text{ОП}_0}, \quad (6)$$

где, ОП_0 – оптическая плотность в начальный момент культивирования, а ОП_1 – на последующий час инкубации [161].

Скорость роста в логарифмической фазе рассчитывали по формуле [153]:

$$\mu_{\max} = \frac{(\lg(\text{КОЕ/мл})_1 - \lg(\text{КОЕ/мл})_0)}{\lg e(t_1 - t_0)}, \quad (7)$$

где $lg(KOE/мл)_0$ – численность колониеобразующих единиц (KOE) в 1 мл в момент начала логарифмической фазы, а $lg(KOE/мл)_1$ – на момент завершения [161].

Константу скорости деления клеток в логарифмической фазе роста рассчитывали по формуле [153]:

$$v = \frac{(lg(KOE/мл)_1 - lg(KOE/мл)_0)}{lg 2(t_1 - t_0)}, \quad (8)$$

где $lg(KOE/мл)_0$ – численность колониеобразующих единиц (KOE) в 1 мл в момент начала логарифмической фазы, а $lg(KOE/мл)_1$ – на момент завершения [161].

Параметр времени генерации колониеобразующей единицы рассчитывали по формуле [153, 161]:

$$g = \frac{1}{v}, \quad (9)$$

где, g – время генерации, v – константа скорости деления.

Длительность лаг-фазы (L) определяли графоаналитическим методом Лоджа и Хиншельвуда [161]. На полулогарифмическом графике зависимости $lgKOE/мл$ от времени экстраполировали прямую линию до уровня начальной биомассы и провели перпендикулярную линию из точки пересечения к оси абсцисс. Отрезок, отсекаемый на оси, соответствует длительности лаг-фазы. Расчеты проводили с использованием стандартных функций программы Excel (Microsoft, версия 2016 года США).

Используя рассчитанные кинетические параметры, составляли уравнение роста культуры по формуле [162]:

$$LgX_1 = \mu(t - L) + LgX_0, \quad (10)$$

где: X_1 – биомасса в определенный момент культивирования; μ – скорость роста культуры в логарифмической фазе роста; t – время культивирования; L – длительность лаг-фазы, X_0 – биомасса в начале культивирования.

Относительную погрешность измерения (ε), среднее квадратическое отклонение (σ), ошибку репрезентативности среднего арифметического

значения (m) и доверительные интервалы (Δ) рассчитывали с использованием формул 23...26.

2.13. Получение фракции виолацеина в диметилсульфоксиде из биомассы *J. lividum* ВКМ В-3705D

Лиофильно высушенную массу *J. lividum* ВКМ В-3705D, полученную в результате культивирования в 7000,0 мл среды, взвешивали и заливали изопропиловым спиртом из расчета 100,0 мл на 1,0 г взвеси. Смесь перемешивали в течении часа, фильтровали с использованием вакуума (диаметр пор фильтра – 0,1 мкм). Фильтрат повторно заливали изопропиловым спиртом и повторяли процедуру до осветления осадка.

Экстракт-сырец упаривали с использованием роторного испарителя, а концентрат собирали. Пигмент идентифицировали, с использованием качественной реакции. Для этого, к концентрированному экстракту по каплям приливали 10%-ную серную кислоту до появления зеленой окраски раствора [13]. Наличие примесей оценивали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием пластин (Sorbfil (100×100 мм), Краснодар, Россия). В качестве подвижной фазы выступала смесь ацетона с этилацетатом в соотношении 1:1. Структуру подтверждали с использованием методов ЯМР-спектроскопии по H^1 (Agilent 400 MHz NMR Magnet, Agilent Technologies, Inc., США).

Концентрат смешивали с дистиллированной водой в соотношении 1:10. Выдерживали при $25\pm 0,5^\circ C$ в течение 12 часов, давая пигменту выпасть в осадок. Взвесь фильтровали, высушивали на воздухе, взвешивали и растворяли в 100,0 мл 100% диметилсульфоксида (ДМСО).

2.14. Изучение антибактериальной активности *J. lividum* ВКМ В-3705D

Скрининг антибактериальной активности культуральной жидкости изолята проводили стандартными методами. О наличии эффективности судили по образованию зоны подавления роста тест-культуры. Для этого

штамм *J. lividum* ВКМ В-3705D предварительно выращивали в жидкой питательной среде 5/5. Осаждали центрифугированием (10000 об/мин, 10 мин) и полученную надосадочную жидкость, содержащую продукты метаболизма штамма и следы бактериальных клеток, использовали в эксперименте по определению антибактериальной активности. Далее на чашки Петри с плотной питательной средой 5/5 наносили по 100,0 мкл тест-культуры в экспоненциальной стадии роста и равномерно распределяли по всей поверхности чашки с помощью шпателя Дригальского. Стерильные диски из фильтровальной бумаги, смоченные культуральной жидкостью (5,0-7,0 мкл) выкладывали поверх исследуемой тест-культуры. Результаты оценивали через 24 часа культивирования при $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ по наличию зоны ингибирования роста вокруг бумажного диска. В случае наличия такой зоны судили об активности исследуемого штамма в отношении штамма тест-культуры.

Для оценки чувствительности штамма *Clavibacter michiganensis* ВКМ Ас-1402 к *J. lividum* ВКМ В-3705D использовали метод перпендикулярных штрихов, а также, видоизмененный метод Кирби-Бауэра [162], с использованием агаровых дисков (содержащих *J. lividum* ВКМ В-3705D) на агаризованной питательной среде с массовой долей пептона 3,0%.

Влияние штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D на прорастание *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 на дисках плода томата оценивали при совместном культивировании двух штаммов (500,0 мкл суспензии) на фрагментах плода в чашках Петри. Влажность поддерживали с использованием фильтровальной бумаги, пропитанной стерильной водой. В качестве контроля выступали посеvy чистых культур.

Характер взаимодействия между популяциями исследуемых культур *J. lividum* ВКМ В-3705D и *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 оценивали по изменению численности колониеобразующих единиц ($\lg\text{КОЕ/мл}$) при совместном культивировании.

Для этого по 100,0 мкл культуры, высевали методом серийных разведений в 0,9% растворе NaCl на агаризованную питательную среду в

начальном моменте (0 час), на 6, 12 и 24 час. Посевы инкубировали при $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение двух суток, считали количество проросших колоний [153]. В качестве контрольной группы выступали чистые культуры, культивируемые отдельно.

Колониеобразующие единицы ($\lg\text{KOE}/\text{мл}$) рассчитывали с использованием формулы 2. Логарифмическую фазу роста определяли по наибольшему параметру удельного прироста (R) в жидкой питательной среде по формуле 3. Скорость роста в логарифмической фазе рассчитывали по формуле 7. Константу скорости деления клеток в логарифмической фазе роста рассчитывали по формуле 8. Время генерации колониеобразующей единицы рассчитывали по формуле 9.

Для расчета степени ингибирования численности колониеобразующих единиц использовали формулу [163]:

$$IR = \left(\frac{\lg \text{KOE}/\text{мл}_K - \lg \text{KOE}/\text{мл}_O}{\lg \text{KOE}/\text{мл}_K} \right) \cdot 100\%, \quad (11)$$

где $\lg\text{KOE}/\text{мл}_K$ – десятичный логарифм колониеобразующих единиц (KOE) в 1 мл в контрольном варианте, а $\lg\text{KOE}/\text{мл}_O$ – в опытном.

Оценку чувствительности *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402 к фракции виолацеина проводили диско-диффузным методом. Для этого, раствор пигмента (концентрацией 28,4 мг/л, или 82,7 мкМ) в диметилсульфоксиде (ДМСО), разбавляли стерильной дистиллированной водой до конечной концентрации виолацеина, равной 9,19 мкМ и 4,86 мкМ. По 50,0 мкл полученного раствора наносили на стерильный бумажный диск (диаметром 10-11 мм) и размещали в чашке Петри на агаризованную питательную среду с массовой долей пептона 3,0%, в 3 повторах. Генеральная совокупность радиуса подавления составила 32 значения. В качестве контроля выступал водный раствор ДМСО без виолацеина в соответствующих разбавлениях.

Относительную погрешность измерения (ε), среднее квадратическое отклонение (σ), ошибку репрезентативности среднего арифметического значения (m) и доверительные интервалы (Δ) рассчитывали с использованием

формул 23...26. Достоверность различия усредненного радиуса зоны подавления роста культуры рассчитывали с использованием критерия Фишера (22).

Влияние фракции виолацеина в ДМСО на ростовые свойства тест-культуры определяли при культивировании в жидкой питательной среде [161]. Для этого, суточную культуру *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 суспендировали в стерильной воде и пассировали в 200,0 мл питательной среды (по 100,0 мкл суспензии). Исследуемые варианты фракции виолацеина в ДМСО в концентрациях 82,7 мкМ, 9,19 мкМ и 4,86 мкМ, вносили в количестве 0,05%, 0,1% и 0,15% от объема среды (об./об.). В качестве контрольного варианта выступали посеы *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 без исследуемых растворов, а для контроля действия экстрагента – ДМСО, разбавленный в тех же соотношениях, что и фракция. После засева измеряли исходную оптическую плотность при $\lambda = 600$ нм. Посевы инкубировали при перемешивании (150 об/мин) и при $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 24 часов и каждые 4 часа измеряли ОП [161].

Влияние на ростовые свойства культуры оценивали по степени ингибирования удельного прироста ОП культуры на 24 час инкубации по измененной формуле 11:

$$IR = \left(\frac{R_k - R_0}{R_k} \right) \cdot 100\%, \quad (12)$$

где R_k – удельный прирост ОП при $\lambda = 600$ нм в контрольном варианте, а R_0 – в опытном, и рассчитывается по формуле 6.

Генеральные параметры рассчитывали с использованием формул 23...26, а критерий достоверности различия – разностным методом.

Для изучения влияния фракции виолацеина на морфометрические свойства клеток 1,5 мл двухсуточной жидкой культуры *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 инкубировали в течение 10 мин при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ с чистым ДМСО, виолацеином в ДМСО, ДМСО, разбавленным деионизированной водой (82,7 мкМ, 9,19 мкМ и 4,86 мкМ). Все образцы были подготовлены в двух повторах [161].

По окончании инкубации клетки центрифугировали и промывали деионизированной водой. Затем 30,0 мкл смеси помещали на чистое предметное стекло и держали при комнатной температуре в течение пяти минут. Образцы дважды осторожно промывали деионизированной водой для удаления неадгезивных клеток, а затем сушили на воздухе [161].

Клетки измеряли на воздухе, при комнатной температуре сразу после высыхания мазка [161]. АСМ визуализацию проводили с помощью атомно-силового микроскопа NTEGRA Vita (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71; НТ-МДТ, Россия). Процесс сканирования проводился в режиме полуконтактной ошибки с частотой сканирования 0,8 Гц с использованием позолоченных преобразователей серии CSG11 (НТ-МДТ, Россия) с постоянной силой 1,1 Н/м, радиусом кривизны 10 нм и номинальной постоянной пружины 5,546 Н/м. Все снимки обработаны в программном обеспечении Nova (версия 1.0.26.1443, НТ-МДТ, Россия). Из каждого образца было отсканировано не менее 10 клеток [161].

Длину и высоту ячеек измеряли с помощью программных средств Nova. Для расчета шероховатости поверхности для каждой ячейки была отсканирована площадь поверхности мембраны 0,3 мкм x 0,3 мкм [161]. С помощью инструмента анализа шероховатости в программе Nova были рассчитаны значения средней арифметической шероховатости [161].

Объем (V , мкм³) и площадь поверхности (S , мкм²) ячеек измеряли с помощью программного обеспечения Gwyddion (версия 2.49, Чешский институт метрологии, Чехия) [161].

Для сравнения различий между группами использовали U-критерий Манна-Уитни [161].

2.15. Определение чувствительности *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D к штамму *J. lividum* ВКМ В-3705D при совместном культивировании

Чувствительность *Pseudomonas chlororaphis* ВКМ В-3546D к *J. lividum* ВКМ В-3705D оценивали с использованием метода перпендикулярных

штрихов на агаризованной питательной среде и при совместном культивировании в жидкой среде с массовой долей пептона 3,0%. О чувствительности к присутствию компаньона в жидкой питательной среде судили по изменению численности штаммов ($\lg KOE/мл$). В качестве контрольной группы выступали чистые культуры без штамма-компаньона.

Для этого культуры пассировали методом серийных разведений объёмом 100,0 мкл и считали количество проросших колоний при $25 \pm 0,5^\circ C$. Колониеобразующие единицы ($\lg KOE/мл$) рассчитывали с использованием формулы (2). Логарифмическую фазу роста определяли по наибольшему параметру удельного прироста (R) штаммов в жидкой питательной среде по формуле 3. Скорость роста в логарифмической фазе рассчитывали по формуле 7. Константу скорости деления клеток в логарифмической фазе роста рассчитывали по формуле 8. Время генерации колониобразующей единицы рассчитывали по формуле 9. Для расчета степени ингибирования численности колониобразующих единиц использовали формулу 11.

2.16. Изучение противогрибковой активности бактерии *J. lividum* ВКМ В-3705D

Противогрибковую активность виолацеинсинтезирующего штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D в отношении плесневых грибов *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864 и *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754 оценивали методом совместного культивирования [164] на агаризованной питательной среде Сабуро. При этом, суспензию клеток *J. lividum* ВКМ В-3705D, равной 0,1 оптической плотности (ОП), подготовленной с использованием Microscan Turbidity Meter (производство Siemens, США), вносили в агаровые лунки (в объёме 100,0 мкл на лунку), проделанных в плотной питательной среде стерильным пробочным сверлом диаметром 10-11 мм. Объём питательной среды в каждой чашке Петри составил 20,0 мл. В качестве контроля плесневые грибы культивировали без *J. lividum* ВКМ В-3705D.

В центр чашки Петри пассировали плесневый гриб методом отпечатка [4]. Посевы инкубировали при $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 5 суток. Каждые сутки измеряли диаметр колоний плесневого гриба в двух взаимоперпендикулярных направлениях.

Противогрибковую активность фракции виолацеина (в количестве 1,0%, 3,0% и 5,0% (об./об.)) в отношении тест-культур плесневых грибов определяли диско-диффузным методом [165]. Для этого, суспензию спор плесневого гриба, равной 0,1 оптической плотности при $\lambda = 600$ нм (Microscan Turbidity Meter, Siemens, США) пассировали «газоном» в чашки Петри, содержащие по 20,0 мл агаризованной питательной среды Сабуро. Стерильные бумажные диски («белая лента»), диаметром 9-10 мм, пропитывали 40,0 мл фракции виолацеина и размещали в чашках в 6 повторах. Посевы инкубировали в течении 72 часов при температуре $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$. По усредненным радиусам зон подавления роста плесневого гриба судили о противогрибковой активности виолацеина.

О влиянии виолацеина судили по снижению скорости роста и среднего прироста колонии плесневого гриба. Фракцию виолацеина вносили в агар (в объеме 1000,0 мкл на чашку). Объем питательной среды в каждой чашке Петри составлял 20,0 мл. В качестве контроля выступали посевы грибов без внесения фракции.

Средний прирост рассчитывали по формуле [157]:

$$X = (Lg G_{v+1} - l) \cdot 100\%, \quad (13)$$

где

$$Lg G_{v+1} = \frac{\sum Lg (V+1)}{n}. \quad (14)$$

Для расчета степени ингибирования использовали формулу 11 [163]:

$$IR = \left(\frac{K_k - K_o}{K_k} \right) \cdot 100\%, \quad (15)$$

где K_k – скорость роста культуры в контрольном варианте на момент окончания инкубации, а K_o – скорость роста в опытном варианте. Скорость роста колоний (K) находили по формуле:

$$K = \frac{S-S_0}{t-t_0}, \quad (16)$$

где, S_0 – средний квадратический диаметр колонии при первом измерении, S – средний квадратический диаметр колонии при последнем измерении, t_0 – время инкубации на момент первого измерения, t – время инкубации на момент последнего измерения [164]. Средний квадратический диаметр колонии рассчитывали с использованием формулы 1.

Достоверность различия сравниваемых групп рассчитывали с использованием разностного метода.

2.17. Изучение противогрибковой активности смеси штаммов *P.*

chlororaphis ВКМ В-3546D и *J. lividum* ВКМ В-3705D

Антимикробную активность *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D в присутствии штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D оценивали методом совместного культивирования бактерий и тест-культуры *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754 на агаризованной питательной среде Сабуро. Для этого, плесневый гриб пассировали в центре чашки Петри методом отпечатка, а по краям, по окружности, чашки вносили суспензию исследуемых культур в лунки (диаметр 10-11 мм) в объеме 50,0 мкл. В качестве контрольного варианта выступали посеы *A. unguis* ВКМ F-1754 без бактерий. Температура культивирования составляла $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$. О противогрибковой активности судили по отсутствию статистически значимого различия в усредненном диаметре колонии гриба в присутствии штаммов и их смеси с использованием параметра степени ингибирования скорости роста колонии, рассчитанных по формулам 13...16.

2.18. Изучение активности аденозинтрифосфатазы (КФ 3.6.1.3) в бесклеточном экстракте бактерии *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 в присутствии фракции виолацеина

Влияние фракции виолацеина в ДМСО на активность аденозинтрифосфатазы (АТФ-азы, АТФ-фосфогидролазы) КФ 3.6.1.3 (МЕ/мин) оценивали (табл. 2) по содержанию неорганического фосфата в реакционной смеси по окончании инкубации, содержащей АТФ в качестве субстрата для активности фермента [166]. Для этого штамм *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 культивировали в жидкой питательной среде в течение 7 суток. Культуру (20,0 мл) гомогенизировали с использованием ультразвука (УЗ-гомогенизатор) в течение 2 минут. При этом, мощность составляла 100,0%, максимально допустимая температура нагрева составляла $60 \pm 0,05^\circ\text{C}$, длительность воздействия – 15 секунд, а покоя – 5.

Гомогенизат центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 30 минут, удаляли надосадочную жидкость и приливали буфер 0,1 М Трис-НСl (рН = 7,0). Осадок суспендировали, концентрировали в 1,0 мл и повторно центрифугировали для снижения концентрации сопутствующих примесей. Надосадочную жидкость удаляли и повторно суспендировали осадок в 0,1 М Трис-НСl. Полученную суспензию использовали в качестве ферментного препарата.

Таблица 2. Обобщенная схема оценки влияния фракции виолацеина в ДМСО на активность аденозинтрифосфатазы (КФ 3.6.1.3) в бесклеточном экстракте бактерии *Clavibacter michiganensis* ВКМ Ас-1402

Процедура	Варианты	
	контроль	опыт
К 100,0 мкл ферментного препарата приливали 100,0 мкл фракции пигмента в ДМСО (82,7 мкМ, 9,19 мкМ и 4,86 мкМ)	-	+
К 100,0 мкл ферментного препарата приливали 100,0 мкл стерильной дистиллированной воды	+(контроль 1)	-
К 100,0 мкл ферментного препарата приливали 100,0 мкл ДМСО (82,7 мкМ, 9,19 мкМ и 4,86 мкМ)	+(контроль 2)	-
Инкубация при $37\pm 0,1^\circ\text{C}$ в течение 10 минут	+	+
100,0 мкл смеси ферментного препарата и исследуемого образца вносили в реакционную среду, содержащую 750,0 мкл 0,1 М Трис-НСl (рН = 7); 100,0 мкл бычьего сывороточного альбумина (БСА, 0,1 мг/мл); 100,0 мкл 0,1 М $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 50 мкл 0,01 М АТФ (MP Biomedicals, LLC, France).		
Выдерживали в течение 10 минут		
Останавливали реакцию внесением 100,0 мкл 10% додецилсульфата натрия (SDS)		
Высвобожденный фосфат в результате реакции определяли с использованием метода Кирсанова		
Оценивали генеральные параметры исходных данных		
Определяли активность фермента		

К 100,0 мкл ферментного препарата приливали 100,0 мкл фракции виолацеина в ДМСО (82,7 мкМ, 9,19 мкМ и 4,86 мкМ). В качестве контроля использовали стерильную дистиллированную воду и ДМСО, разбавленный в соответствии с опытными вариантами. Образцы инкубировали при $37\pm 0,1^\circ\text{C}$ в течение 10 минут.

По окончании инкубации, 100,0 мкл смеси ферментного препарата и исследуемого образца вносили в реакционную среду, содержащую 750,0 мкл 0,1 М Трис-НСl (рН = 7,0); 100,0 мкл бычьего сывороточного альбумина (БСА, 0,1 мг/мл); 100,0 мкл 0,1 М $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 50,0 мкл 0,01 М АТФ (MP Biomedicals, LLC, France). Выдерживали в течение 10 минут и останавливали реакцию внесением 100,0 мкл 10% додецилсульфата натрия (SDS). Высвобожденный фосфат в результате реакции определяли с использованием метода Кирсанова [161]. Для этого 6,0 г молибденовокислого аммония

растворяли в 200,0 мл дистиллированной воды при постоянном нагревании. После того, как раствор остыл, вносили 1,0 г аскорбиновой кислоты и давали настояться в течение 30 минут [161]. Полученный раствор в объеме 1,0 мл приливали к такому же количеству исследуемого образца, выдерживали в течение 15 минут и измеряли оптическую плотность при длине волны $\lambda = 710$ нм. В качестве холостой пробы выступала смесь молибденовокислого аммония с аскорбиновой кислотой без фосфатов [161]. Данные оптических единиц сравнивали со значениями для стандартного раствора KH_2PO_4 в концентрации 133,3 мкг/мл, 13,33 мкг/мл и 1,33 мкг/мл при той же длине волны [161].

Активность АТФ-азы ($\text{ME}/\text{мин}$) рассчитывали, как:

$$\text{ME}/\text{мин} = \frac{(C_P^1 - C_P^0)}{t_1 - t_0}, \quad (17)$$

где C_P^0 и C_P^1 - исходная концентрация, и на момент окончания реакции, неорганического фосфата, соответственно, мкг/мл, а t - продолжительность инкубации, мин.

Степень подавления активности рассчитывали с использованием формулы (11) как:

$$IR = \left(\frac{\text{ME}/\text{мин}_K - \text{ME}/\text{мин}_O}{\text{ME}/\text{мин}_K} \right) \cdot 100\%, \quad (18)$$

где $\text{ME}/\text{мин}_K$ - удельная активность фермента в контрольном варианте, а $\text{ME}/\text{мин}_O$ - в опытном.

Достоверность различия рассчитывали с использованием критерия достоверности Стьюдента и разностного метода.

2.19. Изучение ростовых свойств пшеницы яровой в присутствии бактерий в лабораторных условиях

Для оценки влияния исследуемых культур на всхожесть семян пшеницы яровой, получали активные культуры *J. lividum* ВКМ В-3705D, *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D на плотной агаризованной среде. Посевы инкубировали при $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 24 часов и засеивали в 100,0 мл стерильной жидкой

питательной среды. Инкубировали при $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ и с аэрацией в течение 24 часов.

Оценивали содержание колониеобразующих единиц выросших культур в жидкой питательной среде, высевом на агаризованные среды. Посевы инкубировали при $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 48 часов. Подсчитывали колонии и рассчитывали содержание *KOE/мл* с использованием формулы 2.

Каждое разведение, из расчета 10 мл/г, вносили в стерильный 0,9% раствор хлористого натрия с семенами по 100 штук. Выдерживали в течение 6 часов и ставили на проращивание. Затем семена проращивают в стерильных чашках Петри на фильтровальной бумаге в термостате при температуре $20\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, в соответствии с требованиями ГОСТ 12038-84. Учет прорастания семян осуществляют на 7-е сутки.

К числу всхожих семян относят те, которые дают росток и нормально развитый корешок. При этом, всхожесть рассчитывают с использованием формулы:

$$\text{Всхожесть} = \left(\frac{\text{количество проросших семян}}{\text{общее число семян}} \right) * 100\%. \quad (19)$$

Главный корешок по длине должен быть не меньше семени, а росток – не меньше половины семени.

Обработанные семена высаживали в грунт. Скорость роста надземной части рассчитывали с использованием адаптированной формулы 16:

$$K = \frac{X - X_0}{t - t_0}, \quad (20)$$

где, X_0 – среднее арифметическое значение длины надземной части на первые сутки, см, а X – на последние, см, t_0 и t – сутки выращивания, соответственно.

2.20. Изучение цитотоксической активности фракции виолацеина на примере линий клеток опухолей

Цитотоксичность фракции виолацеина в отношении клеток линий HeLa, Jurkat, Radji и TF-1 исследовали с помощью колориметрического теста МТТ, основанного на способности живых клеток превращать желтые растворимые

соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ) в фиолетовый нерастворимый формазан [168, 169].

Рабочий раствор МТТ готовили путем внесения 100,0 мг реагента МТТ «ПанЭко», Кат. №О104, серия 9WO12269 (Россия) в пробирку с 20,0 мл фосфатно-солевого буфера (5,0 мг/мл). Полученный раствор помещали в шейкер-инкубатор, оставляли при комнатной температуре на сутки для растворения. По окончании времени инкубации раствор фильтровали, используя шприцевой фильтр (диаметр пор 0,22 мкм), с целью стерилизации и удаления нерастворимого осадка. Раствор МТТ хранили при $-20 \pm 0,15^{\circ}\text{C}$ в защищенном от света месте.

Для проведения эксперимента готовили 100 мкМ, 250 мкМ, 500 мкМ, 750 мкМ и 100 мкМ растворы виолацеина, используя полную питательную среду ДМЕМ «ПанЭко» (Россия), конечная концентрация ДМСО в питательной среде при добавлении в лунки составляла менее 0,1% (об./об.) [170]. Стерилизовали раствор путем фильтрации (диаметр пор фильтра 0,22 мкм).

В качестве отрицательного контроля использовали ДМЕМ с добавлением 5,0% эмбриональной телячьей сыворотки, в качестве положительного контроля- 5,0% раствор ДМСО в полной питательной среде.

Клетки HeLa, растущие в культуральных флаконах, переводили из монослоя в суспензию, используя раствор трипсина-ЭДТА 0,25% «ПанЭко» (Россия), дезактивировали трипсин-ЭДТА равным объемом полной питательной среды. Полученную суспензию клеток переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали 5 минут при 1000 об./мин, после чего удаляли надосадочную жидкость. Осадок ресуспендировали в 4,0 мл полной питательной среды, подсчитывали число клеток с помощью автоматического счетчика клеток Scepter 2.0 «Millipore» (Германия).

Клетки Jurkat, Raji, TF-1 культивировали в среде RPMI «Биолот» (Россия). В среду для клеток добавляли 10% эмбриональную бычью сыворотку «Биолот» (Россия). Кратко: среда RPMI, содержащая 10% фетальной бычьей

сыворотки (FBS), в увлажненной атмосфере CO₂-инкубатора с воздушной рубашкой Panasonic «Sanyo» MCO-18AC-PE (Япония) при содержании CO₂ = 5,0%. Пассировали дважды в неделю.

Клетки в количестве 10⁴ клеток/лунку в 200,0 мкл среды помещали в лунки 96-луночного планшета (в 6 повторах для каждой из концентраций исследуемого вещества, положительного и отрицательного контролей). Лунки, заполненные полной питательной средой, использовали в качестве бланка.

Планшеты с клетками инкубировали в условиях CO₂-инкубатора (5,0% CO₂, 37±0,5°C, влажность 95,0%) в течение 72 часов. По окончании времени инкубации аспирировали среду из лунок планшета, вносили исследуемые вещества в необходимых концентрациях, в объеме 200,0 мкл/лунку. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор на 72 часа (5,0% CO₂, 37±0,5°C, влажность 95,0%).

По окончании времени инкубации клеток с исследуемыми растворами удаляли среду из лунок и заменяли ее на 200,0 мкл свежей среды. Вносили в каждую лунку по 20,0 мкл рабочего раствора МТТ и инкубировали в условиях CO₂-инкубатора в течение 2 часов. По окончании периода инкубации извлекали планшеты из CO₂-инкубатора, удаляли среду, добавляли в каждую лунку по 50,0 мкл раствора ДМСО, ставили планшеты в орбитальный шейкер на 30 минут при покачивании до растворения кристаллов формазана.

В случае Jurkat, Raji, TF-1, спустя 24 часа окрашивали 7-AAD в соответствии с протоколом, предоставленным производителем «BioLegend» (США). Оценка проводилась с помощью проточного цитометра CytoFLEX «Beckman Coulter» (США). Флуоресценция оценивалась в дальней красной области спектра (от 635 нм до 675 нм). Оценка результатов проводилась с помощью программного обеспечения CytExpert «Beckman Coulter» (США).

С помощью планшетного ридера Multiscan FC «Thermo Scientific» (Китай) и программного обеспечения SkanIt 3.1 определяли оптическую плотность растворов каждой лунки, содержащей клетки HeLa, при $l = 540$ нм и вычитали из показателей измеренное фоновое поглощение при $l = 620$ нм.

Жизнеспособность клеток рассчитывали по формуле [171]:

$$\text{Жизнеспособность (\%)} = \frac{(\text{ОП } \mathcal{E} - \text{ОП } \mathcal{B})}{(\text{ОП } \mathcal{K} - \text{ОП } \mathcal{B})} \times 100\%, \quad (21)$$

где $ОП$ – оптическая плотность (усл. ед.); \mathcal{B} – лунки с питательной средой (бланк); \mathcal{K} – лунки с необработанными клетками; \mathcal{E} – лунки с клетками, инкубированными в присутствии виолацеина.

Для расчета степени ингибирования использовали формулу [164]:

$$IR = \left(\frac{\text{Жизнеспособность}_{\mathcal{K}} - \text{Жизнеспособность}_{\mathcal{O}}}{\text{Жизнеспособность}_{\mathcal{K}}} \right) \cdot 100\%, \quad (22)$$

где $\text{Жизнеспособность}_{\mathcal{K}}$ - контрольный вариант на момент окончания инкубации, а $\text{Жизнеспособность}_{\mathcal{O}}$ - опытного варианта.

Эксперимент выполняли в трех повторах. Данные, полученные в результате проведения эксперимента, обрабатывали с использованием программного обеспечения Statistica 6.0. Средние арифметические значения оптической плотности экспериментальных групп представлены с учетом вычитания среднего арифметического значения бланка. Достоверность различий между выборками оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Значение концентрации, вызывающее 50% ингибирование роста популяции клеток (IC_{50}), определяли с помощью QuestGraph™ IC50 Calculator AAT «Bioquest, Inc».

2.21. Методы статистического анализа

В исследовании был использован ряд стандартных биометрических методов статистического анализа полученных данных для оценки их репрезентативности и достоверности различия между группами. Методы расчета были подобраны в результате оценки распределения выборки [157].

Доверительные интервалы (Δ) рассчитывали по формуле [157]:

$$\Delta = t_{st} \cdot m, \quad (23)$$

где t_{st} – стандартное значение критерия достоверности Стьюдента, m – ошибка репрезентативности среднего арифметического значения и вычисляется по формуле [157]:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \quad (24)$$

где σ – среднее квадратическое отклонение и рассчитывается как [157]:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(V-M)^2}{n-1}}, \quad (25)$$

где V – дата, M – среднее арифметическое значение $lgKOE/мл$, n – объем выборки.

Относительную погрешность измерения рассчитывали с использованием формулы [157]:

$$\varepsilon = \frac{m}{M} \cdot 100\%, \quad (26)$$

где M – среднее арифметическое значение, а m - ошибка репрезентативности среднего арифметического значения.

Погрешность считали несущественной если она была меньше 3,0%. Выше, но ниже 5,0% - удовлетворительной, а выше 5,0% - высокой.

Достоверность разницы между средними значениями, полученными в результате совместного культивирования штаммов, рассчитывали методом статистических различий [157].

Согласно методу, находили разницу (d) между исследуемыми вариантами. После, рассчитывали среднюю арифметическую разниц вариантов (\bar{d}). Из полученных данных высчитывали отношение $d - \bar{d}$. Суммировали, и использовали в расчёте среднеквадратического отклонения по формуле:

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum(d-\bar{d})^2}{n(n-1)}}, \quad (27)$$

где $\sum(d - \bar{d})^2$ – сумма квадратов разницы, n – выборка.

Полученное значение использовали в расчёте критерия достоверности Стьюдента по формуле:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_0)}{S_d}, \quad (28)$$

где $(\bar{x}_2 - \bar{x}_1)$ – разность средних арифметических сравниваемых групп, S_d – среднеквадратическое отклонение. Различие считали достоверным, если расчётный критерий достоверности превышал табличные значения.

Достоверность различия усредненного радиуса зоны подавления роста культуры рассчитывали с использованием критерия Фишера [157]:

$$F = \frac{(M_1 - M_2)^2}{\sigma_z^2} \frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2} \geq F_{st} \{v_1 = 1; v_2 = n_1 + n_2 - 2\}, \quad (29)$$

где M_1 и M_2 – средние арифметические двух сравниваемых выборок; n_1 и n_2 – численность сравниваемых выборок; σ_z^2 – варианса случайного разнообразия в однофакторном дисперсионном комплексе, составленных из двух изучаемых выборок, рассчитывается по формуле:

$$\sigma_z^2 = \frac{\Sigma(V_1 - M_1)^2 - \Sigma(V_2 - M_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}, \quad (30)$$

где V_1 и V_2 – значения радиуса зоны подавления роста; n_1 и n_2 – численность сравниваемых выборок.

Для расчета значимости различия между группами методом критерия Манна-Уитни (U -критерий), числовые значения сравниваемых выборок располагали в возрастающем порядке в один ряд, нумеровали члены общего ряда от 1 до $N = n_1 + n_2$ [157].

Для каждой из выборки, отдельно, находили сумму рангов (R_u) и определяли величины, которые отражают связь между суммами рангов двух выборок.

Для первой выборки:

$$U_1 = R_{u1} - \frac{n_1(n_1+1)}{2}, \quad (31)$$

Для второй выборки:

$$U_2 = R_{u2} - \frac{n_2(n_2+1)}{2}, \quad (32)$$

В качестве U -критерия использовали меньшую величину U которую сравнивали с табличным значением U_{st} .

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Идентификация аборигенного штамма пигментообразующей бактерии

Из реки Везёлка был выделен штамм бактерии, способный к биосинтезу пигмента. Культура обозначена как JF4. Молекулярно-генетическая идентификация штамма по гену 16S рРНК показала, что он с 95%-ной достоверностью относится к виду *Janthinobacterium lividum*. Последовательность 16S рРНК выделенного штамма была депонирована в GenBank *Janthinobacterium* sp. JF4 MW244020 [128]. Штамм был передан во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов под номером ВКМ В-3705D.

В ходе исследования изолята было выявлено, что колониеобразование у *J. lividum* ВКМ В-3705D на агаризованной питательной среде с массовой долей пептона 3,0% отчетливо наблюдали на вторые сутки инкубации при $25\pm 0,5^\circ\text{C}$ [128]. Колонии бесцветные, непрозрачные, гладкие, выпуклые, слабо пигментированные в центре (рис. 13. А). На третьи сутки инкубации появляется заметная сине-фиолетовая пигментация, колонии зернистые с фестончатым краем (рис. 13. Б). На четвертые сутки инкубации, пигментация колоний становится интенсивнее, структура зернистая, а край неровный (рис. 13. В). Пигментация недельной культуры ярко-выраженная сине-фиолетовая, колонии шероховатые, крупнозернистые, матовые, круглые с волнистым валиком по краю (рис. 13. Г). Профиль кратерообразный [128]. Отмечено выделение кристаллов метаболита, которые хорошо видны в просвете стереоскопического микроскопа МИКРОМЕД II (рис. 13. В).

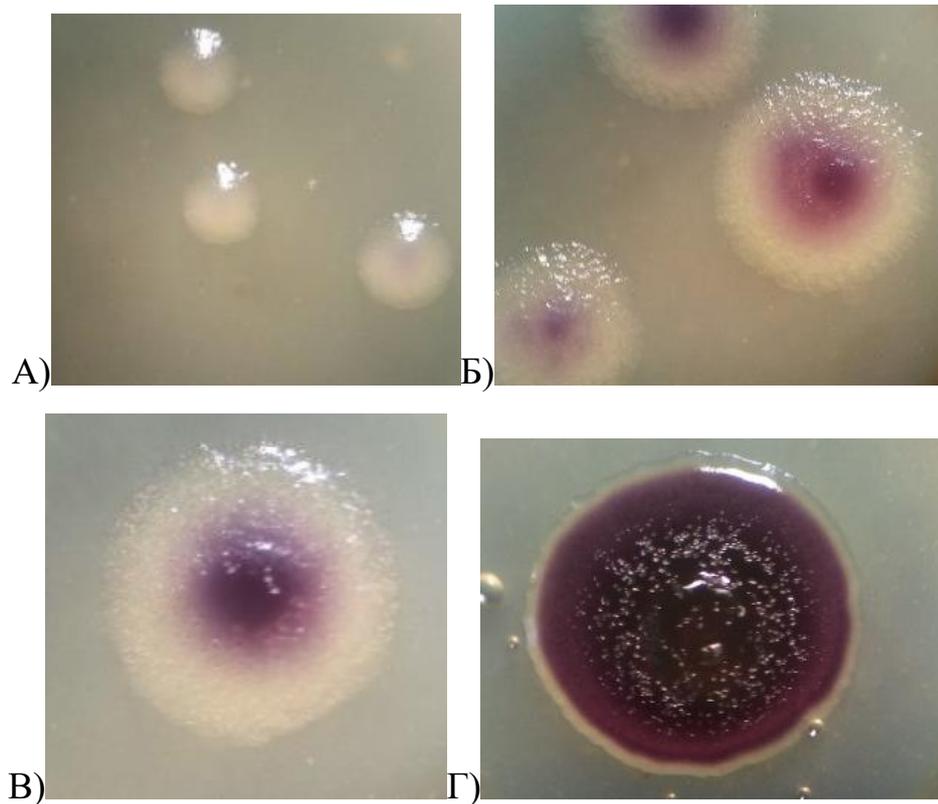


Рисунок 14. Колонии *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D, выросшие при $25\pm 0,5^\circ\text{C}$ на агаризованной питательной среде при увеличении $\times 10$, где: А) вторые сутки инкубации; Б) третьи сутки инкубации; В) четвертые сутки инкубации; Г) седьмые сутки инкубации.

Среднеквадратический диаметр колоний на четвертые сутки инкубации составил 1,93 мм, несколько увеличившийся при дальнейшей экспозиции. В жидкой питательной среде, на вторые сутки инкубации, образуется пигментированное кольцо обрастания культурой на границе раздела фаз.

Известно, что представители бактерий рода *Chromobacterium* на твердых питательных средах образует маслянистые, гладкие или шероховатые пигментированные колонии, в зависимости от вида (табл. 3), и в жидких средах образуют фиолетовое кольцо по стенке сосуда у поверхности жидкости [7].

Таблица 3. Дифференцирующие признаки штамма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D и других представителей виолацеин-синтезирующих бактерий

Свойства	Сравниваемые культуры						
	<i>Janthinobacterium lividum</i> ВКМ В-3705D	<i>Chromobacterium</i> [16, 110-117, 128, 143]	<i>Iodobacter</i> [118-120, 128]	<i>Janthinobacterium</i> [121-128]	<i>Duganella</i> [128-130]	<i>Collimonas</i> [131, 132]	<i>Massilia</i> [133-136]
Образование пигмента	+	+	+	+	+	+	+
Колонии:							
Круглая с фестончатым краем	+	-	-	-	-	ND	ND
Круглая с валиком по краю	+	-	-	-	-	ND	ND
Профиль колоний	кратерообразный	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Край колоний	волнистый	ND	ND	ND	ND	ND	ND
гладкие		+	-	-	-	ND	ND
шероховатые	+	+	-	-	+	ND	ND
выпуклые	+	-	-	+	+	ND	ND
Структура	Крупнозернистая	ND	ND	ND	ND	ND	ND
маслянистая консистенция	-	+	+	-	-	ND	ND
вязкие	+	-	-	-	+	ND	ND
Среднеквадратический диаметр колоний, мм	1,93	ND	10	ND	ND	ND	ND
Форма клеток	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки
Расположены:							
одиночно	+	+	+	+	ND	-	ND
в парах	+	+	+	+	ND	+	ND
в цепочках	+	+	+	+	ND	-	ND
Окраска по Граму	Грам-	Грам-	Грам-	Грам-	Грам-	Грам-	Грам-
Образование спор	-	-	-	-	-	-	-
Подвижность	+	+	+	+	+	+	+

(продолжение таблицы 3)

Свойства	Сравниваемые культуры						
	<i>Janthinobacterium lividum</i> ВКМ В-3705D	<i>Chromobacterium</i> [16, 110-117, 128, 143]	<i>Iodobacter</i> [118-120, 128]	<i>Janthinobacterium</i> [121-128]	<i>Duganella</i> [128-130]	<i>Collimonas</i> [131, 132]	<i>Massilia</i> [133-136]
Отношение к O ₂	аэробные	факультативно анаэробные	факультативно анаэробные	аэробные	аэробные	аэробные	аэробные
Способность к росту при 4°C	+	-	+	+	-	-	-
Оптимальная температура роста	20-25°C	30-35°C	25°C	25°C	28-37°C	20-30°C	ND
Оптимальные значения pH	7-8	7-8	4-5	7-8	7-7,5	6,5	ND
Рост при 6%, и более, NaCl	-	ND	-	-	-	ND	ND
Рост при 1% NaCl	+	+	+	+	-	ND	+
Рост при 3% NaCl	-	ND	-	-	-	ND	+
Рост при 4% NaCl	-	ND	-	-	-	ND	-
Требования к факторам роста	-	-	-	-	-	ND	ND
Оксидаза	-	+	-	+	+	+	-
Каталаза	+	+	ND	+	+	- или слаб	+
Индол	-	-	-	-	-	ND	ND
Уреаза	-	ND	-	ND	+	ND	-
Лецитиназа	-	+	+	-	-	ND	ND
Липаза	-	-	-	-	+	+	ND
β-галактозидаза	-	ND	-	ND	-	ND	
аргининдигидролаза	-	ND	ND	ND	-	ND	+
лизиндекарбоксилаза	-	ND	-	ND	ND	ND	ND
орнитиндекарбоксилаза	-	ND	-	ND	ND	ND	ND
триптофандеаминаза	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND

(продолжение таблицы 3)

Свойства	Сравниваемые культуры						
	<i>Janthinobacterium lividum</i> ВКМ В-3705D	<i>Chromobacterium</i> [16, 110-117, 128, 143]	<i>Iodobacter</i> [118-120, 128]	<i>Janthinobacterium</i> [121-128]	<i>Duganella</i> [128-130]	<i>Collimonas</i> [131, 132]	<i>Massilia</i> [133-136]
Образование ацетона (реакция Фогес-Проскаура)	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Образование аммиака из пептона	+	-	ND	+	ND	ND	ND
Образование H ₂ S	-	-	-	ND	-	ND	ND
Фосфатазная активность	+	ND	ND	+	ND	ND	ND
Гидролиз:							
крахмала	-	-	+	-	+		+
казеина	+	+	ND	+	+		ND
желатина	-	+	+	+	+		+
Утилизация:							
цитратов	+	ND	ND	+	ND	ND	-
глицерина	+	-	-	ND	-	ND	ND
эритритола	-	ND	ND	ND	-	ND	ND
D-арабинозы	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-арабинозы	+	-	-	+	ND	ND	+
D-рибозы	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D-ксилозы	+	-	-	+	+	ND	+
L-ксилозы	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D-адонитола	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
метил-βD-ксилопиранозид а	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D-галактозы	+	-	-	+	+	ND	-
D-глюкозы	+	ND	ND	+	+	ND	-
D-фруктозы	+	ND	ND	+	-	ND	-
D-маннозы	+	+	+	+	ND	ND	ND
D-сорбозы	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-рамнозы	-	ND	ND	ND	ND	ND	+
дульцитолола	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
инозита	+	ND	ND	+	ND	+	ND
D-маннита	+	ND	ND	+	+	ND	ND
D-сорбита	+	ND	ND	+	ND	ND	ND
метил-αD – маннопиранозид а	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND

(продолжение таблицы 3)

Свойства	Сравниваемые культуры						
	<i>Janthinobacterium lividum</i> ВКМ В-3705D	<i>Chromobacterium</i> [16, 110-117, 128, 143]	<i>Iodobacter</i> [118-120, 128]	<i>Janthinobacterium</i> [121-128]	<i>Duganella</i> [128-130]	<i>Collimonas</i> [131, 132]	<i>Massilia</i> [133-136]
метил- α D – глюкопиранозид а	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
N-цетилглюкозамина	+	ND	ND	ND	+	ND	ND
амигдалина	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
арбутина	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
эскулина (Железа-цитрата)	+	-	-	ND	ND	ND	ND
салицина	-	-	-	ND	+	ND	ND
D-целлобиозы	-	-	-	ND	+	ND	+
D-мальтозы	+	+	+	+	+	ND	+
D-лактозы(бычья)	-	ND	ND	+	+	ND	+
D-мелибиозы	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D-сахарозы	+	-	-	+	ND	ND	-
D-трегалозы	-	+	+	-	ND	+	ND
инулина	-	ND	ND	+	ND	ND	ND
D-мелецитозы	-	ND	ND	-	ND	ND	ND
D-раффинозы	-	ND	ND	-	ND	ND	ND
амидона (крахмала)	-	ND	ND	-	ND	ND	ND
гликогена	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ксилита	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
гентиобиозы	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D-туранозы	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D-ликсозы	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D-тагатозы	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D-фукозы	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-фукозы	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D-арабита	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-арабита	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
калия глюконата	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND

(продолжение таблицы 3)

Свойства	Сравниваемые культуры						
	<i>Janthinobacterium lividum</i> ВКМ В-3705D	<i>Chromobacterium</i> [16, 110-117, 128, 143]	<i>Iodobacter</i> [118-120, 128]	<i>Janthinobacterium</i> [121-128]	<i>Duganella</i> [128-130]	<i>Collimonas</i> [131, 132]	<i>Massilia</i> [133-136]
калия 2-кетоглюконата	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
калия 5-кетоглюконат	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Примечание:

- отсутствие признака;

+ признак обнаружен;

ND – признаки не обнаружены в литературе.

В ходе исследования резистентности штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D к антибиотикам (табл. 4) диско-диффузным методом выявлено, что штамм чувствителен к большинству коммерческих препаратов, принадлежащих к различным группам [128].

Для бактерий рода *Iodobacter* характерно образование на питательных средах тонких морщинистых распространяющихся колоний в диаметре 1 см и более. Консистенция маслянистая (табл. 3). Пигментация начинается от центра колонии. На жидкой питательной среде, представители образуют фиолетовое кольцо, как и бактерии рода *Chromobacterium*. В свою очередь, колонии представителей рода *Janthinobacterium* на твердых питательных средах слегка выпуклые в центре, округлые и фиолетового цвета (табл. 3). На поверхности жидкой среды также образуют фиолетовое кольцо по стенке сосуда. Образующие пигмент сине-фиолетового цвета представители рода *Duganella* на агаризованной питательной среде образуют морщинистые, немного кожистые колонии (табл. 3), тогда как в жидкой наблюдается хлопьевидной осадок.

Таблица 4. Устойчивость штамма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D к антибиотикам

№ п/п	Антибиотик	Концентрация	<i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D
1.	Амикацин	30мкг	+ 15 мм
2.	Амоскициллин	20мкг	+ 5 мм
3.	Ампициллин	10мкг	–
4.	Бацитрацин	10ед	+ 2 мм
5.	Бацитрацин	0,04ед	–
6.	Бензилпенициллин	10ед	–
7.	Ванкомицин	30мкг	+ 3 мм
8.	Гентамицин	10мкг	+ 4 мм
9.	Гентамицин	120мкг	+ 16 мм
10.	Имипенем	10мкг	–
11.	Канамицин	30мкг	+ 6 мм
12.	Карбенициллин	25мкг	+ 9 мм
13.	Карбенициллин	100мкг	+ 10 мм
14.	Левомецитин	30мкг	+ 10 мм
15.	Линкомицин	15мкг	+ 2 мм
16.	Меропенем	10мкг	–
17.	Налидиксовая кислота	30мкг	+ 15 мм
18.	Неомицин	30мкг	+ 6 мм
19.	Нистатин	80ед	+ 5 мм
20.	Новобиоцин		+ 1 мм
21.	Норфлоксацин	10мкг	+ 3 мм
22.	Оксациллин	10мкг	–
23.	Оксациллин	1мкг	–
24.	Офлоксацин	5мкг	+ 17 мм
25.	Пиперациллин	100мкг	+ 11 мм
26.	Полимксин	300ед	+ 3 мм
27.	Рифампицин	5мкг	+
28.	Стрептомицин	30мкг	+ 3 мм
29.	Стрептомицин	300мкг	+ 8 мм
30.	Тетрациклин	30мкг	+ 5 мм
31.	Тобралицин	10мкг	+ 11 мм
32.	Триметоприм/сульфаметоксазол	1,25/23,75мкг	+ 17 мм
33.	Фуразолидон	300мкг	+ 17 мм
34.	Цефазолин	30мкг	–

(продолжение таблицы 4)

№ п/п	Антибиотик	Концентрация	<i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D
35.	Цефотаксин	30мкг	+ 10 мм
36.	Цефтазидин	30мкг	–
37.	Ципрофлоксацин	5мкг	+ 12мм
38.	Эритромицин	15мкг	+ 4 мм

– отсутствие роста штамма (чувствительность к антибиотику)

+ рост штамма (устойчивость к антибиотику), цифрами обозначено диаметр зоны просветления вокруг диска антибиотика.

Таким образом, исходя из литературных данных, культуральные свойства *J. lividum* ВКМ В-3705D в жидкой питательной среде сходны с *Chromobacterium* sp., *Iodobacter* sp. и *Janthinobacterium* sp., так как они образуют фиолетовое кольцо по стенке сосуда на границе раздела фаз. Однако, культуральные свойства колоний *J. lividum* ВКМ В-3705D на агаризованной питательной среде соответствуют роду *Janthinobacterium* выпуклостью в центре и округлой формой. Однако для *J. lividum* ВКМ В-3705D характерно образование вязкой, слегка кожистой консистенции, что свойственно для представителей рода *Duganella*. Замечено, что интенсивность пигментации колоний *J. lividum* ВКМ В-3705D в процессе инкубации изменяется. Это может быть связано с увеличением плотности популяции в культуре [128].

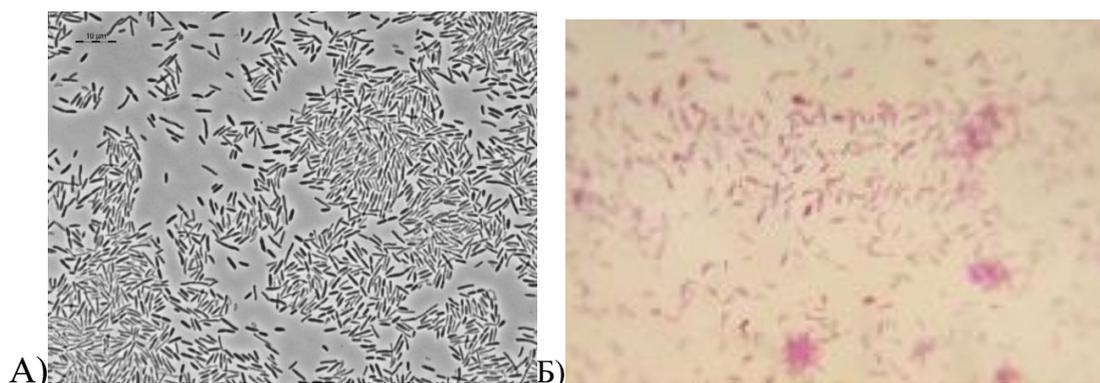


Рисунок 15. Микроскопия препарата *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D (А); окраска по Граму препарата изолята пигментообразующих микроорганизмов с использованием иммерсионной микроскопии (Б).

В ходе исследований выявлено, что *J. lividum* ВКМ В-3705D представлены аэробными грамотрицательными подвижными палочками, располагающиеся одиночно, в парах или в коротких цепочках (рис. 15). Наружняя и цитоплазматическая мембраны, муреин, а также нуклеод выявлены на ультратонком срезе клетки штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D методом трансмиссионной электронной микроскопии (рис. 16). Изучение физиолого-биохимических особенностей изолята позволяют сделать вывод о том, что, они каталазоположительные, образуют цитохромоксидазу, гидролизуют казеин [128]. На питательной среде с пептоном (3,0%) не образуют индол, но выделяют аммиак. Сероводород не выделяется. Уреаза, липазу и лецитиназу не синтезируют, гидролизует казеин, но не крахмал. Штамм не способен разжижать желатин, но способен утилизировать цитраты (табл. 3). В ходе анализа не обнаружено активности β -галактозидазы, аргининдигидролазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы и триптофандеаминазы. Не образуют ацетоин [128].

Признаки выделенного штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D сходны с представителями рода *Chromobacterium*, а именно, окраской по Граму, подвижностью, формой, концами и расположением клеток. Они оксидазоположительные и индолотрицательные [128]. Однако *J. lividum* ВКМ В-3705D отличается от *Chromobacterium* sp. такими признаками, как отношение к кислороду, способность к гидролизу желатина и лецитиназной активностью. Сходство штамма с представителями рода *Iodobacter* проявляется в окраске по Граму, формой и расположением клеток, отсутствием оксидазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы и β -галактозидазы, не гидролизует крахмал [128]. В то же время, штамм *J. lividum* ВКМ В-3705D отличается лецитиназной активностью, отношением к кислороду и подвижностью (табл. 3).

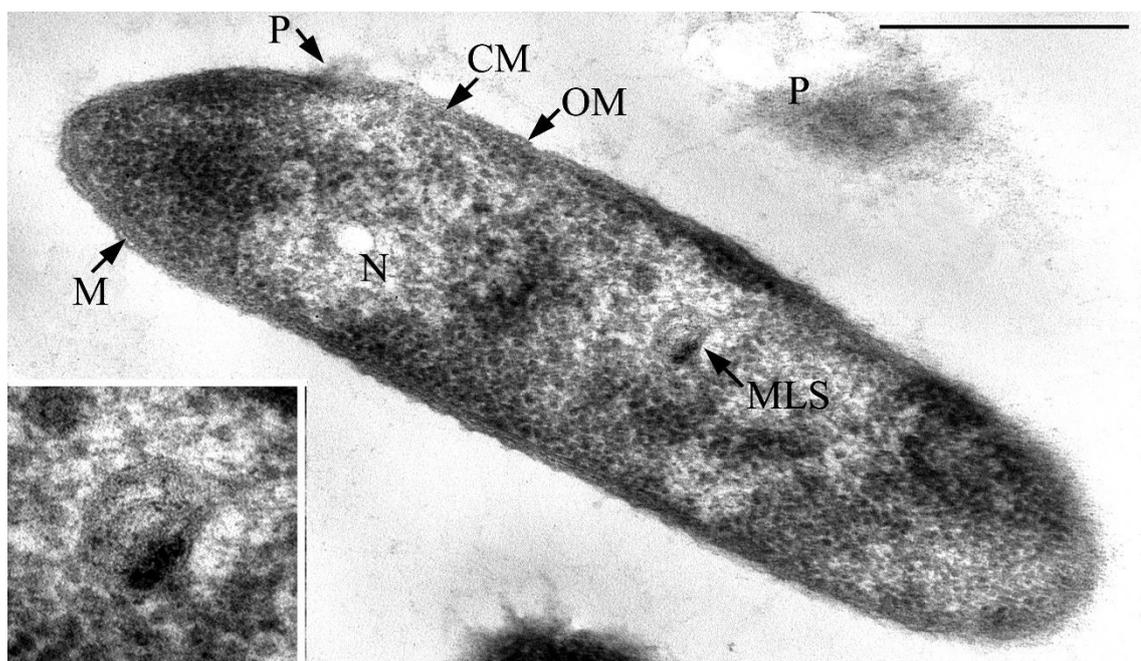


Рисунок 16. Трансмиссионная электронная микроскопия. Ультратонкий срез клетки штамма *J. lividum* VKM B-3705D. Вставка в левом нижнем углу рисунка представляет собой увеличенный фрагмент цитоплазмы клетки с мембраноподобной структурой (MLS). Обозначения: CM - цитоплазматическая мембрана; OM - наружная мембрана; M - муреин; MLS - мембраноподобные структуры; N - нуклеоид; P - остатки модифицированного после препарирования пигмента. Масштабная линейка = 0,5 мкм.

Признаки выделенного изолята сходны с *Janthinobacterium* [128] формой и расположением клеток, окраской по Граму, отношением к кислороду, отсутствием способности к образованию индола и лецитиназы, способностью использовать цитрат, наличием каталазы и оксидазы. При культивировании в жидком пептоне образуют аммиак. Исследуемый изолят сходен с пигментообразующими бактериями рода *Duganella* окраской по Граму, формой и расположением клеток, подвижностью, отношением к кислороду, способностью к образованию каталазы, к гидролизу казеина и неспособностью образовывать индол (табл. 3). Однако представители рода *Duganella* гидролизуют крахмал и желатин, образуют липазу (табл. 3). Таким

образом, изолят *J. lividum* ВКМ В-3705D сильно отличается от представителей рода *Duganella*. В то же время он сходен своими признаками с бактериями родов *Collimonas* и *Massilia* только формой клеток, подвижностью, окраской по Граму, наличием каталазы и отношением к кислороду (табл. 3) [128].

Результаты анализа данных по изучению углеводного метаболизма исследуемого штамма с применением тестов API 50CH показали, что штамм [128] способен утилизировать широкий ряд субстратов (табл. 3), а именно, глицерин, L-арабинозу, D-рибозу, D-ксилозу, D-галактозу, D-глюкозу, D-фруктозу, D-маннозу, инозит, D-маннит, D-сорбит, N-глюкозамин, эскулин, D-мальтозу, D-сахарозу, ксилит, D-ликсозу, D-арабит и калия 2-кетоглюконат. В свою очередь, эритритол, D-арабинозу, L-ксилозу, D-адонитол, метил- β D-ксилопиранозид, D-сорбозу, L-рамнозу, дульцитол, метил- α D-маннопиранозид, метил- α D-глюкопиранозид, амигдалин, арбутин, салицин, D-целлобиозу, D-лактозу (бычью), D-мелибиозу, D-трегалозу, инулин, D-мелецитозу, D-раффинозу, амидон, гликоген, гентиобиозу, D-туранозу, D-тагатозу, D-фукозу, L-фукозу, L-арабит, калий глюконат и калий 5-кетоглюконат не утилизируют (табл. 3). При сравнении полученных данных с литературными для рода *Chromobacterium* выявлено сходство в отношении D-маннозы и салицина, тогда как способность к утилизации глицерина, L-арабинозы, D-ксилозы, D-галактозы, эскулина, D-сахарозы и D-трегалозы оказалась различной (табл. 3). Другие признаки в источниках не обнаружены. Данные о способности к утилизации веществ для бактерий рода *Iodobacter* показали аналогичный результат (табл. 3). Изолят *J. lividum* ВКМ В-3705D способен утилизировать цитраты, L-арабинозу, D-ксилозу, D-галактозу, D-глюкозу, D-фруктозу, D-маннозу, инозит, D-маннит, D-сорбит, D-мальтозу, D-сахарозу, D-трегалозу, D-мелицитозу, D-раффинозу, крахмал, тогда как различаются в отношении инулина и D-лактозы (табл. 3). Другие исследуемые признаки не приведены в источниках. Общим для *J. lividum* ВКМ В-3705D и представителями *Duganella* sp. оказалась способность к утилизации эритрола, D-ксилозы, D-галактозы, D-глюкозы, D-маннита, N-ацетилглюкозамина, D-

мальтозы, но они различны в отношении способности к утилизации глицерина, D-фруктозы, салицина, D-целлобиозы, D-лактозы. Большая часть исследованных признаков *J. lividum* ВКМ В-3705D не приведена в литературе для *Duganella* sp. Исходя из литературных данных, для бактерий рода *Collimonas* и *Massilia* множество определяемых свойств *J. lividum* ВКМ В-3705D не приведено, тем не менее, есть данные о том, что изолят и представители *Collimonas* sp. сходны способностью к утилизации инозита, но различны в отношении D-трегалозы (табл. 3), тогда как *J. lividum* ВКМ В-3705D сходны с *Massilia* sp. способностью к утилизации L-арабинозы, D-ксилозы, D-мальтозы, но различны в отношении цитратов, D-галактозы, D-глюкозы, D-фруктозы, L-рамнозы, D-целлобиозы, D-лактозы и D-сахарозы.

Клетки штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D растут в диапазоне температур 4-28°C с оптимумом при 20±0,5°C, что позволило отнести его к факультативно психрофильному организму (табл. 3). Указанный температурный диапазон роста характерен для большинства выделенных с поверхности кожи лягушки штаммов. Среди бактерий, способных образовывать пигмент сине-фиолетового цвета при 4±0,5°C могут расти представители *Iodobacter* spp. и *Janthinobacterium* sp., тогда как диапазон оптимальной температуры варьирует [128].

Выявлено, что *J. lividum* ВКМ В-3705D способен расти в присутствии в среде NaCl в концентрации до 2,0%, с повышением концентрации рост не наблюдался (табл. 3). При концентрациях NaCl выше 2,0% способны расти представители рода *Massilia* (3,0%, но не при 4,0%). Бактерии *Iodobacter* sp., *Janthinobacterium* sp., *Duganella* sp. не растут при концентрациях NaCl выше 1,0%. В свою очередь, данные для *Chromobacterium* sp., *Collimonas* sp. не приведены в литературе.

Таким образом, в ходе изучения признаков выделенной пигментсинтезирующей бактерии было выявлено около 40 признаков, которые не приводятся в научной литературе. Методами молекулярно-генетического анализа гена 16S рРНК изолят был идентифицирован как

Janthinobacterium lividum. Штамм способен к росту при низких температурах, от $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Вместе со способностью использовать казеин, бактерии *J. lividum* являются одной из причин порчи молока при низкотемпературном хранении. В то же время *J. lividum* ВКМ В-3705D может выступать в качестве продуцента протеолитических ферментов [128].

3.2. Подбор состава питательной среды

В ходе подбора состава питательной среды было выявлено, что наибольшее значение удельного прироста (R) культуры в жидкой питательной среде – 3,0% пептона, без дополнительных компонентов. Значение составило 34,4%, что существенно больше, чем для 1,0% пептона. Различие между численностью культуры в средах с содержанием пептона 1,0% и 3,0% оказалось статистически достоверным, так как расчетное значение критерия Стьюдента превысило табличное ($t = 2,764 > t_{st} = 2,447$).

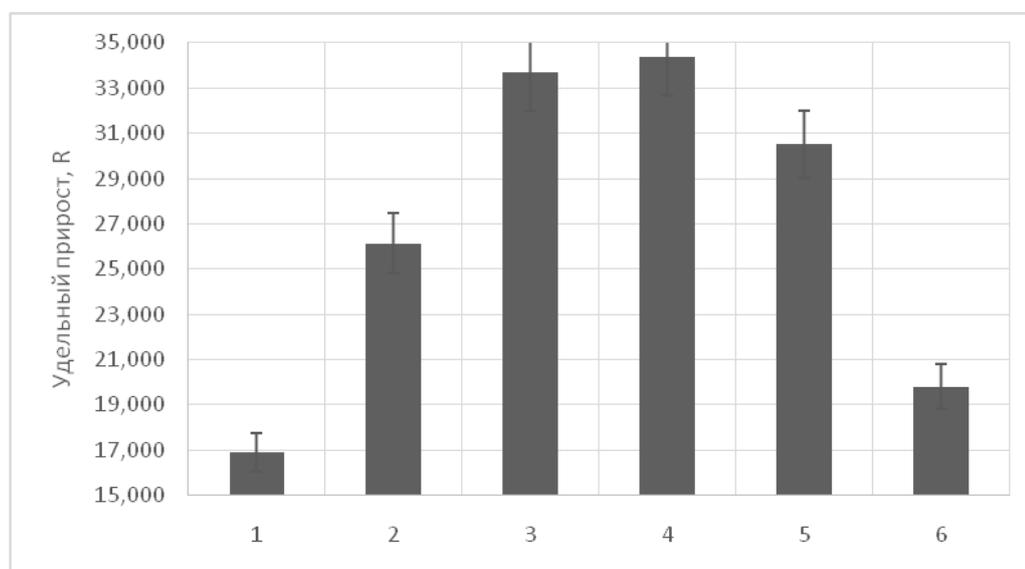


Рисунок 17. Удельный прирост культуры *J. lividum* ВКМ В-3705D в стандартной жидкой питательной среде NB (1); LB (2); 1,0% пептон (3); 3,0% пептон (4); Сабура (5); Кинга Б (6).

В ходе оценки генеральных параметров средней арифметической, было выявлено, что относительные погрешности измерения (ε) численности

бактерии ниже 1,0% (табл. 5). В качестве ростовой среды был выбран состав с массовой долей пептона 3,0%.

Таблица 5. Удельный прирост *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D (*R*) как показатель подбора питательной среды

Варианты	Удельный прирост <i>R</i> , %	Среднее квадратическое отклонение, σ	Относительная погрешность измерения, ϵ , %
Среда NB	16,9	0,052	0,35
Среда LB	26,14	0,016	0,10
Среда 1,0% Пептон	33,7	0,014	0,08
Среда 3,0% Пептон	34,4	0,013	0,07
Среда Сабуро	30,5	0,018	0,10
Среда Кинга Б	19,8	0,082	0,53

Выявлено, что во всех вариантах влажность лиофилизата составляла от 6,15% до 6,26%.

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

В ходе исследования выявлено, что бактерия *J. lividum* ВКМ В-3705D, инкубируемая в течение 8 часов, характеризуется наибольшим значением удельного прироста (*R*) *lgKOE/мл* (рис. 18). При этом значения относительных погрешностей измерений не превышают 2,0%. Можно предположить, что результаты получены с высокой достоверностью.

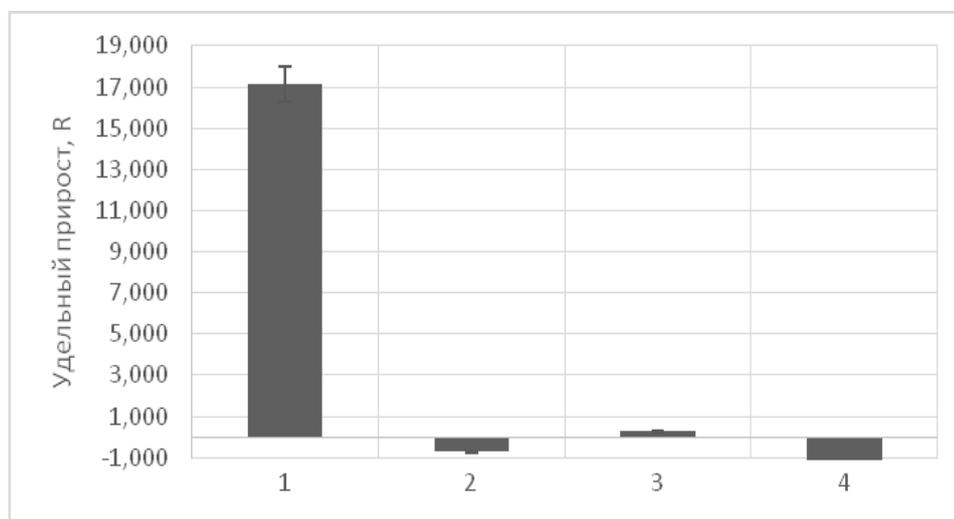


Рисунок 18. Удельный прирост (R) $lgKOE/мл$ культуры *J. lividum* ВКМ В-3705D, как показатель жизнеспособности бактерий в посевном материале на момент посева (время инкубации посевного) в среду, где 1 – 8 час; 2 – 18 часов; 3 – 27 часов; 4 – 33 часа

В соответствии с полученными результатами было принято решение не использовать посевной материал старше 12 часов в качестве инокулята.



Рисунок 19. Иллюстрация культивирования в биореакторной системе, с 1000,0 мл (А) и 7000,0 мл (Б) жидкой культуры *J. lividum* ВКМ В-3705D

Выявлено, что *J. lividum* ВКМ В-3705D при культивировании в объеме 1000,0 мл (рис. 20. А), показал наибольший удельный прирост (R) в диапазоне от 6 до 12 часов (рис. 21. А) инкубации. Наибольшая убыль аминного азота в среде (75,0%) приходится на 12 час культивирования (рис. 21. Б).

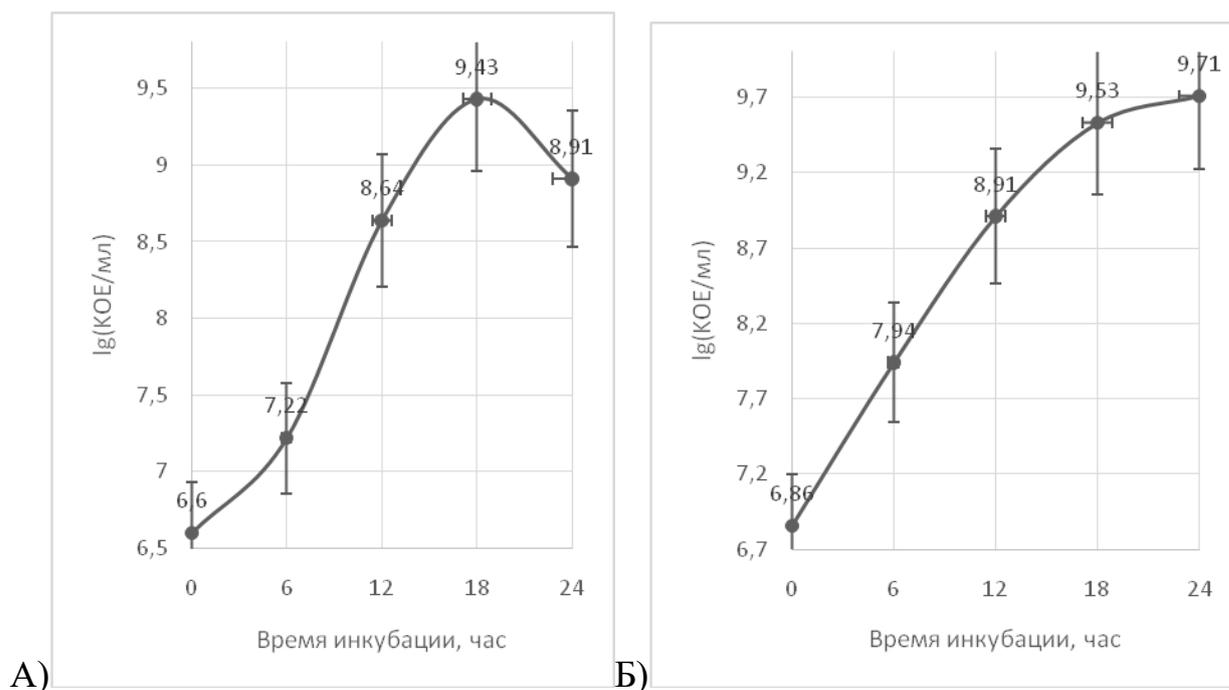


Рисунок 20. Кривые роста культуры *J. lividum* ВКМ В-3705D в биореакторной системе при периодическом глубинном культивировании в 1000,0 мл (А) и 7000,0 мл (Б) жидкой среды

Стоит отметить, что концентрация аминного азота в среде по мере культивирования возрастает (рис. 21. Б). Причины такого явления требуют дополнительного исследования. Предположительно, это может быть связано с достижением метаболического равновесия. Минимальное значение аминного азота на 12 час может быть пороговым показателем количества субстрата для перехода на следующую фазу роста. В ходе культивирования *J. lividum* ВКМ В-3705D отмечено защелачивание среды.

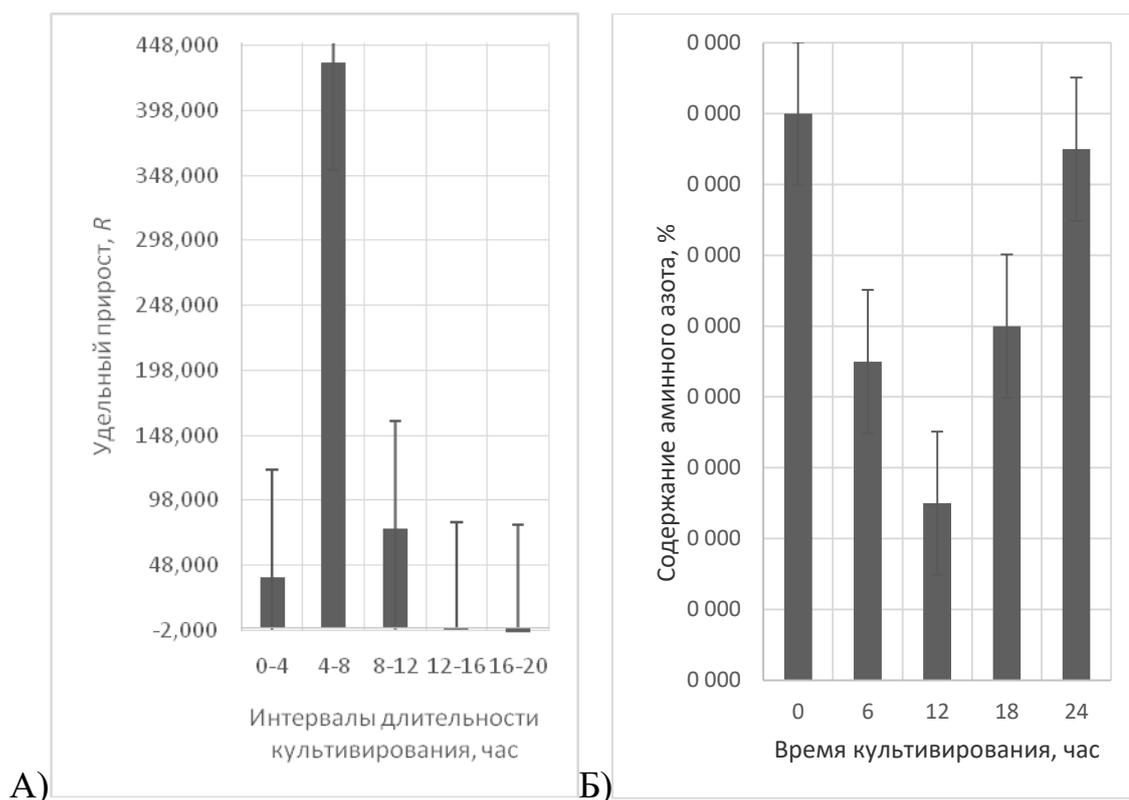


Рисунок 21. Удельный прирост культуры *J. lividum* VKM B-3705D (А) и убыль концентрации аминного азота (Б) во время культивирования.

В ходе исследования, скорость роста культуры в логарифмической фазе (μ) составила $0,543 \text{ час}^{-1}$, константа скорости деления (ν) – $0,78$, а время удвоения колониобразующих единиц (g) – $1,28 \text{ час}^{-1}$. Длительность лаг-фазы (L) составила $7,31$ час.

В результате культивирования *J. lividum* VKM B-3705D в $1000,0$ мл питательной среды ($3,0\%$ пептон), было получено $0,64 \pm 0,02$ г лиофильно высушенной биомассы с влажностью $5,61 \pm 0,05\%$. Масса пигмента в пересчете на $1,0$ г биомассы составила $4,3 \pm 0,001$ мг (табл. 6).

Таблица 6. Концентрация пигмента и сухая биомасса, как критерии эффективности культивирования *J. lividum* ВКМ В-3705D в 1000,0 мл жидкой питательной среды

Параметры	Концентрация пигмента, мг/г	Сухая биомасса, г	Влажность, %
Средняя арифметическая, $M \pm \Delta$	4,3±0,001	0,64±0,02	5,61±0,05
Относительная погрешность измерения, ε%	0,55	1,03	1,80

При культивировании периодическим глубинным способом штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D в биореакторной системе в жидкой питательной среде, объемом 7000,0 мл (рис. 20. Б), выявлено, что логарифмическая фаза роста находится в диапазоне от 4 до 10 часов инкубации. Скорость роста (μ) – 0,590 час⁻¹, константа скорости деления (ν) – 0,85, время генерации колониеобразующей единицы (g) – 1,18 час⁻¹. В результате было получено 4,43±0,05 г лиофильно высушенной биомассы. Влажность – 6,26±0,18%. Масса пигмента в пересчете на 1,0 г биомассы составила 17,96±0,08 мг. Длительность лаг-фазы (L) для культуры *J. lividum* ВКМ В-3705D в 7000,0 мл составила 3,1 часов.

Таблица 7. Концентрация пигмента и сухая биомасса, как критерии эффективности культивирования *J. lividum* ВКМ В-3705D в 7000,0 мл жидкой питательной среды

Параметры	Концентрация пигмента, мг/г	Сухая биомасса, г	Влажность, %
Средняя арифметическая, $M \pm \Delta$	17,96±0,08	4,43±0,05	6,26±0,18%
Относительная погрешность измерения, ε%	1,15	1,86	0,74

Таким образом, при культивировании *J. lividum* ВКМ В-3705D периодическим глубинным способом в биореакторной системе объемом 7000,0 мл продолжительность лаг-фазы (L) оказалась на 57,6 % ниже, чем при культивировании в объеме 1000,0 мл. При этом удельная скорость роста (μ)

увеличилась на 8,7 %, а скорость деления (ν) — на 9,0 %. Время генерации (g) в объёме 7000,0 мл было на 7,8 % ниже, чем в объёме 1000,0 мл. Улучшение кинетических характеристик (μ , ν), сокращение времени генерации (g) и продолжительности лаг-фазы (L), предположительно, являются следствием более оптимальных условий культивирования. Несмотря на то что масса лиофильно высушенной биомассы возросла в 6,9 раза, выход пигмента увеличился только в 4,2 раза. Это расхождение может быть связано с увеличением рабочего объёма, интенсивности перемешивания или возникновением локального дефицита кислорода.

В ходе исследования, экспериментально был подобран экстрагент – изопропиловый спирт. В результате экстракции пигмента изопропанолом, фильтрации и повторной экстракции из фильтрата в 100% ДМСО, согласно закону Бугера-Ламберта-Бера, было получено около 28,4 мг/л (или 82,7 мкМ) в ДМСО (табл. 8). Оптическая плотность пигмента во фракции составила $1,59 \pm 0,009$, а относительная погрешность измерения – 0,21%.

Таблица 8. Количественное определение концентрации виолацеина (мг/л) по величине оптической плотности при длине волны $\lambda = 575$ нм в растворе ДМСО

Среднее арифметическое значение оптической плотности, $M(A) \pm \Delta$	Среднее квадратическое отклонение, σ	Ошибка репрезентативности средней арифметической, m	Относительная погрешность измерения, $\varepsilon\%$	Концентрация вещества в экстракте, C (мг/л)
$1,59 \pm 0,009$	0,008	0,003	0,21	28,4

В ходе оценки чистоты фракции пигмента методом ТСХ выявлено, что смесь ацетона и этилацетата в соотношении 1:1 способствовала разделению пигмента и примесей, проявляющихся в УФ-диапазоне. Спектрофотометрическое исследование неочищенного этанольного экстракта пигмента сине-фиолетового цвета показало [128], что максимум поглощения раствора находится при длине волны (λ) 575 нм (рис. 22. А). При добавлении

крепкой серной кислоты, раствор фиолетового цвета окрасился в зеленый цвет (рис. 22. В).

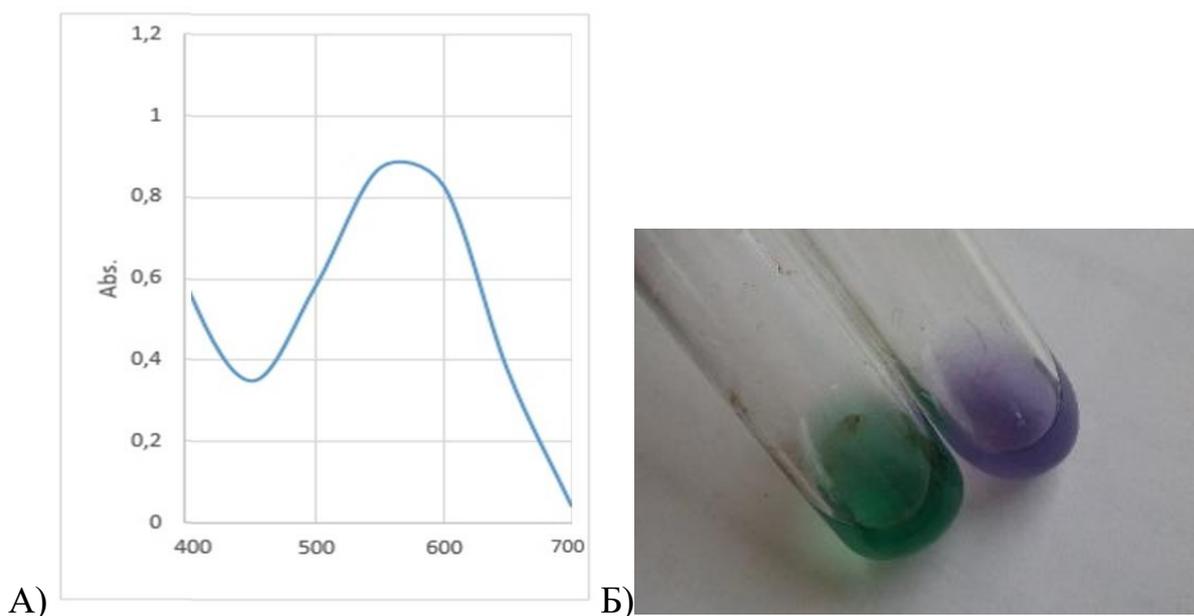


Рисунок 22. Свойства фракции пигмента: А) спектр экстракта пигмента *J. lividum* ВКМ В-3705D в диапазоне от 400 до 700 нм, с максимумом поглощения при $\lambda = 575$ нм; Б) качественная реакция неочищенного этанольного экстракта пигмента штамма с крепкой серной кислотой

Спектр ^1H ЯМР образца [161], зарегистрированный в условиях подавления воды с использованием последовательности WET, показывает резонансные сигналы в районе 6,7–9,0 ppm (рис. 23).

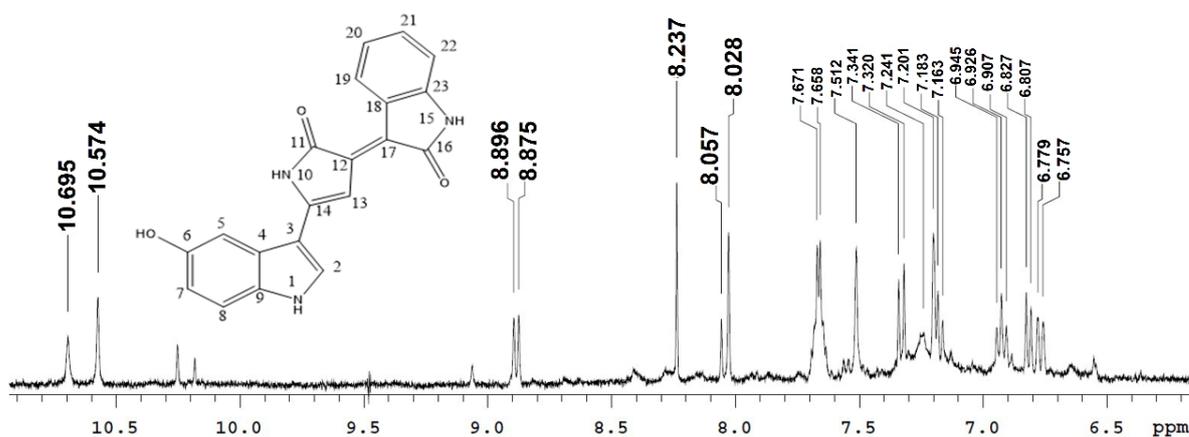


Рисунок 23. ^1H WET 1D спектр ЯМР водного экстракта пигмента *J. lividum* ВКМ В-3705D

Основные сигналы, позволяющие идентифицировать вещество как виолацеин [161], указаны в таблице 9.

Таблица 9. Основные сигналы, позволяющие идентифицировать вещество как виолацеин

Положение	Сигнал
2	8.03 singlet
5	7.20 ppm, multiplet
7	6.77 ppm doublet, J 8.7 Hz
8	7.33 ppm doublet J 8.9 Hz
13	7.53 singlet
19	8.89 ppm doublet J 8.1 Hz
20	6.94 ppm triplet J 9.0 Hz
21	7.19 ppm multiplet
22	6.82 ppm doublet J 8.6 Hz

В настоящее время разработан ряд способов экстракции виолацеина. При этом были использованы различные продуценты, как сконструированные, так и нативные представители виолацеин-образующей группы. Отмечается, что пигмент тесно связан с клетками и использование дополнительных компонентов – поверхностно-активных веществ (например, твин-20, ионные жидкости на основе додецилсульфат натрия), стеклянные шарики и циклы замораживания-оттаивания – способствует максимальному выходу виолацеина [172]. Сведения об улучшении биосинтеза за счет использования поверхностно-активных соединений встречаются и в других источниках. Так, в работе Da-ae Gwon с соавторами, приводятся сведения о том, что при использовании поверхностно-активных соединений (твин 80 и тритон X-100) выход виолацеина составил 47,64 мг/л и 48,12 мг/л, или 0,047 г/л и 0,048 г/л, соответственно [173]. Авторами был смоделирован консорциум штаммов, где в одной композиции находился продуцент L-триптофана и виолацеина. В результате удалось увеличить выход пигмента до 0,083 г/л. В свою очередь, согласно результатам культивирования, приведенным у Mendes A.S. с соавторами, было получено 0,43 г/л, тогда как сухой вес биомассы составил 21

г/л [152]. При этом, авторы использовали различные ростовые субстраты и их комбинации.

Имеются сведения о том, что получен продуцент виолацеина, путем внедрения плазмиды pHSX-vioABCDE в *Escherichia coli* K12DH5 α , который оказался способен к образованию пигмента концентрацией 0,017 г/л. В работе N. Duran с соавторами приводится результат культивирования штамма *Pseudoalteromonas* sp. (DSM 13623), согласно которому был получен неочищенный экстракт пигмента в концентрации 1,1 г/л из 30-литрового биореактора [58].

Наибольшая концентрация виолацеина – 1,62 г/л - получена в ходе культивирования, описанного в работе Н. Wang с соавторами: штамм *Duganella* sp. B2 культивировали в среде (KNO₃ - 1,18 г/л, NH₄Fe(SO₄)₂·12H₂O - 0,08 г/л, K₂HPO₄ - 0,25 г/л, MgSO₄ - 0,75 г/л, экстракт говяжий - 1,53 г/л, L-триптофан - 0,74 г/л, растворимый крахмал - 13,0 г/л, pH 6,71), объемом 25 мл. При этом объем емкости для культивирования составила 250 мл, а инокулята – 10,0%. Продолжительность культивирования составляла 32 часа [174]. Известно, что состав среды [18, 153] и условия культивирования [18, 175] могут существенно влиять на выработку виолацеина у разных штаммов бактерий. Так, известно, что при культивировании штаммов *Janthinobacterium agaricidamnosum* DSM 9628 и *Janthinobacterium lividum* DSM 1552, было выявлено 50 кратное увеличение выработки сырого пигмента при периодическом культивировании на минимальных средах [13]. Авторы утверждают, что виолацеин и дезоксивиолацеин синтезируются в ответ на стрессовые факторы окружающей среды [158, 175]. Наибольшая концентрация пигмента у *J. agaricidamnosum* DSM 9628 выращенной в богатой питательной среде, составляла 9,8 мг/л виолацеина. Тогда как для *J. lividum* DSM 1552 наибольшее значение составляло 10,89 мг/л. Таким образом, описаны результаты биосинтеза виолацеина для различных штаммов, однако, в научной литературе не выявлено сведений о том, какое количество виолацеина можно получить из 1,0 г высушенной массы бактерий.

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

В ходе оценки чувствительности тест-культур, было обнаружено, что культуральная жидкость исследуемого штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D обладает слабовыраженной антибактериальной активностью лишь в отношении грамотрицательных бактерий *Pseudomonas putida* КТ2442 и *P. fluorescens* В 849 и грамположительных бактерий *Micrococcus luteus* В1891 и *Achromobacter ruhlandii* В-1330 [128].

Таблица 10. Чувствительность тест-культур к *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D

№ п/п	Тест – культуры	<i>Janthinobacterium lividum</i> ВКМ В-3705D
1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ML4262	–
2.	<i>P. putida</i> КТ2442	+ 2 мм
3.	<i>P. protegens</i> 38a	–
4.	<i>P. chlororaphis</i> PCL1391	–
5.	<i>P. fluorescens</i> В 849	+ 1 мм
6.	<i>P. caryophylli</i> ВКМ 1290	–
7.	<i>Escherichia coli</i> S	–
8.	<i>E. coli</i> В	–
9.	<i>Erwinia herbicola</i> ATCC 27155	–
10.	<i>Alcaligenes faecalis</i> ВКМ 1518	–
11.	<i>Bacillus cereus</i> GA5T	–
12.	<i>B. weihnestephanensis</i> КВА4	–
13.	<i>B. subtilis</i>	–
14.	<i>B. shaericus</i> ВКМ В509-1	–
15.	<i>B. thuringiensis</i> ATCC 35646	–
16.	<i>B. flexsus</i>	–
17.	<i>Micrococcus luteus</i> В1891	+ 1 мм
18.	<i>M. roseus</i> В1236	–
19.	<i>Staphylococcus</i> sp. 35	–
20.	<i>Arthrobacter</i> sp. В52	–
21.	<i>Deinococcus radiodurans</i>	–
22.	<i>Achromobacter ruhlandii</i> В-1330	+ 1 мм
23.	<i>Clavibacter michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	+

Примечание:

- отсутствие антибактериальной/антимикозной активности;

+ присутствует антибактериальная/антимикозная активность, цифрами описан диаметр зоны подавления тест-культуры.

Остальные проверяемые тест-культуры оказались нечувствительными к действию культуральной жидкости штамма (табл. 10). Можно предположить, что ряд отрицательных результатов оценки чувствительности тест-культур к культуральной жидкости штамма связано с тем, что *J. lividum* ВКМ В-3705D не выделяет в среду веществ с антибиотическим потенциалом, тогда как синтезируемый им пигмент – обладает [128].

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

Качественными методами выявлено, что штамм *J. lividum* ВКМ В-3705D обладает антагонистическим потенциалом при образовании пигмента (рис. 24. А, Б).

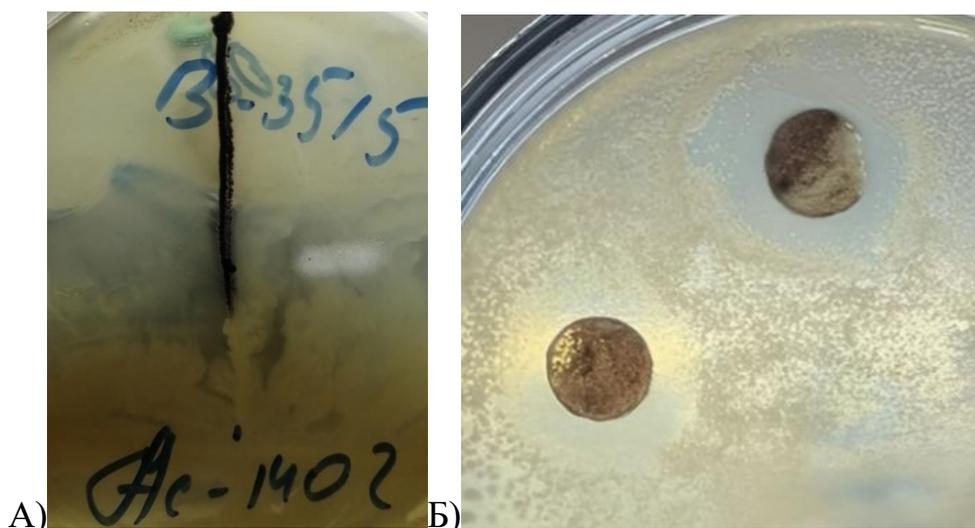


Рисунок 24. Оценка чувствительности отношении *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 к *J. lividum* ВКМ В-3705D методом перпендикулярных штрихов (А) и агаровых дисков (Б)

В ходе оценки антибактериальной активности янтинобактерии методом агаровых дисков в отношении *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 было выявлено отсутствие роста культуры (рис. 23. Б), в зоне вокруг диска, которые в течение суток зарастали слабо выраженным газоном [161]. Следует отметить, что заросшая зона не увеличивала своей интенсивности в течение недели. Таким

образом, было предположено, что *J. lividum* ВКМ В-3705D обладает бактериостатической активностью в отношении *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 [161].

В ходе исследования смеси бактерий на дисках плода томата [161] выявлена бактериостатическая активность *J. lividum* ВКМ В-3705D в отношении *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 (рис. 25). Полученные данные легли в основу предположения о том, что янтинобактерия обладает биотехнологической значимостью в области растениеводства, так как известно, что клавибактер – это возбудитель заболеваний томата [188], активно колонизирующий фрагмент плода. Отсутствие порчи фрагмента в присутствии *J. lividum* ВКМ В-3705D может свидетельствовать о его бактериостатической активности.

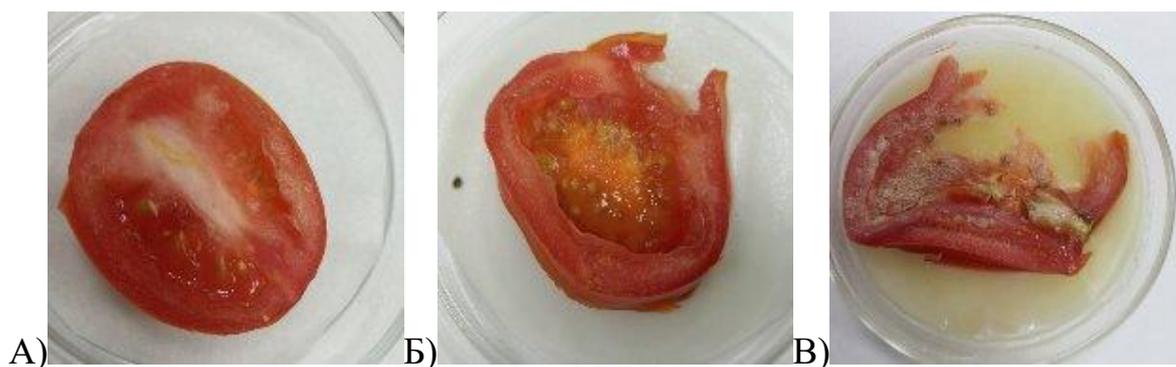


Рисунок 25. Культивирование исследуемых культур на томатах, где: А) фрагмент плода, инокулируемый штаммом *J. lividum* ВКМ В-3705D; Б) фрагмент, инокулируемый смесью *J. lividum* ВКМ В-3705D-*C. michiganensis* ВКМ Ас-1402; В) фрагмент, инокулируемый *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402

Таким образом, было показано, что *J. lividum* ВКМ В-3705D способен к замедлению роста *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402. Предположено, что эффективность связана с биосинтезом пигмента [161]. При совместной инкубации на фрагментах плода томата не выявлено развития колонии янтинобактерии, как и порчи самого фрагмента (рис. 25. Б). Тогда как инокулированный срез томата проявил признаки порчи, а клавибактер существенно колонизировал поверхность (рис. 25. В). При совместном

культивировании штаммов *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 и *J. lividum* ВКМ В-3705D в жидкой питательной среде, выявлено, что численность бактерий (рис. 26) на исходный момент культивирования (0 час) статистически значимо различалась на 13,0%, так как расчетный – выше табличного значения при уровне ошибки $p < 0,05$ ($t_{st} = 4,303$). При этом, на 6 час инкубации различие составило 1,5%, что оказалось несущественным (табл. 11).

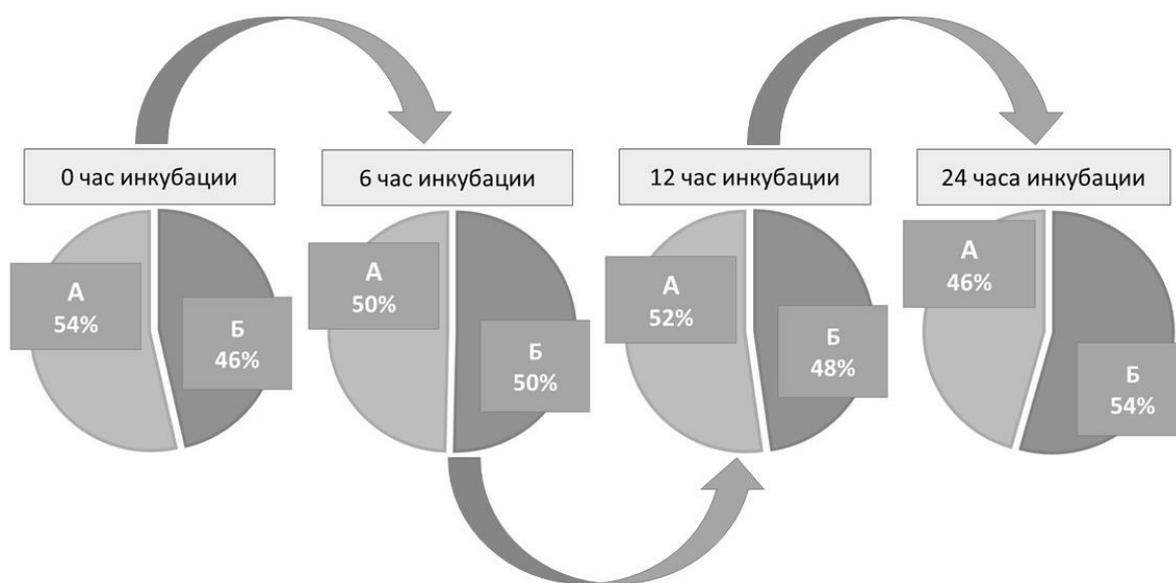


Рисунок 26. Соотношение колониеобразующих единиц ($lg(KOE/мл)$) как показатель чувствительности (А) *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 к (В) *J. lividum* ВКМ В-3705D при совместном культивировании

В свою очередь, на 12 час инкубации, численность *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 была выше, чем у *J. lividum* ВКМ В-3705D на 9,4%, тогда как на 24 час эффект оказался противоположным: численность *J. lividum* ВКМ В-3705D выше, чем для *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 на 19,3% (рис. 26). При этом, расчетные критерии достоверности Стьюдента выше табличных при уровне ошибки $p > 0,01$ и $p > 0,001$, соответственно (табл. 11).

Следует отметить, что для *J. lividum* ВКМ В-3705D в смеси штаммов оказалось характерным увеличение численности, тогда как снижение $lg(KOE/мл)$ *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 соответствовало свойствам чистой культуры. Более того, на 24 час численность клавибактера в присутствии

янтинобактерии выше, чем у чистой. Можно предположить, что *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402 начал адаптироваться к смеси [161]. Необходимы дальнейшие исследования возможной адаптации клавибактера к воздействию *J. lividum* ВКМ В-3705D.

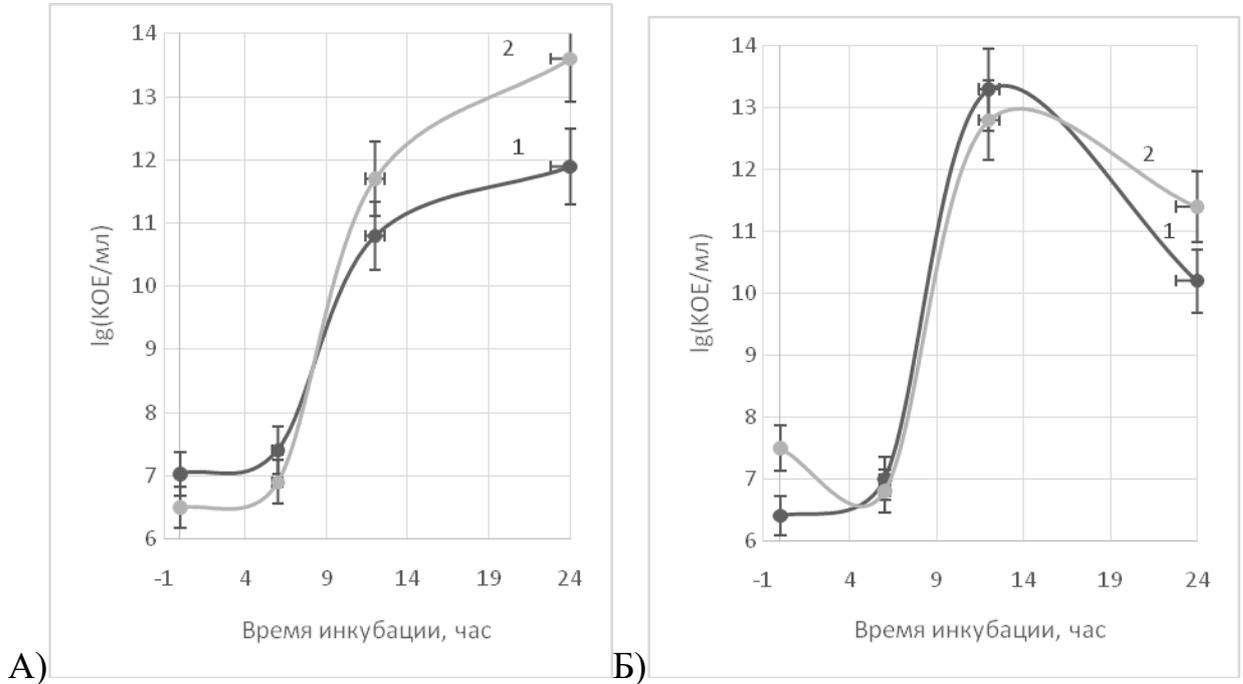


Рисунок 27. Изменение численности колониеобразующих единиц ($\lg(KOE/мл)$) *J. lividum* ВКМ В-3705D (А) и *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402 (Б) в чистой (1) и смешанной (2) культуре в течение 24 часов инкубации

При сравнении ростовых свойств штаммов в условиях совместного культивирования и отдельного [161] были выявлены следующие закономерности. Для *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402 в начальный момент инкубации численность в контрольном варианте (чистая культура) статистически значимо ниже, чем в опытном на 17,2% ($t_{(1.2-1.4)} = 6,51 > t_{st} = 4,303$ при $p < 0,05$), а на 6 час значение $\lg(KOE/мл)$ культуры, в присутствии *J. lividum* ВКМ В-3705D оказалось статистически незначимо ниже, чем в чистой на 2,9% ($t_{(2.2-2.4)} = 1,31 < t_{st} = 4,303$). На 12 час (табл. 11), численность колониеобразующих единиц в чистой культуре *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402 статистически значимо выше, чем для варианта в присутствии *J. lividum* ВКМ

В-3705D на 3,8%, а расчетный критерий достоверности Стьюдента оказался выше табличного при $p < 0,05$ ($t_{(3,2-3,4)} = 5,41 > t_{st} = 4,303$).

В свою очередь, на 24 час культивирования, различие $lg(KOE/мл)$ между контрольным и опытным вариантом составило 11,8%, где *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 в присутствии *J. lividum* ВКМ В-3705D статистически значимо превышало численность для *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 в чистой культуре, так как расчетный критерий достоверности превысило табличное при $p < 0,05$ ($t_{(4,4-4,2)} = 5,2 > t_{st} = 4,303$) [161].

В случае для культуры *J. lividum* ВКМ В-3705D, выявлено [161], что на нулевой час инкубации численность в контрольном варианте существенно выше, чем в опытном на 7,5% (табл. 11), так как расчетный критерий достоверности Стьюдента оказался выше, чем в табличном при $p < 0,05$ ($t_{(1,1-1,3)} = 8,24 > t_{st} = 4,303$). При этом, на шестой час, значение $lg(KOE/мл)$ в контрольном варианте оказалось статистически незначимо выше, чем в опытном на 6,8% ($t_{(2,1-2,3)} = 3,87 < t_{st} = 4,303$).

На 12 час культивирования, численность *J. lividum* ВКМ В-3705D, инкубируемой совместно с *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 оказалась существенно выше, чем в чистой культуре на 7,7% ($t_{(3,1-3,3)} = 49,6 < t_{st} = 31,6$), как и для 24 часа, где $lg(KOE/мл)$ в смешанной культуре превысило значение для чистой на 14,3% ($t_{(4,1-4,3)} = 49,6 < t_{st} = 4,303$). Выявлено, что при культивировании смеси, различие между численностью штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D на 12 и 24 часа несущественно, как и для *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402. Исходя из чего, предположено что культуры находятся в стационарной фазе и эксперимент завершен [161].

Все расчеты кинетических параметров проводили с использованием значений численности микроорганизмов в фазе логарифмического роста (приложения 1-11).

Таблица 11. Колониеобразующие единицы (КОЕ/мл) как показатель роста популяций *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 и *J. lividum* ВКМ В-3705D при совместном культивировании

Варианты	Параметры				Расчетный критерий достоверности Стьюдента, <i>t</i>	
	КОЕ/мл	$Ig(KOE/мл) \pm \Delta$	Среднее квадратическое отклонение, σ	Относительная погрешность измерения, $\xi\%$		
0 час инкубации (исходные значения)						
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D _(1.1)	$1,1 \cdot 10^7$	$7,03 \pm 1,0$	0,1	1,1	$t_{(1.1-1.3)} = 8,24^*$;	
чистая культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 _(1.2)	$2,5 \cdot 10^6$	$6,4 \pm 1,1$	0,1	1,4		
культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D в присутствии <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 _(1.3)	$3 \cdot 10^6$	$6,5 \pm 1,9$	0,2	2,3		$t_{(1.2-1.4)} = 6,51^*$;
культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 в присутствии <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D _(1.4)	$3,5 \cdot 10^7$	$7,5 \pm 1,1$	0,1	1,2		$t_{(1.3-1.4)} = 4,54^*$;
6 час инкубации						
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D _(2.1)	$2,85 \cdot 10_7$	$7,4 \pm 1,5$	0,2	1,6	$t_{(2.1-2.3)} = 3,87$;	
чистая культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 _(2.2)	$1,05 \cdot 10_7$	$7,0 \pm 0,3$	0,03	0,3	$t_{(2.4-2.2)} = 1,31$;	
культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D в присутствии <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 _(2.3)	$7,5 \cdot 10^6$	$6,9 \pm 0,4$	0,04	0,4	$t_{(2.4-2.3)} = 0,48$;	
культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 в присутствии <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D _(2.4)	$7 \cdot 10^6$	$6,8 \pm 1,6$	0,2	1,9	$t_{(3.1-3.3)} = 49,6^{***}$;	
12 час инкубации						
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D _(3.1)	$7,25 \cdot 10_{10}$	$10,8 \pm 1,8$	0,2	1,3	$t_{(3.2-3.4)} = 5,41^{**}$;	
чистая культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 _(3.2)	$2,1 \cdot 10^1_3$	$13,3 \pm 2$	0,2	1,2	$t_{(3.4-3.3)} = 21,5^{**}$;	
культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D в присутствии <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 _(3.3)	$5,5 \cdot 10^1_1$	$11,7 \pm 1,5$	0,2	1,0	$t_{(4.1-4.3)} = 5,2^*$;	
культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 в присутствии <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D _(3.4)	$6,9 \cdot 10^1_2$	$12,8 \pm 0,9$	0,1	0,5	$t_{(4.2-4.4)} = 5,2^*$;	
24 час инкубации						
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D _(4.1)	$7,84 \cdot 10_{11}$	$11,9 \pm 0,4$	0,05	0,3	$t_{(4.4-4.3)} = 38^{**}$;	
чистая культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 _(4.2)	$1,5 \cdot 10^1_0$	$10,2 \pm 1,9$	0,2	1,5		

культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D в присутствии <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 _(4.3)	$3,8 \cdot 10^1_3$	$13,6 \pm 0,4$	0,04	0,2	
культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 в присутствии <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D _(4.4)	$2,5 \cdot 10^1_1$	$11,4 \pm 1,1$	0,1	0,8	

Примечание:

* - различие статистически значимо при уровне $p < 0,05$;

** - различие статистически значимо при уровне $p < 0,01$;

*** - различие статистически значимо при уровне $p < 0,001$.

В ходе совместного культивирования было выявлено [161], что константы скорости роста и деления, а также время генерации штаммов *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 и *J. lividum* ВКМ В-3705D были одинаковыми в смеси, кроме удельного прироста (табл. 3). При этом, удельный прирост *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 в присутствии *J. lividum* ВКМ В-3705D оказался ниже, чем для чистой культуры на 36,4%. В свою очередь, для *J. lividum* ВКМ В-3705D значение удельного прироста в смеси оказалось на 37,5% выше, чем для чистой. При совместном культивировании константы скорости роста и деления у штамма *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 были ниже относительно чистой культуры, на 23,0% и 21,0%. Время генерации увеличилось на 28,6% (табл. 12).

Таблица 12. Кинетические параметры роста популяций *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 и *J. lividum* ВКМ В-3705D при совместном культивировании

Варианты	Параметры			
	Удельный прирост, R	Константа скорости роста, μ , $1/ч$	Константа скорости деления, ν	Время генерации, g ч
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	0,5	0,7	1,1	0,9
чистая культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	1,1	1,3	1,9	0,5
культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D в присутствии <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	0,8	1,0	1,5	0,7
культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 в присутствии <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	0,7	1,0	1,5	0,7

Исходные данные численности бактерий в условиях совместного культивирования и результаты статистических расчетов приведены в приложениях 1-11.

Для *J. lividum* ВКМ В-3705D в присутствии *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 выявлено повышение констант скорости роста и деления, относительно варианта в чистой культуре, на 30,0% и 26,7%, соответственно. Время генерации уменьшилось на 22,0% [161].

Так, изменение ростовых свойств у штаммов (рис. 26), является отклонением от темпов роста контрольных вариантов. Таким образом, в ходе совместного культивирования штаммов *J. lividum* ВКМ В-3705D и *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 выявлено, что янтинобактерия проявляет бактериостатическую активность в отношении клавибактера, так как степень ингибирования $lg(KOE/мл)$ составила 11,8%, а ростовые свойства, такие как константы скорости роста и деления, *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 снизились относительно контрольной группы. При этом, увеличилось время генерации культуры [161].

3.6. Влияние фракции виолацеина на ростовые свойства *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402

В ходе оценки чувствительности *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 к неочищенному экстракту виолацеина, выявлено [161], что неразбавленный диметилсульфоксид и фракция в ДМСО оказывают ингибирующий эффект, различие которого для этих вариантов является статистически незначимым (табл. 13), так как средний арифметический диаметр зоны подавления роста для пигмента оказалось ниже на 9,0%, а расчетный критерий достоверности Фишера составил $F = 1,2$. Фракция виолацеина в ДМСО с концентрацией 9,19 мкМ подавила рост штамма *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402, тогда как чистый ДМСО, разведенный в той же концентрации, не оказал эффекта в отношении культуры [161]. При этом, среднее значение радиуса зоны ингибирования

оказалось статистически незначимо ниже, чем для концентрированного варианта на 10,0% (расчетный критерий Фишера составил $F = 2,53$).

Таблица 13. Усредненный радиус зоны подавления роста как показатель чувствительности *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402 к фракции виолацеина в ДМСО

Варианты	Параметры		
	Среднее арифметическое значение, $M \pm \Delta$, мм	Относительная погрешность измерения, ζ , %	Критерий достоверности Фишера, F
ДМСО неразбавленный ⁽¹⁾	3,3±0,3	3,7	$F_{(1-2)} = 1,2$; $F_{(2-4)} = 2,53$; $F_{(2-6)} = 88,2^*$; $F_{(4-6)} = 13,4^*$.
Неразбавленная фракция виолацеина в ДМСО, 82,7 мкМ ⁽²⁾	3,0±0,3	4,7	
ДМСО-вода в соотношении ⁽³⁾	-	-	
Фракция виолацеина в ДМСО-вода в соотношении 9,19 мкМ ⁽⁴⁾	2,7±0,3	4,9	
ДМСО-вода в соотношении ⁽⁵⁾	-	-	
Фракция виолацеина в ДМСО-вода в соотношении 4,86 мкМ ⁽⁶⁾	2,4±0,2	4,9	

Примечание:

* - различие статистически значимо.

Для варианта 4,86 мкМ было характерно отсутствие эффективности у ДМСО и виолацеина, которая была существенно ниже, чем у концентрированной фракции (-20,0%) [161]. При этом, различие в эффективности вариантов, разведенных в концентрации 9,19 мкМ и 4,86 мкМ составило 11,0%, что оказалось статистически значимым, так как расчетный критерий достоверности Фишера выше табличного значения (табл. 13).

Таким образом, при разведении фракции пигмента в ДМСО растворитель не проявил ингибирующей активности, а чувствительность *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402 к экстракту снизилась по мере снижения концентрации виолацеина [161]. Тем не менее, максимальный усредненный радиус зоны подавления клавибактерии (около 3 мм) является низким и не позволяет судить о бактериоцидной активности. Можно предположить, что фракция виолацеина в ДМСО проявила низкую бактериостатическую активность в отношении *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402, пассированной

«газоном» [161]. При культивировании клавибактера в присутствии фракции пигмента в ДМСО было выявлено, что варианты с низкой концентрацией не оказали существенного влияния на удельную скорость роста культуры, так как различие с контрольной группой было менее 20%, а расчетные критерии достоверности Стьюдента ниже табличных (табл. 14) [161]. Степень подавления удельного прироста тест-культуры *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 неразбавленным ДМСО в количестве 0,05% от объема среды составила 2,97%, относительно контрольного варианта (рис. 24. А). Такой эффект оказался несущественным (табл. 10), так как расчетный критерий достоверности Стьюдента ниже табличного при $p < 0,05$ ($t_{(1.1-1.2)} = 1,10 < t_{st} = 2,447$). В свою очередь, степень подавления удельного прироста штамма в присутствии, в том же количестве, неразбавленного варианта фракции виолацеина в ДМСО составила 37,9% (рис. 24). При этом, критерий достоверности (табл. 14) оказался выше табличного ($t_{(1.1-1.3)} = 14,70 > t_{st} = 2,447$) [161].

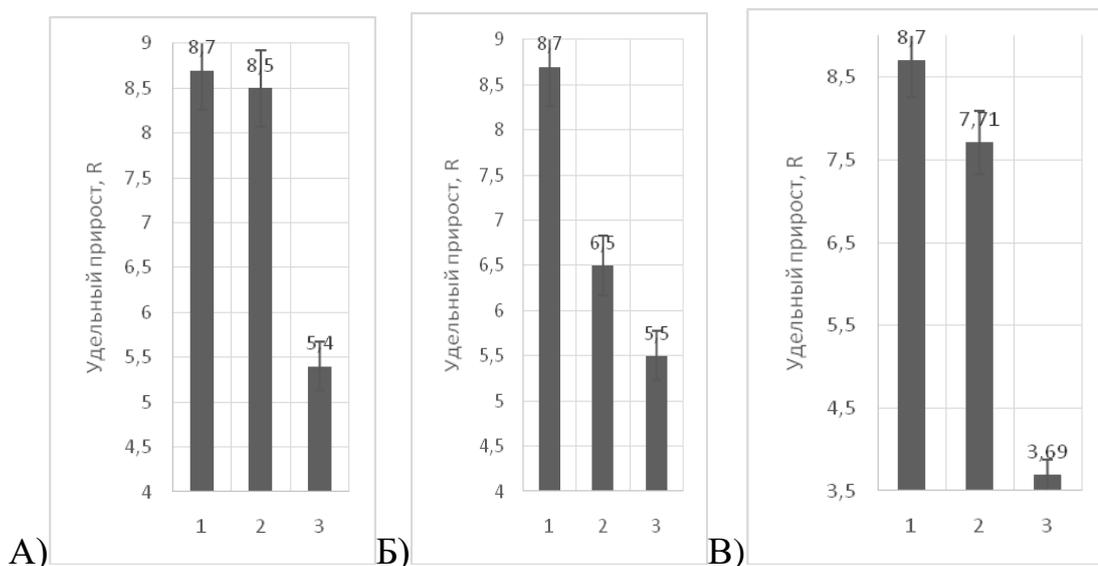


Рисунок 28. Удельный прирост *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 в чистой культуре без исследуемых вариантов (1), в присутствии ДМСО (2) и фракции виолацеина в ДМСО (3), в концентрации 0,05% (А), 0,1% (Б) и 0,15% (В) от объема среды

Оценка влияния пигмента на удельный прирост культуры клавибактера при повышении содержания исследуемого вещества до 0,1% (рис. 28. Б) от

объема среды показала, что степень подавления неразбавленного варианта вещества в ДМСО составила 39,7%, тогда как для самого растворителя – 25,5%. При этом, различия усредненных значений для всех образцов оказались достоверны, так как расчетные критерии Стьюдента выше табличных (табл. 13) [161].

Таблица 14. Степень подавления удельного прироста культуры *Clavibacter michiganensis* ВКМ Ас-1402 как показатель влияния фракции виолацеина в ДМСО при 0,05% вещества от объема среды

Варианты	Параметры				
	Среднее арифметическое значение на 24 час культивирования, $M \pm \Delta$, ОЕ	Относительная погрешность измерения, ξ , %	Удельный прирост культуры, R	Степень подавления удельного прироста, IR , %	Критерий достоверности Стьюдента
Контроль (без исследуемых растворов) _(1.1)	0,37±0,08	1,77	8,73	$IR_{(1.1-1.2)} = 2,97\%$ $IR_{(1.1-1.3)} = 37,9\%$ $IR_{(1.1-1.4)} = 11,1\%$ $IR_{(1.1-1.5)} = 9,05\%$ $IR_{(1.1-1.6)} = 5,49\%$ $IR_{(1.1-1.7)} = 10,42\%$	$t_{(1.1-1.2)} = 1,10;$
ДМСО неразбавленный _(1.2)	0,36±0,04	0,81	8,47		$t_{(1.1-1.3)} = 14,70^{***};$
Неразбавленная фракция в ДМСО, 82,7 мкМ _(1.3)	0,31±0,08	2,12	5,42		$t_{(1.1-1.4)} = 1,67;$
ДМСО-вода в соотношении _(1.4)	0,35±0,03	0,71	7,76		$t_{(1.1-1.5)} = 1,00;$
Фракция в ДМСО-вода в соотношении 9,19 мкМ _(1.5)	0,36±0,05	1,13	7,94		$t_{(1.1-1.6)} = 1,57;$
ДМСО-вода в соотношении _(1.6)	0,37±0,06	1,29	8,25		$t_{(1.1-1.7)} = 1,10;$
Фракция в ДМСО-вода в соотношении 4,86 мкМ _(1.7)	0,36±0,04	0,81	7,82		

Примечание:

* - различие статистически значимо при уровне $p < 0,05$ ($t_{st} = 2,228$);

** - различие статистически значимо при уровне $p < 0,01$ ($t_{st} = 3,169$);

*** - различие статистически значимо при уровне $p < 0,001$ ($t_{st} = 4,587$).

Повышение содержания исследуемых вариантов в питательной среде до 0,15% от общего объема показало, что степень подавления удельного прироста неразбавленной фракции пигмента в ДМСО существенна (расчетный критерий достоверности Стьюдента выше табличного, $t_{(3.1-3.3)} = 14,70 < t_{st} = 2,447$), и составила 57,7% (рис. 28. В). В свою очередь, для ДМСО – 11,8%. Критерий достоверности оказался выше табличного ($t_{(3.1-3.2)} = 2,61 < t_{st} = 2,447$), следовательно, различие между контролем растворителя и контрольным вариантом достоверно [161].

Таблица 15. Степень подавления удельного прироста культуры *Clavibacter michiganensis* ВКМ Ас-1402 как показатель влияния фракции виолациена в ДМСО при 0,1% вещества от объема среды

Варианты	Параметры				
	Среднее арифметическое значение на 24 час культивирования, $M \pm \Delta$, ОЕ	Относительная погрешность измерения, ξ , %	Удельный прирост культуры, R	Степень подавления удельного прироста, IR , %	Критерий достоверности Стьюдента
Контроль (без исследуемых растворов) ^(2.1)	0,37±0,08	1,77	8,73		
ДМСО неразбавленный ^(2.2)	0,3±0,03	0,83	6,5	$IR_{(2.1-2.2)} = 25,5\%$;	$t_{(2.1-2.2)} = 8,33^{***}$;
Неразбавленная фракция в ДМСО 82,7 мкМ ^(2.3)	0,28±0,03	0,9	5,5	$IR_{(2.1-2.3)} = 39,7\%$;	$t_{(2.1-2.3)} = 18,28^{***}$;
ДМСО-вода в соотношении ^(2.4)	0,36±0,05	1,13	7,89	$IR_{(2.1-2.4)} = 9,6\%$;	$t_{(2.1-2.4)} = 1,00$;
Фракция в ДМСО-вода в соотношении 9,19 мкМ ^(2.5)	0,35±0,05	1,17	8,33	$IR_{(2.1-2.5)} = 4,58\%$;	$t_{(2.1-2.5)} = 1,57$;
ДМСО-вода в соотношении ^(2.6)	0,36±0,14	3,00	8,6	$IR_{(2.1-2.6)} = 1,49\%$;	$t_{(2.1-2.6)} = 0,77$;
Фракция в ДМСО-вода в соотношении 4,86 мкМ ^(2.7)	0,36±0,04	0,88	7,91	$IR_{(2.1-2.7)} = 11,91\%$;	$t_{(2.1-2.7)} = 1,67$;

Примечание:

* - различие статистически значимо при уровне $p < 0,05$ ($t_{st} = 2,228$);

** - различие статистически значимо при уровне $p < 0,01$ ($t_{st} = 3,169$);

*** - различие статистически значимо при уровне $p < 0,001$ ($t_{st} = 4,587$).

Снижение показателя удельного прироста может свидетельствовать о том, что исследуемые образцы оказывают ингибирующее влияние на рост популяции. Тем не менее, ни один из вариантов не превысил свою эффективность 80% [161].

Таблица 16. Степень подавления удельного прироста культуры *Clavibacter michiganensis* ВКМ Ас-1402 как показатель влияния фракции виолацеина в ДМСО при 0,15% вещества от объема среды

Варианты	Параметры				
	Среднее арифметическое значение на 24 час культивирования, $M \pm \Delta$, ОЕ	Относительная погрешность измерения, ζ , %	Удельный прирост культуры, R	Степень подавления удельного прироста, IR , %	Критерий достоверности Стьюдента
Контроль (без исследуемых растворов) _(3.1)	0,37±0,08	1,77	8,73		
ДМСО неразбавленный _(3.2)	0,35±0,03	0,71	7,71	$IR_{(3.1-3.2)} = 11,8\%$	$t_{(3.1-3.2)} = 2,61^*$;
Неразбавленная фракция в ДМСО, 82,7 мкМ _(3.3)	0,19±0,03	1,33	3,69	$IR_{(3.1-3.3)} = 57,7\%$	$t_{(3.1-3.3)} = 14,70^{***}$;
ДМСО-вода в соотношении _(3.4)	0,36±0,06	1,32	8,67	$IR_{(3.1-3.4)} = 0,69\%$	$t_{(3.1-3.4)} = 0,24$;
Фракция в ДМСО-вода в соотношении 9,19 мкМ _(3.5)	0,36±0,075	1,60	8,6	$IR_{(3.1-3.5)} = 1,49\%$	$t_{(3.1-3.5)} = 1,73$;
ДМСО-вода в соотношении _(3.6)	0,36±0,062	1,34	8,53	$IR_{(3.1-3.6)} = 2,29\%$	$t_{(3.1-3.6)} = 1,00$;
Фракция в ДМСО-вода в соотношении 4,86 мкМ _(3.7)	0,36±0,08	1,82	8,47	$IR_{(3.1-3.7)} = 2,99\%$	$t_{(3.1-3.7)} = 1,41$

Примечание:

* - различие статистически значимо при уровне $p < 0,05$ ($t_{st} = 2,228$);

** - различие статистически значимо при уровне $p < 0,01$ ($t_{st} = 3,169$);

*** - различие статистически значимо при уровне $p < 0,001$ ($t_{st} = 4,587$).

Только неразбавленная фракция виолацеина в ДМСО снизила удельный прирост относительно контроля на 57,7% (табл. 16). Следовательно, можно предположить, что пигмент оказывает бактериостатическое воздействие на рост популяции тест-культуры *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 [161].

В научной литературе имеются сведения о том, что виолацеин обладает антибиотической активностью в отношении ряда бактерий и грибов [90, 128, 161]. В работе Cazoto L., с соавторами, приведены результаты исследования, которые показывают, что виолацеин оказался эффективным в отношении изолятов *Staphylococcus aureus* в концентрациях от 6,25 (0,021 мг/мл) до 25 мкМ (0,086 мг/мл), а в случае тест-культур *Escherichia coli* эффекта не было и при 200 мкМ (0,69 мг/мл) [176]. Антибактериальная активность по отношению к стафилококку подтверждается рядом исследований, среди которых встречаются варианты модификации виолацеина для повышения растворимости и качества антибиотического свойства. Так, в работе Martins D., с соавторами, показана активность композиции виолацеина и поли-(D, L-лактид-со-гликолида) в отношении *St. aureus* и *Escherichia coli* и *Salmonella enterica* [177]. Авторами подтверждается факт, что пигмент, даже модифицированный, эффективен в отношении грамположительной тест-культуры, тогда как грамотрицательные не реагировали на присутствие виолацеина. В работе Dodou H.V., с соавторами, показано, что виолацеин в концентрации 20 мкг/мл⁻¹ способен ингибировать образование биопленок и способствовать деградации уже сформированной пленки в количестве 160 мкг/мл⁻¹ [139].

Таким образом, бактериостатическая активность фракции виолацеина в отношении тест-культуры *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 соответствует примерам в научной литературе эффекта в отношении грамположительных микроорганизмов в научной литературе [128, 161]. Однако, неспособность пигмента растворяться в воде представляет собой существенное ограничение при разработке составов биопрепаратов.

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

В ходе исследования [161] выявлено, что чистый растворитель (ДМСО) вызывал значительное уменьшение параметров высоты (-42%, $p < 0,01$) и шероховатости (-56,8%, $p < 0,01$) клеток (табл. 8). Разбавленный ДМСО давал аналогичный, но менее выраженный эффект (-20,7% для уменьшения высоты клеток, $p < 0,05$; -27% для уменьшения шероховатости мембраны, $p < 0,05$). В свою очередь, при культивировании с фракцией виолацеина, как и в случае чистого ДМСО, наблюдалось снижение высоты (-15%, $p < 0,05$) и шероховатости (-17%, $p < 0,05$), но эти изменения были менее выраженными. Разбавленная фракция виолацеина не вызывала изменений ни в одном из измеренных морфометрических параметров [161].

Таблица 17. 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 (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 9,19 мкМ (19 клеток)	3,1±0,1	171,2*±10,3	9,2*±1	4,9±0,4	0,7±0,1
Разбавленная фракция виолацеина (9,19 мкМ) (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.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Шероховатость поверхности бактериальных клеток может отражать внешние мембранные структуры и внеклеточные полимеры [161, 178] и часто положительно коррелируют со степенью бактериальной адгезии и образования биопленки [179]. Наблюдаемое нами совместное уменьшение

шероховатости и высоты клеток может быть связано с тем, что снижается способность клеток прилипать и сохранять жесткую форму, из-за чего клетка «провисает», сохраняя при этом общую площадь поверхности и объем [161].

Таким образом, можно предположить, что в присутствии виолацеина морфометрические показатели отражают воздействие на проницаемость мембраны, что приводит к утечке внутриклеточного вещества, так как известно, что пигмент связывается с липосомами [179]. Это может быть причиной «провисания» клетки [161]. Влияние фракции виолацеина на морфометрические свойства клеток *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 изучено впервые. Однако, для утверждения выдвинутого предположения необходимы дальнейшие исследования с применением методов молекулярно-генетического анализа.

3.8. 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 ходе исследования противогрибкового потенциала штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D было выявлено, что рост колонии *A. brassicicola* ВКМ F-1864 в контрольной и опытной группе статистически незначимо различался в течении 3 суток (рис. 29). При этом, наблюдается статистически достоверное различие между средними квадратическими диаметрами колоний плесневого гриба и в контрольной, и в опытной группах на 1 и 3 сутки (рис. 29), так как расчетные критерии достоверности Стьюдента оказались выше табличного значения при уровне ошибки $p < 0,001$ (табл. 18).

Диаметры колоний контрольной и опытной групп с 3 до 4 статистически значимо увеличились. Расчетные критерии достоверности Стьюдента (табл. 1), при этом, оказались выше табличных при уровне ошибки $p < 0,001$ (контрольная группа) и $p > 0,01$ (опытная группа). На 5 сутки средний квадратический диаметр колонии плесневого гриба в контрольной группе достоверно увеличился, так как расчетный критерий достоверности

Стьюдента оказался выше стандартного при $p < 0,05$ (табл. 18). В свою очередь, в опытной группе роста мицелия на 5 сутки не наблюдалось относительно 4 суток (табл. 18).

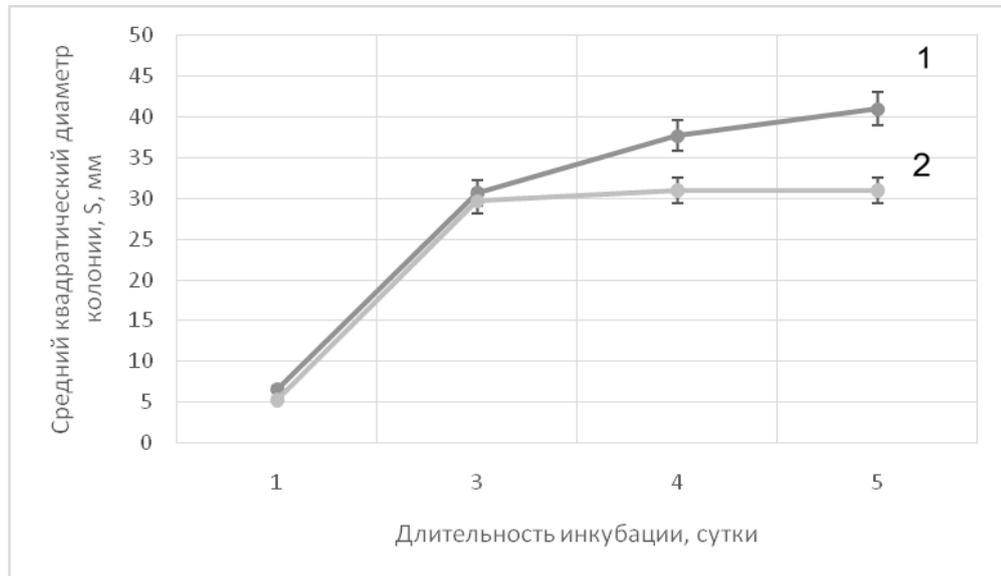


Рисунок 29. Рост колоний плесневого гриба *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864 без *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D (1) и в присутствии штамма (2)

Средний квадратический диаметр колоний плесневого гриба опытной группы статистически незначимо отличается от диаметра контрольной группы до 3 суток инкубации (табл. 18). На 4 и 5 сутки рост мицелия в присутствии штамма В-3705D существенно замедлился в сравнении с контролем, так как расчетный критерий достоверности Стьюдента оказался выше табличного при $p < 0,001$ (табл. 18).

Таким образом, исходя из полученных данных, при совместном культивировании гриба *A. brassicicola* ВКМ F-1864 и штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D бактерия оказывает микостатическое действие.

Таблица 18. Средний квадратический диаметр колонии плесневого гриба *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864 как показатель противогрибковых свойств штамма *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D

Варианты	Время инкубации, сут	Средние квадратические, $S \pm \Delta$	Ошибка разности, Sd	Критерий достоверности Стьюдента, t	Средний прирост колонии <i>A. brassicicola</i> ВКМ F-1864, X, %
Контроль	1 ₍₁₎	6,6±1,7	$Sd_{(1-2)} = 0,75$ $Sd_{(1-1.1)} = 0,5$	$t_{(1-2)} = 32,1^{***}$ $t_{(1-1.1)} = 2,7^*$	60
	3 ₍₂₎	30,7±0,08	$Sd_{(2-3)} = 0,75$	$t_{(2-3)} = 10,2^{***}$	
	4 ₍₃₎	37,7±2,4	$Sd_{(3-4)} = 1,4$	$t_{(3-4)} = 2$	
	5 ₍₄₎	41±3,5	$Sd_{(2-1.2)} = 0,3$	$t_{(2-1.2)} = 2,4$	
Опыт	1 _(1.1)	5,3±1,4	$Sd_{(1.1-1.2)} = 0,4$ $Sd_{(3-1.3)} = 0,9$	$t_{(1.1-1.2)} = 59,8^{***}$ $t_{(3-1.3)} = 6,6^{***}$	50
	3 _(1.2)	29,7±0,08	$Sd_{(1.2-1.3)} = 0,3$	$t_{(1.2-1.3)} = 4,5^{**}$	
	4 _(1.3)	31±1,6	$Sd_{(1.3-1.4)} = 0,4$	$t_{(1.3-1.4)} = 0$	
	5 _(1.4)	31±1,6	$Sd_{(4-1.4)} = 1,1$	$t_{(4-1.4)} = 8,7^{***}$	

Примечание:

* - различие статистически достоверно при уровне ошибки $p < 0,05$;

** - различие статистически достоверно при уровне ошибки $p < 0,01$;

*** - различие статистически достоверно при уровне ошибки $p < 0,001$.

Это утверждение подтверждается тем, что средний прирост колонии (рис. 30) в контрольной группе на 10,0% выше, чем в опытной (табл.18).

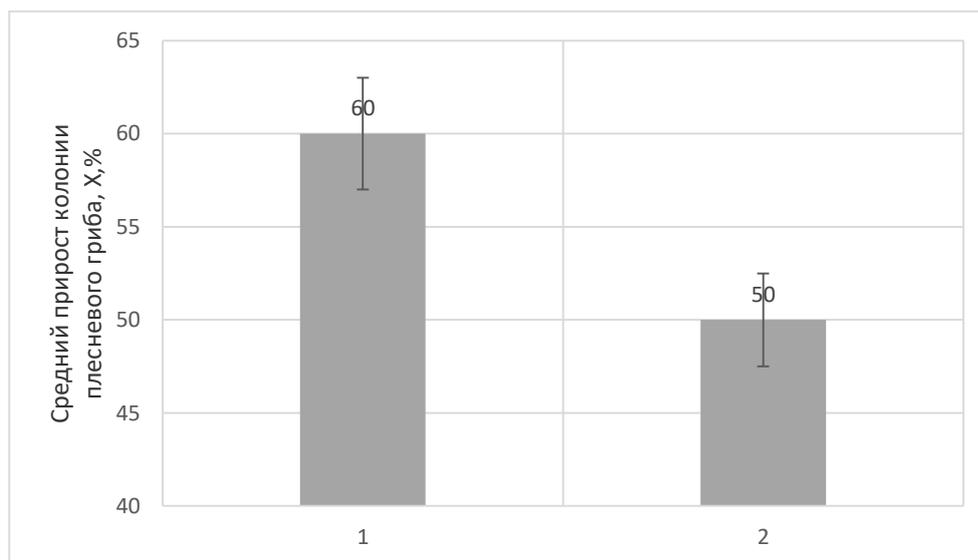


Рисунок 30. Средний прирост колонии плесневого гриба *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864 без *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D (1) и в присутствии штамма (2)

В ходе исследования антагонистической активности фракции виолацеина было выявлено, что содержание пигмента в питательной среде Сабуро (1000,0 мкл) оказывает слабое микостатическое воздействие. Средний прирост колонии *A. brassicicola* ВКМ F-1864 на 5 сутки инкубации (рис. 31) статистически значимо снизился на 10,0% (для 1,0%), 11,0% (для 3,0%) и на 18,0% (для 5,0%), относительно контрольной группы.

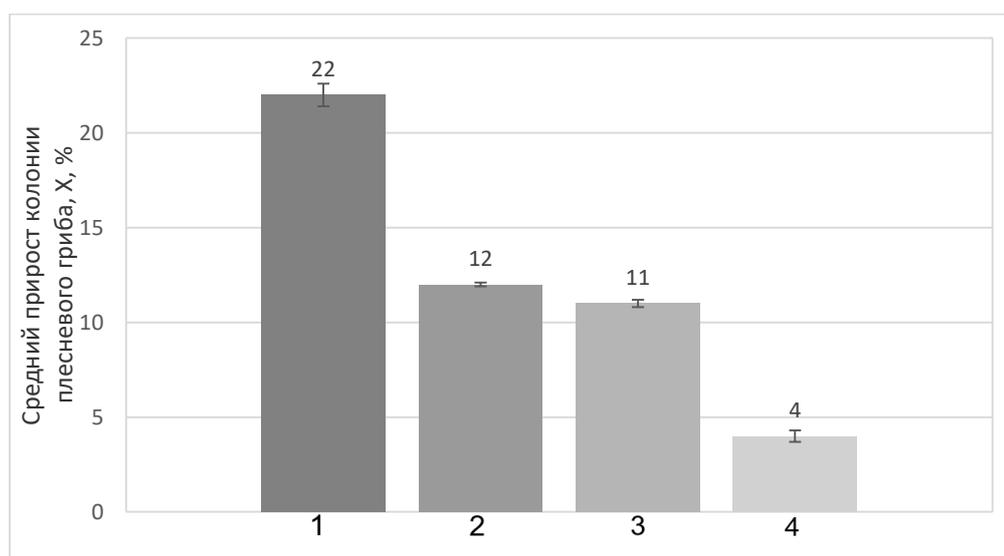


Рисунок 31. Средний прирост колонии плесневого гриба *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864 в контрольном образце (1), в присутствии 1,0% (2), 3,0% (3) и 5,0% (4) пигмента в питательной среде.

Таким образом, в ходе исследования выявлена умеренная микостатическая активность в отношении плесневого гриба *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864 у штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D и его вторичного метаболита – виолацеина.

Имеются сведения о том, что плесневые грибы *Alternaria brassicicola* являются возбудителями заболеваний стручков семенных культур *Brassica oleracea* [181]. Многие сорта капусты (*Brassica* sp.) широко культивируются в Европе, Азии, Новой Зеландии и Северной Америке в качестве основного продукта питания для человека, овец и крупного рогатого скота. Однако до сих пор неизвестен ни один сорт, который был бы полностью устойчив к *A. brassicicola* [182]. Один из способов проникновения плесневого гриба в

растительные клетки хозяина – действие нескольких сериновых эстераз, которые связаны с поверхностью спор, на кутикулу [182]. Исходя из чего, некоторые фунгициды могут быть направлены на ингибирование ферментативной активности спор *A. brassicicola*, но при использовании агрессивных агентов может быть поражено само растение.

В ходе оценки противогрибковой активности *J. lividum* ВКМ В-3705D в отношении тест-культуры плесневого гриба *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754 выявлено, что скорость роста гриба в присутствии аборигенного штамма бактерии составила 2,9 мм/ч, а в варианте, содержащем только *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754 (контроль)– 5,4 мм/ч.

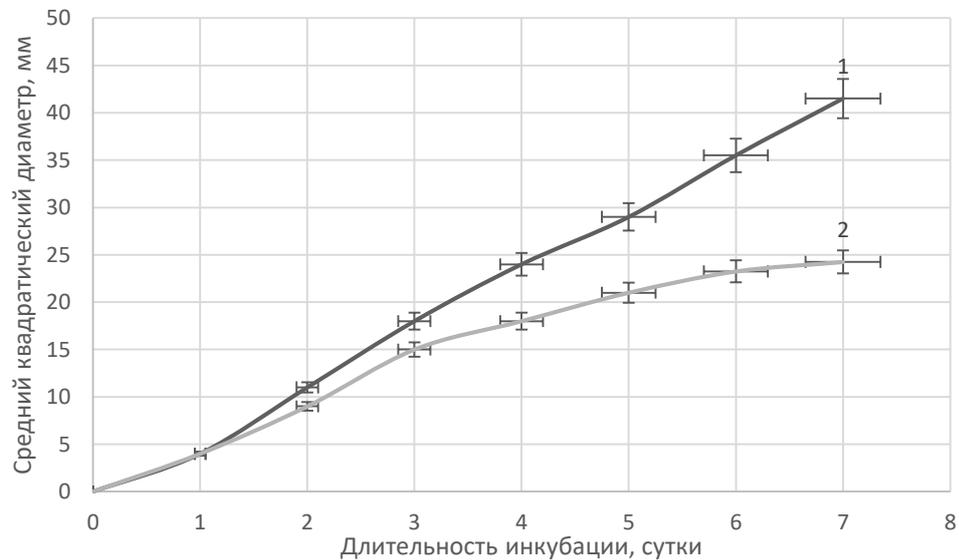


Рисунок 32. Изменение среднего квадратического диаметра колонии *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754 в чистой культуре (1) в присутствии *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D (2)

Можно предположить, что штамм *J. lividum* ВКМ В-3705D оказывает микостатический эффект в отношении роста колонии плесневого гриба, так как в присутствии бактерии ее скорость роста сокращается на 46,3%.

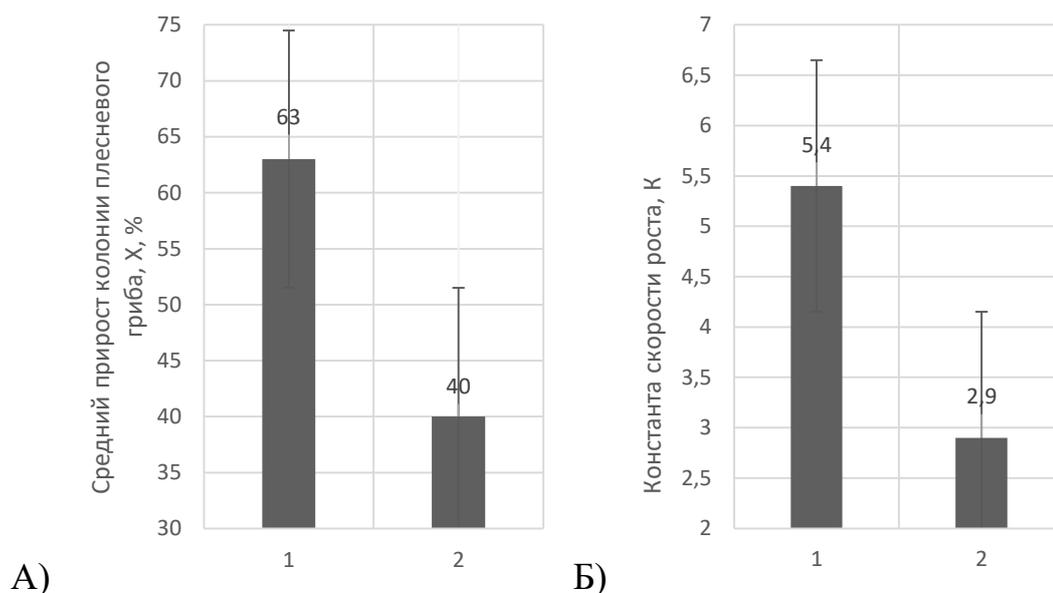


Рисунок 33. Средний прирост (А) и константа скорости роста (Б) колонии *A. unguis* ВКМ F-1754 как показатель противогрибковой активности *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D

Таким образом, впервые показана противогрибковая активность *J. lividum* ВКМ В-3705D в отношении *A. unguis* ВКМ F-1754, где штамм бактерии снизил скорость роста плесневого гриба на 46,3%

Таблица 19. Средний квадратический диаметр колонии *A. unguis* ВКМ F-1754 как показатель противогрибковой активности *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D

Варианты	Средний квадратический диаметр, $S \pm \Delta$	Средний прирост, X	Константа скорости роста, K	Ошибка разности, Sd	Расчетный критерий достоверности Стьюдента, t
Контроль	41,5±0,6	63	5,4	0,85	20,3*
Опыт	24,25±0,5	40	2,9	0,85	20,3*

Примечание:

* - различие статистически значимо при уровне $p < 0,001$ ($t_{st} = 4,587$).

Представители рода *Aspergillus* являются одними из распространенных возбудителей растений. Имеются сведения о том, что *Aspergillus flavus*

вызывает гниль плода киви [184]. Кроме прямой порчи растений, аспергиллы несут угрозу для организма человека за счет образования микотоксинов, которые накапливаются в растительных пищевых продуктах. Так, в научной литературе описано негативное влияние этих вторичных метаболитов на качество зерна [185]. Группа таких вторичных метаболитов включает в себя около 20 химически родственных метаболитов, некоторые из них идентифицированы как В1, В2, G1 и G2 [186, 187].

Таким образом, использование противогрибковых препаратов необходимо для обеспечения продовольственной безопасности и снижения рисков порчи урожаев. Современные тенденции разработки средств защиты растений направлены на биологизацию, а именно на замену действующих химических пестицидов на биологические (например, микроорганизмы-антагонисты и их вторичные метаболиты). Данное направление требует поиска новых эффективных продуцентов антибиотических веществ и разработки комплекса оптимальных параметров для получения биологически активных веществ. Одним из перспективных в сфере разработки средств защиты растений соединений может быть пигмент сине-фиолетового цвета виолацеин.

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

В ходе оценки влияния фракции виолацеина в ДМСО на активность препарата аденозинтрифосфатазы, КФ 3.6.1.3, (АТФ-азы), выявлено, что концентрированный пигмент статистически значимо снизил активность фермента на 31,5% [161] относительно контрольного варианта, так как расчетный критерий достоверности Стьюдента оказался выше табличного (табл. 20). При инкубации ферментного препарата с ДМСО в качестве контроля действия растворителя в той же концентрации, было выявлено статистически значимое снижение активности на 8,3% (табл. 17) [161].

Таблица 20. Активность аденозинтрифосфатазы (КФ 3.6.1.3) *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 в присутствии фракции виолацеина в ДМСО при выдержке смеси в течение 10 минут

Варианты	Относительная погрешность измерения, ξ , %	Активность фермента, МЕ/мин	Степень подавления активности фермента, IR	Критерий достоверности Стьюдента, t
Контрольный вариант без АТФ-аз (Бланк) ₍₁₎	1,68	-	IR ₍₂₋₃₎ = 8,3%; IR ₍₂₋₄₎ = 31,5%	t ₍₁₋₂₎ = 44,8***;
Контрольный вариант, содержащий АТФ-азу ₍₂₎	1,63	0,1		t ₍₃₋₂₎ = 4,17**;
ДМСО неразбавленный ₍₃₎	1,33	0,09		t ₍₄₋₂₎ = 11,39***;
Неразбавленная фракция в ДМСО 82,7 мкМ ₍₄₎	1,27	0,07		t ₍₅₋₂₎ = 9,76***;
ДМСО-вода ₍₅₎	1,88	0,13		t ₍₆₋₂₎ = 2,1;
Фракция в ДМСО-вода в соотношении 9,19 мкМ ₍₆₎	1,00	0,1		t ₍₇₋₂₎ = 1,4;
ДМСО-вода ₍₇₎	0,68	0,1		t ₍₈₋₂₎ = 0,87;
Фракция в ДМСО-вода в соотношении 4,86 мкМ ₍₈₎	0,83	0,1		t ₍₄₋₃₎ = 16,65***

Примечание:

* - различие статистически значимо при уровне $p < 0,05$ ($t_{st} = 2,228$);

** - различие статистически значимо при уровне $p < 0,01$ ($t_{st} = 3,169$);

*** - различие статистически значимо при уровне $p < 0,001$ ($t_{st} = 4,587$).

Тем не менее в присутствии фракции наблюдается существенное снижение активности АТФ-азы, относительно чистого ДМСО на 22,0% (табл. 17). Таким образом, можно предположить, что фракция виолацеина в ДМСО оказывает больший ингибирующий эффект, чем сам растворитель. При снижении концентрации виолацеина и самого растворителя – ДМСО – активность АТФ-азы не изменилась в варианте с фракцией, но существенно выросла на 23,0% (табл. 17). Меньшие концентрации вариантов не оказали воздействия на активность неочищенного фермента [161].

В ходе изучения научной литературы, не было найдено данных о влиянии пигментов микробного происхождения, в том числе и виолацеина, на активность АТФ-азы *C. michiganensis*. Однако, в работе Cai J, с соавторами, показан ингибирующий эффект экстракта Атириума китайского (*Athyrium sinense*) в отношении АТФ-азы *Clavibacter michiganensis* [188]. Известно, что АТФ-аза играет существенную роль в процессах транспорта веществ через

клеточные мембраны, и, согласно авторам работы, может отражать метаболический статус клетки. Снижение активности АТФ-азы может быть связано с нарушениями в структуре фермента, а также в чрезмерной проницаемости мембран, что может привести к гидролизу АТФ-азы. Кроме того, известно, что виолацеин оказывает воздействие на цитоплазматические мембраны грамположительных бактерий: пигмент связывается с липосомами и повышает проницаемость мембраны, что приводит к утечке внутриклеточного вещества, например, АТФ, протонов и анионов, что приводит к осмотическому дисбалансу [161, 180].

По результатам исследования, можно предположить, что ингибирующий эффект фракции виолацеина в отношении неочищенной АТФ-азы *S. michiganensis* может приводить к нарушениям проницаемости мембран. Однако, следует учесть, что в нашем исследовании мы не оценивали изменение рН при внесении фракции пигмента. Возможно, что эффект может быть связан с изменением рН [161].

В ходе исследования [161] было выявлено, что аборигенный штамм *J. lividum* ВКМ В-3705D проявил бактериостатическую активность в отношении тест-культуры *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402, так как при совместном культивировании исследуемых микроорганизмов было выявлено, что на 24 час инкубации численность *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402 подавляется пигментообразующим штаммом *J. lividum* ВКМ В-3705D. Однако, для культур в смеси выявлены одинаковые константы скорости роста, деления и время генерации численности колониеобразующих единиц ($\lg(\text{КОЕ}/\text{мл})$). Можно предположить, что между янтинобактерией и клавибактером в емкости было достигнуто равновесие в численности. При этом, удельный прирост *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402 в присутствии *J. lividum* ВКМ В-3705D оказался ниже, чем для чистой культуры на 36,4%. А для *J. lividum* ВКМ В-3705D – на 37,5% выше, чем для чистой. При совместном культивировании снизились константы скорости роста и деления у штамма *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402, относительно чистой культуры, на 23,0% и 21,0% соответственно [161]. Время

генерации увеличилось на 28,6%. Для *J. lividum* ВКМ В-3705D выявлено повышение констант скорости роста и деления в присутствии *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402. Можно предположить, что бактериостатическая активность янтинобактерии является причиной того, что совместно с *J. lividum* ВКМ В-3705D инокулят *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 не дал выраженной колонизации на фрагментах плода томата [161].

Известно, что бактерии *J. lividum* образуют пигмент виолацеин, и его производные. В научной литературе описаны его антибиотические свойства в отношении плесневых грибов, бактерий и др. Тем не менее, нами не было найдено данных о влиянии пигмента на представителей *C. michiganensis*, несмотря на то, что имеются исследования влияния соединения на грамположительные штаммы бактерий. Так, в ходе исследования, была получена фракция виолацеина в ДМСО, и было выявлено, что наибольшее значение степени подавления удельного прироста популяции *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 относительно контроля составило 57,7% (вариант неразбавленной фракции в ДМСО, содержание которого 0,15% от объема среды). Другие варианты проявили меньшую эффективность. Таким образом, бактериостатическая активность штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D в отношении *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 может быть связана со способностью янтинобактерии к биосинтезу виолацеина [161].

Исходя из того, что виолацеин в ряде случаев, описанных в научных работах, проявлял большую активность в отношении грамположительных тест-культур, чем грамотрицательных, можно предположить, что пигмент может оказывать влияние на морфологические свойства клетки [161].

При оценке такой гипотезы с помощью сканирующей зондовой микроскопии, было выявлено, что клетки, выдержанные в фракции виолацеина характеризуются снижением шероховатости и высоты клеток. Это может быть связано с тем, что снижается способность клеток сохранять жесткую форму, из-за чего она «провисает», но при этом сохраняет общую поверхность и объем [161]. Известно, что пигмент связывается с липосомами

и повышает проницаемость мембраны, что приводит к утечке внутриклеточного вещества [180]. Это может быть причиной «провисания» клетки.

Нами было предположено, что виолацеин оказывает влияние на активность АТФ-азы, так как это может привести к чрезмерной проницаемости мембран и к гидролизу фермента. В ходе оценки влияния фракции виолациена в ДМСО было выявлено, что концентрированный пигмент статистически значимо снизил активность фермента на 31,5% относительно контрольного варианта. При этом, растворитель (ДМСО) снизил активность всего на 8,3%. Можно предположить, что ингибирующий эффект фракции в отношении неочищенной АТФ-азы *C. michiganensis* может приводить к нарушениям проницаемости мембран [161].

Таким образом, виолацеин потенциально может оказывать влияние на активность мембран-связанных ферментов, например, аденозинтрифосфатазы (КФ 3.6.1.3), или АТФ-азы, у бактерии *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402. Это может привести к чрезмерной проницаемости мембран и к гидролизу фермента. Во многих случаях аденозинтрифосфатаза (КФ 3.6.1.3) связана с компонентами мембран, участвующих в системе окислительного фосфорилирования или ионного транспорта. АТФ-азы способствуют гидролизу молекулы АТФ до АДФ с высвобождением фосфатной группы.

Полученные результаты в ходе исследования [161] обладают практической значимостью, так как *Clavibacter michiganensis* является карантинным организмом как в Европе, так и в Российской Федерации [189].

Clavibacter michiganensis – это грамположительная актинобактерия, которая вызывает заболевания множества сельскохозяйственных культурных растений, среди которых наиболее значимое – увядание томатов. При этом, растения, пораженные клавибактером проявляют различные симптомы в зависимости от возраста растения, сорта, условий окружающей среды, и активности самого возбудителя [190]. В работе Wang, Y. с соавторами описано, что при поражении семян патоген непосредственно внедряется в

сосудистую ткань проростков томатов и вызывает увядание растения. В случае заражения через устьица, включая гидатоды, возбудитель вызывает некроз краев листьев и их частичное увядание. Согласно тому же источнику, на ранней стадии заражения растение характеризуется односторонним увяданием, или проявляет эффект обожженного края листа сначала с нижней стороны, а затем с обеих сторон. По мере прогрессии заболевания, увядает весь саженец. На поздней стадии, пораженный стебель расщепляется и образуются язвы с коричневыми и полыми сосудистыми пучками. Следует отметить, что одностороннее увядание листьев и растений в фазе заражения от ранней до средней – уникальное явление для бактериального рака томатов - клавибактериоза [191]. Сведения о молекулярно-генетических механизмах патогенной функции клавибактера имеют большое значение процедуры разработки средств защиты растений.

Предполагается следующий молекулярный механизм патогенности *S. michiganensis*: штамм NCPPB382 содержит две плазмиды (*pSM1* (27 т.п.н) и *pSM2*) которые несут гены, отвечающие за вирулентность [192, 193]. При этом, в хромосоме имеется большой участок с низким содержанием пары G+C, который можно разделить на две области: *chr* – область, которая содержит несколько сериновых протеаз, и *tomA* – кластер генов, кодирующих белки, которые участвуют в поглощении сахаров и биосинтезе фермента, обозначенного как томатыназа. Данный фермент может быть важнейшим фактором вирулентности, так как томатыны – сапонины, которые относятся к группе специализированных метаболитов растений, содержащихся в тканях томата (рис. 34), и играющих роль защиты от возбудителей заболеваний [194].

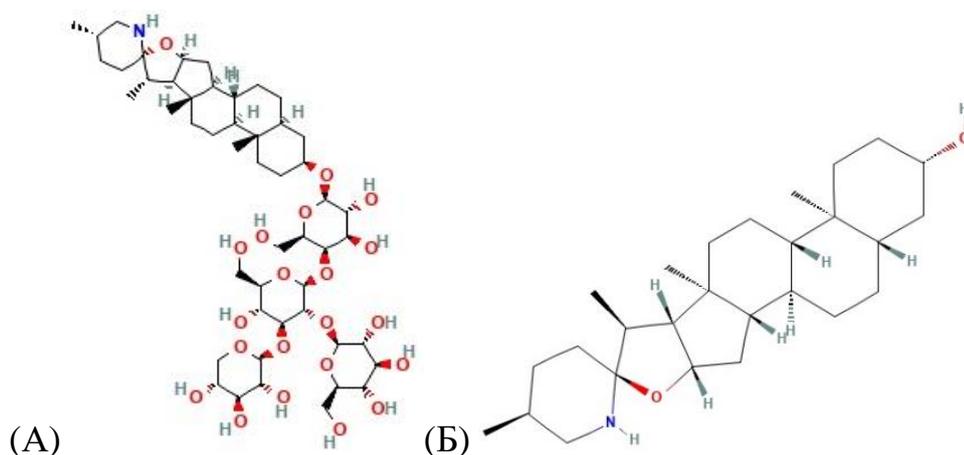


Рисунок 34. Структура молекул сапонина α -томатина (А) и томатидина (Б), показан на PubChem в открытом доступе

[<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/28523>;

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65576>, cited 2024, Mar., 19].

Заражение и колонизация плода томата клавибактером может осуществляться на всех стадиях роста, включая цветение и завязывание плода. Однако, согласно Wang Y. с соавторами, случаев заражения цветков томатов не было зафиксировано [191]. В том же источнике приводятся сведения о том, что контаминация плодов играет более важную роль чем поражение стебля.

Поражая растение, клавибактер сталкивается с системой защитных механизмов своей жертвы. В работе Valaji с соавторами [195], описано, что инфекция запускает каскад молекулярно-генетических процессов, что приводит к образованию активных форм кислорода, изменению рН среды, активации протеинкиназ и индукции генов, отвечающих за патогенез.

Реакция растения на заражение клавибактерией может быть инициирована сигнальными молекулами, или так называемых молекулярными паттернами-компонентов клеток, обозначаемых как MAMPs/PAMPs и DAMPs (microbe- or pathogen-associated molecular patterns, damage-associated molecular patterns), и специализированными рецепторами – киназами [196]. Среди сигнальных молекул, выступающих в качестве индукторов иммунных процессов выделяют пептидогликан, который является обязательным

компонентом клеток грамположительных бактерий [196]. Имеются сведения о том, что ростки томата, обработанные пептидогликаном, оказались устойчивее к возбудителям заболеваний растений [197]. Следовательно, можно предположить, что растение активирует систему защиты от заражения за счет узнавания компонентов бактериальной клеточной стенки. Кроме того, для растений описан механизм индуцированной системы резистентности, который, в случае томата, может быть связан с выделением жасмоновой кислоты или этилена [198].

Таким образом, растения, в частности томат, способны противостоять заражению патогенами. Однако такие системы не всегда эффективны, так как фитопатогены способны к адаптации и поражению ослабленных организмов.

В сельском хозяйстве используют препараты для защиты растений для того, чтобы предотвратить заболевания растений. Средства можно разделить на химические и биологические, и часто встречаются комбинированные варианты. Препараты, основанные на микроорганизмах и их вторичных метаболитах, проявляют антагонистические свойства в отношении возбудителей заболеваний. При этом, подавляя конкурента, антагонист не оказывает негативного воздействия на растение. В некоторых случаях, используемый штамм даже стимулирует рост корневой системы или надземной части.

Согласно открытой информации в Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации по состоянию на 22 августа 2023 год, в качестве компонентов средств защиты растений используются микроорганизмы – представители родов *Beauveria*, *Streptomyces*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas* и *Acremonium*. Тем не менее, в 2022 году было всего три рода: *Bacillus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas* [5]. Ассортимент микроорганизмов может увеличиться за счет новых перспективных штаммов. Например, имеются сведения о том, что бактерия *Bacillus pumilus* способна подавлять фитопатогенные грибы: *Arthrobotrys*

conoides, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* и *Fagopyrum esculentum*. Кроме того, авторы сообщают, что данный микроорганизм способен к стимуляции роста растений [199].

Таким образом, остается необходимым поиск новых микроорганизмов, исследования их свойств, а также, создание коллекций для разработки биотехнологических процессов. Комбинация новых микроорганизмов, которые достигают сопряженности в смеси позволит предложить эксклюзивный состав для биопрепаратов.

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

Методом перпендикулярных штрихов выявлено что, на второй день наблюдений в месте пересечения штрихов отсутствует пигментация у культуры *J. lividum* ВКМ В-3705D (рис. 35). При дальнейшей инкубации выявлено, что снижается интенсивность пигментации *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D (рис. 35).

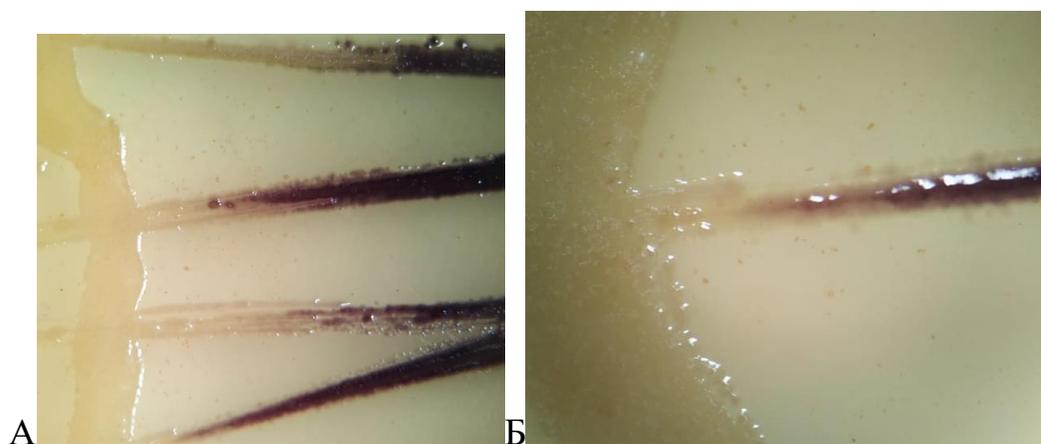


Рисунок 35. Антагонистический эффект *Pseudomonas chlororaphis* ВКМ В-3546D в отношении тест-культуры *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D, выявленный с использованием метода перпендикулярных штрихов на вторые сутки (А) и на седьмые (Б)

При совместном культивировании в жидкой питательной среде, выявлена бактериостатическая активность *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D в отношении *J. lividum* ВКМ В-3705D (рис. 36).

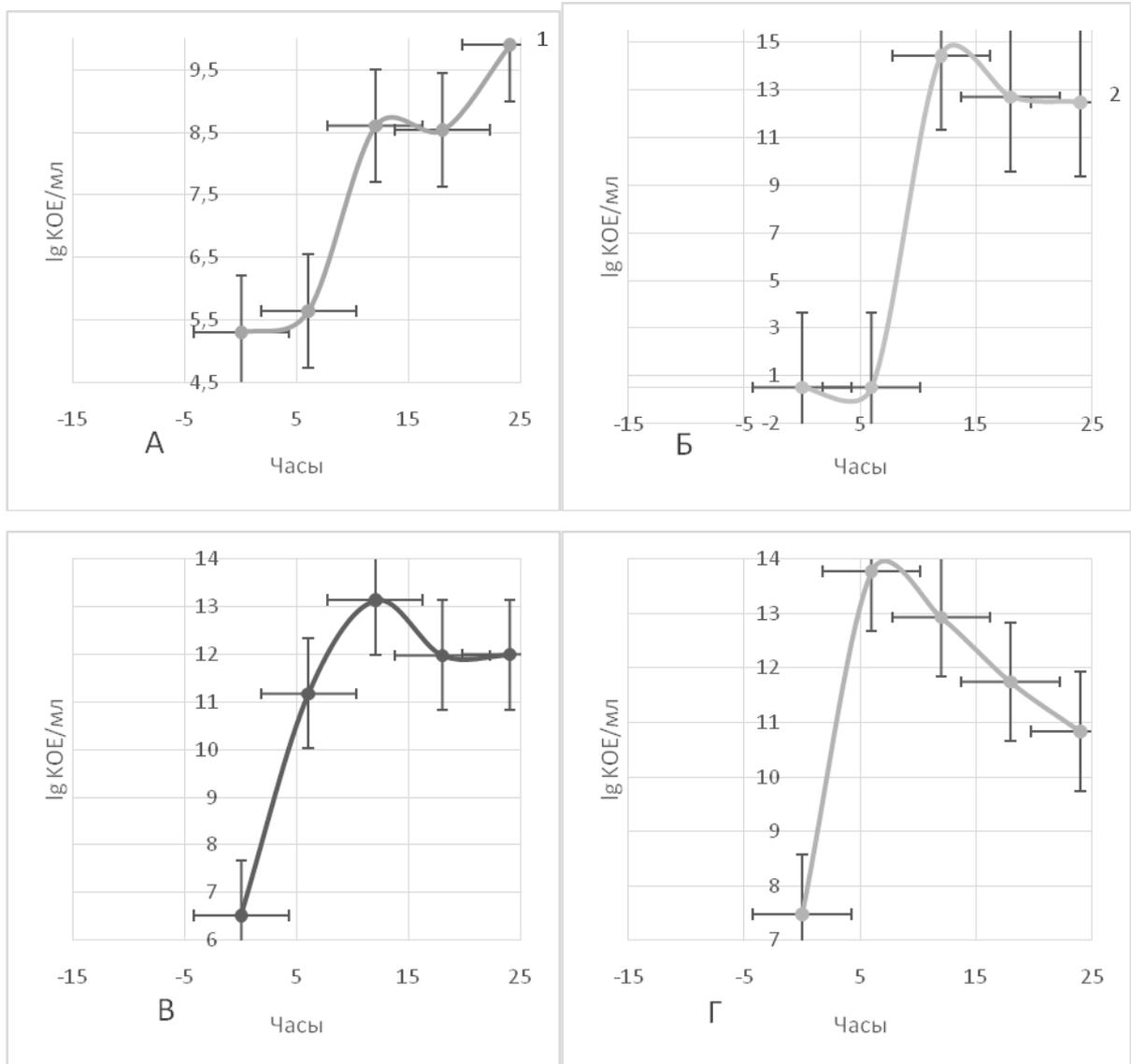


Рисунок 36. Изменение численности КОЕ *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D где: А – при отдельном культивировании, Б – культивирование в присутствии *Pseudomonas chlororaphis* ВКМ В-3546D, изменение численности КОЕ *Pseudomonas chlororaphis* ВКМ В-3546D, где: В – при отдельном культивировании, Г – культивирование в присутствии *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D.

Известно, что бактерии *Pseudomonas chlororaphis* синтезируют антибиотики, такие как феназины, пирролнитрин, 2-гексил-5-пропилрезорцин,

сидерофоры (пиовердин и ахромобактин), а также сложную смесь летучих органических соединений (ЛОС), которые эффективно борются с некоторыми патогенами растений, нематодами и насекомыми. Это объясняет растущий интерес к *P. chlororaphis* в коммерческих и биотехнологических целях [107].

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

В ходе оценки противогрибковой активности *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D в присутствии *J. lividum* ВКМ В-3705D (смесь *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D-*J. lividum* ВКМ В-3705D) выявлено, что при совместном культивировании антагонистический эффект оказался лучше, чем у чистой культуры псевдомонады (рис. 37).

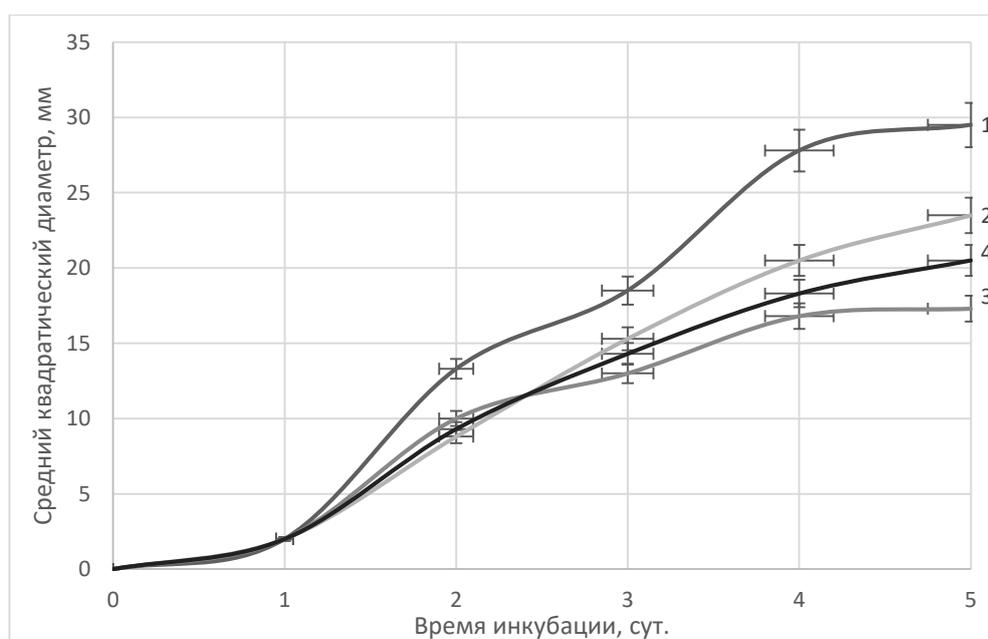


Рисунок 37. Изменение среднего квадратического диаметра колоний *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754 как показатель роста гриба где: 1 – контроль (без исследуемых культур); 2 – в присутствии *Pseudomonas chlororaphis* ВКМ В-3546D; 3 – в присутствии *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D; 4 – в присутствии смеси «*P. chlororaphis* ВКМ В-3546D- *J. lividum* ВКМ В-3705D».

Скорость роста (K) плесневого гриба в присутствии смеси оказалась на 32,0% ниже, чем у контроля, тогда как в варианте с чистой культурой

псевдомонады – на 21,0% (рис. 38. А). Средний прирост (X) колонии *A. unguis* ВКМ F-1754, культивируемого с «*P. chlororaphis* ВКМ В-3546D-*J. lividum* ВКМ В-3705D» составил 33,0%, что ниже варианта с псевдомонадой на 17,0% относительно контрольного (рис. 38. Б).

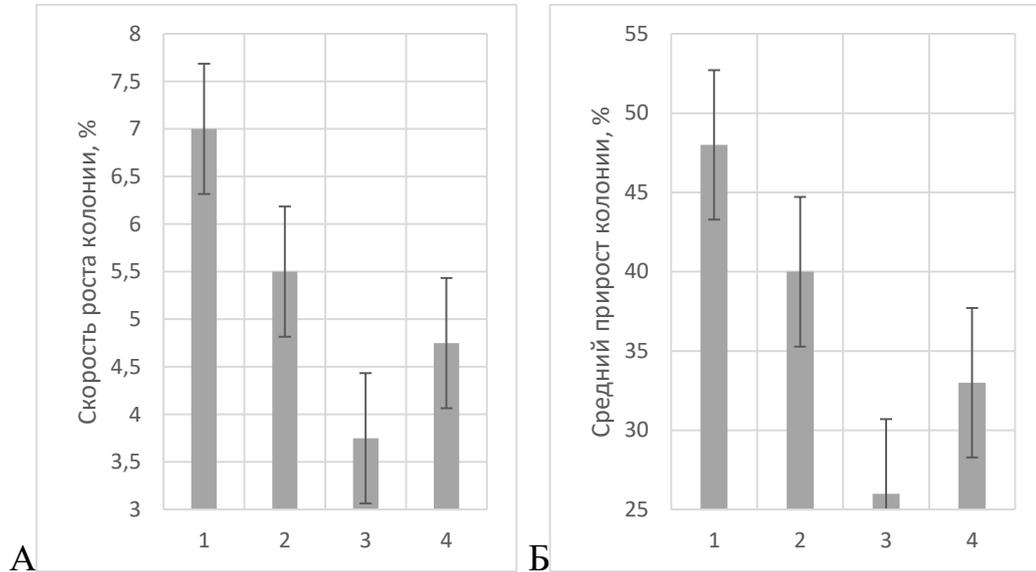


Рисунок 38. Скорость роста (А) и средний прирост (Б) колонии плесневого гриба *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754, где: 1 – контроль (без исследуемых культур); 2 – в присутствии *Pseudomonas chlororaphis* ВКМ В-3546D; 3 – в присутствии *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D; 4 – в присутствии смеси «*P. chlororaphis* ВКМ В-3546D- *J. lividum* ВКМ 3705D».

В свою очередь, скорость роста (K) колонии и средний прирост (X) *A. unguis* ВКМ F-1754 в присутствии *J. lividum* ВКМ В-3705D оказались ниже контрольного варианта на 46,0% (рис. 38. А, 38. Б). Тогда как смесь «*P. chlororaphis* ВКМ В-3546D - *J. lividum* ВКМ В-3705D» проявила меньшую активность в сравнении с чистой культурой *J. lividum* ВКМ В-3705D.

В ходе исследования выявлено, что *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D подавляет как рост, так и способность к синтезу пигмента *J. lividum* ВКМ В-3705D. Также было обнаружено, что при совместном культивировании *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D с *J. lividum* ВКМ В-3705D у первой культуры значительно увеличились константы скорости роста культуры и деления

клеток, а время удвоения биомассы уменьшилось по сравнению с её отдельным культивированием. Из этого можно сделать вывод что, используя в качестве культуры-компаньона *J. lividum* ВКМ В-3705D, можно увеличить количество биомассы культуры *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D с меньшими затратами ресурсов по сравнению с монокультурой.

Противогрибковая активность смеси бактерий выше, чем активность у чистой *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D, но ниже, чем у чистой *J. lividum* ВКМ В-3705D. Это можно объяснить тем, что при контакте с *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D янтинобактерия прекращает синтезировать пигмент виолацеин, который и оказывает высокую противогрибковую активность.

Таким образом, бактерия *J. lividum* ВКМ В-3705D может быть потенциальным компонентом биопрепарата для защиты растений наряду с *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D. Однако, существенной частью формирования гипотезы являются испытания смеси микроорганизмов в полевых условиях на модельных растениях. Кроме того, в ходе дальнейшей разработки состава фунгицида, несколько штаммов микроорганизмов может быть более устойчивым, чем монокультуры за счет достижения сопряженности видов в популяции.

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

В ходе оценки влияния штаммов *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D и *Pseudomonas 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. 39).

Выявлено, что средний прирост длины стебля пшеницы на 15 сутки несущественно различается между вариантами (рис. 40).

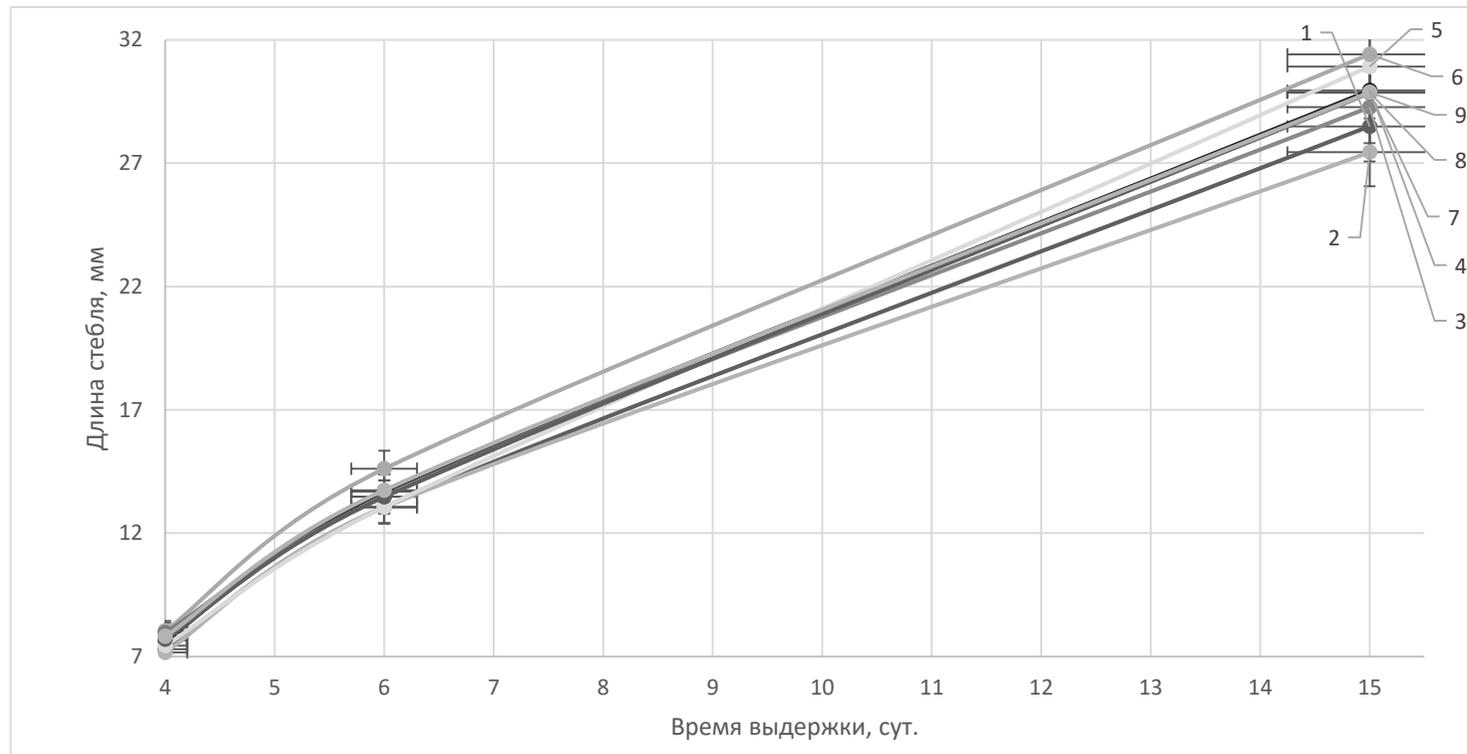


Рисунок 39. Изменение усредненной длины стебля пшеницы яровой как показатель роста, где: 1 – контрольный вариант; 2 – концентрированная суспензия *J. lividum* ВКМ В-3705D ($1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл); 3 – разбавленная суспензия *J. lividum* ВКМ В-3705D в соотношении 1:10; 4 – разбавленная суспензия *J. 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

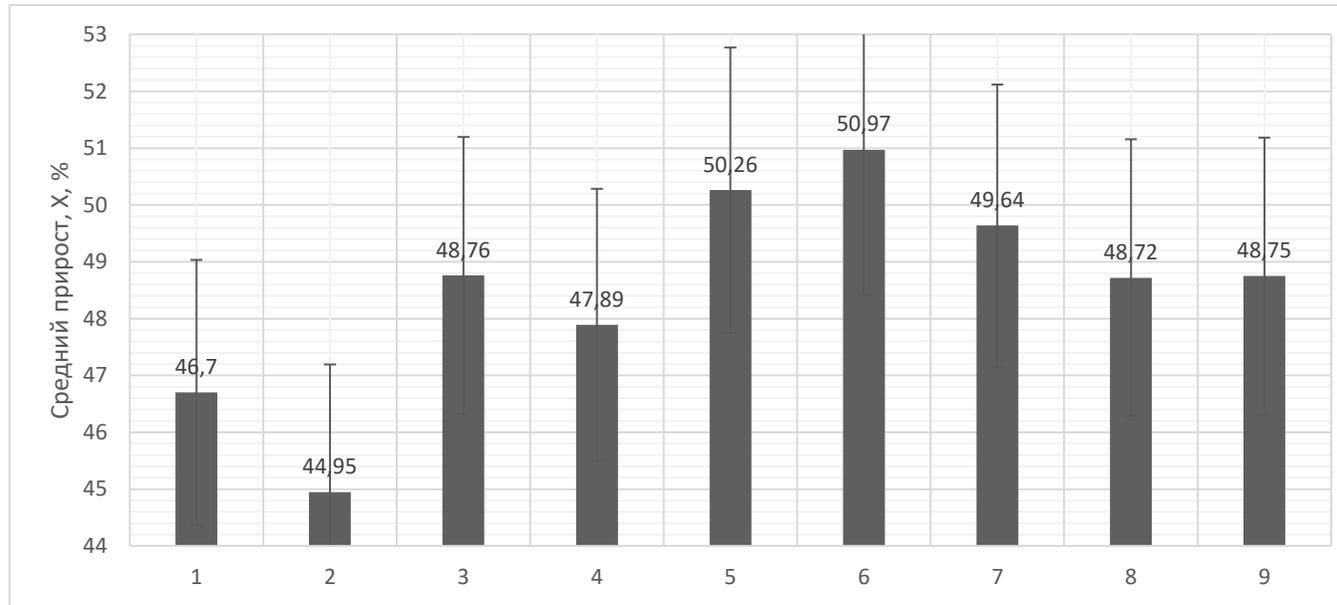


Рисунок 40. Средний прирост длины стебля пшеницы, где:

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 *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D в соотношении 1:10, оказался тяжелее контрольного на 10,86% (рис. 41). В свою очередь, варианты, обработанные концентрированной суспензией *Pseudomonas chlororaphis* ВКМ В-3546D ($1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл) и разбавленной суспензией *Pseudomonas chlororaphis* ВКМ В-3546D в соотношении 1:10, оказались тяжелее контрольного на 16,53% и 10,07%, соответственно.

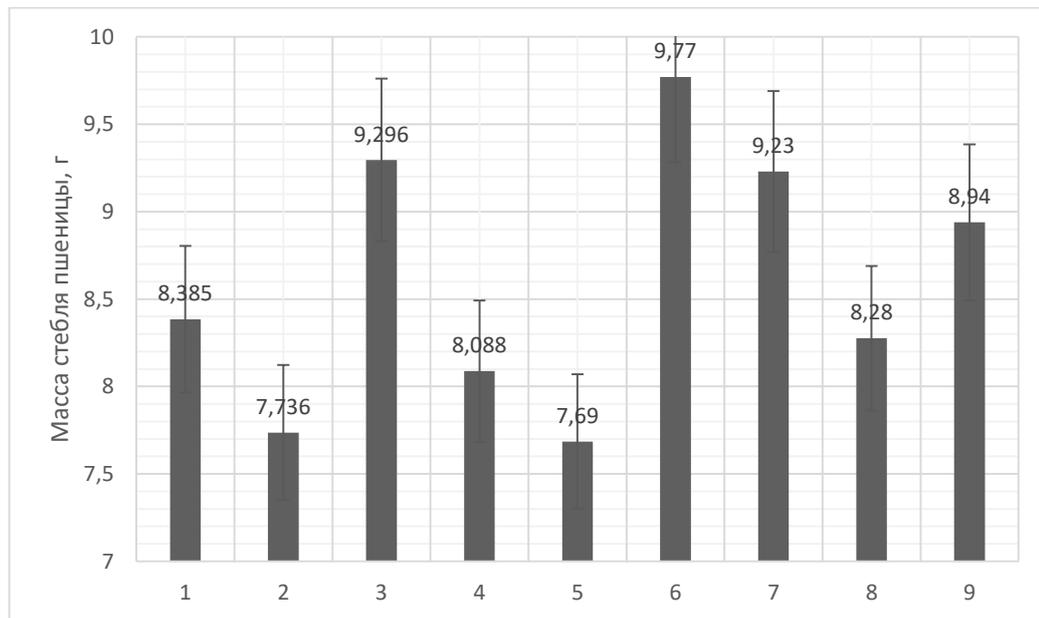


Рисунок 41. Масса стебля пшеницы, где:

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

Бактерии *Pseudomonas* sp. 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 [107].

Таким образом, можно предположить, что культуры *P. chlororaphis* ВКМ В-3546D и *J. lividum* ВКМ В-3705D могут быть перспективными компонентами биопрепарата для растениеводства. Однако, необходимы дальнейшие испытания эффективности в полевых условиях.

3.13. Цитотоксическая активность фракции виолацеина на примере линий клеток опухолей

В таблице 21 представлены средние арифметические значения показателей оптической плотности растворов реагента МТТ после инкубации с клетками исследуемых групп с указанием стандартных отклонений и стандартных ошибок среднего. В таблицах 21-24 показано, что стандартные ошибки измерения ($\varepsilon\%$) для всех вариантов оказались ниже 3,0%, что свидетельствует о высокой точности полученных данных.

На рис. 42. А представлено изменение жизнеспособности клеток опытных групп в условиях культивирования в течение 72 часов с фракцией виолацеина разной концентрации. Полученные результаты позволяют утверждать, что степень влияния на жизнеспособность клеток зависит от концентрации пигмента в растворе. Так, степень ингибирования жизнеспособности повышается по мере увеличения концентрации (рис. 42. Б.)

Таблица 21. Особенности пролиферации клеток HeLa в условиях культивирования в течение 72 часов в присутствии фракции виолацеина в различных концентрациях (МТТ тест)

Варианты	Среднее арифметическое значение, M	Стандартное отклонение, σ	Стандартная ошибка среднего, $\varepsilon\%$
1	2	3	4
Контроль	1,78	0,23	0,09
ДМСО, 5%	0,007	0,002	0,001
100,0 мкМ	1,6	0,18	0,07
250,0 мкМ	1,29	0,25	0,1
500,0 мкМ	0,6	0,14	0,06
750,0 мкМ	0,37	0,12	0,05
1000,0 мкМ	0,15	0,08	0,03

На рисунке 42. А представлен график, иллюстрирующий зависимость жизнеспособности клеток HeLa от концентрации виолацеина в среде, при этом, IC_{50} составила 504,02 мкМ или 173,0 мг/мл.

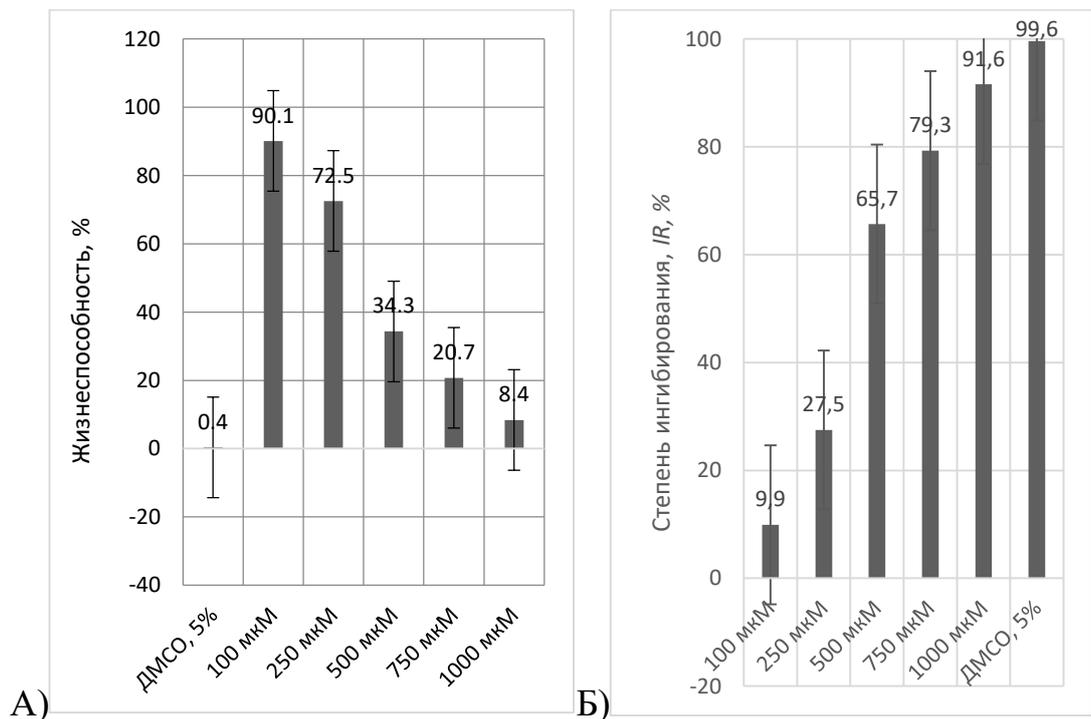


Рисунок 42. Изменение жизнеспособности клеток HeLa (А) и степени ингибирования (Б) клеток опытных групп в условиях культивирования с растворами виолацеина разной концентрации.

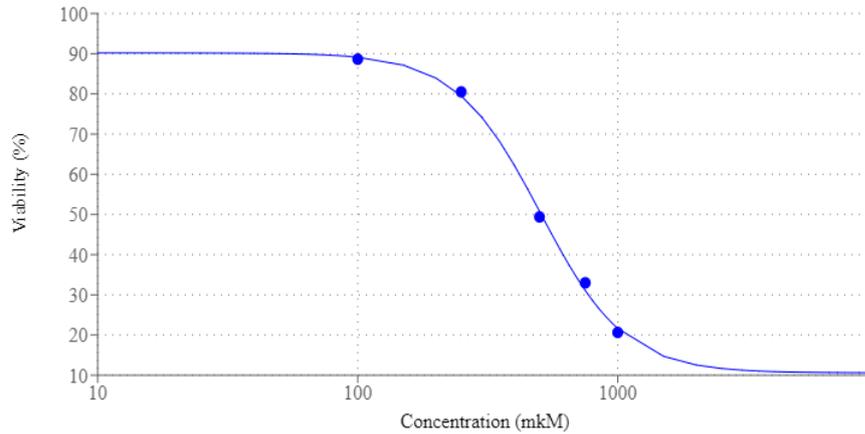


Рисунок 43. Зависимость жизнеспособности клеток от концентрации виолацеина (dose-response curve, $IC_{50} = 504,02$ мкМ, или 173,0 мг/мл) ("Quest Graph™ IC50 Calculator." ААТ Bioquest, Inc., <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>)

В ходе оценки цитотоксической активности фракции виолацеина в ДМСО на примере линии клеток Jurcat выявлено, что жизнеспособность незначительно снижается при внесении вещества в концентрациях от 100,0 до 500,0 мкМ, тогда как повышение концентрации до 750,0 и 1000,0 мкМ привело к большему снижению жизнеспособности (рис. 44. А).

Таблица 22. Особенности пролиферации клеток Jurcat в условиях культивирования в течение 24 часов в присутствии виолацеина в различных концентрациях (проточная цитофлуориметрия)

Варианты	Среднее арифметическое значение, M	Стандартное отклонение, σ	Стандартная ошибка среднего, $\varepsilon\%$
1	2	3	4
Контроль	1,1	0,015	0,006
100,0 мкМ	0,7	0,05	0,02
250,0 мкМ	0,7	0,09	0,04
500,0 мкМ	0,7	0,08	0,03
750,0 мкМ	0,6	0,1	0,04
1000,0 мкМ	0,54	0,1	0,04

Степень ингибирования при использовании неочищенного экстракта виолацеина жизнеспособность клеток Jurcat составила 36,6% для

концентрации 100,0-500,0 мкМ, 45,0% для концентрации 750,0 мкМ и 51,0% для концентрации 1000,0 мкМ.

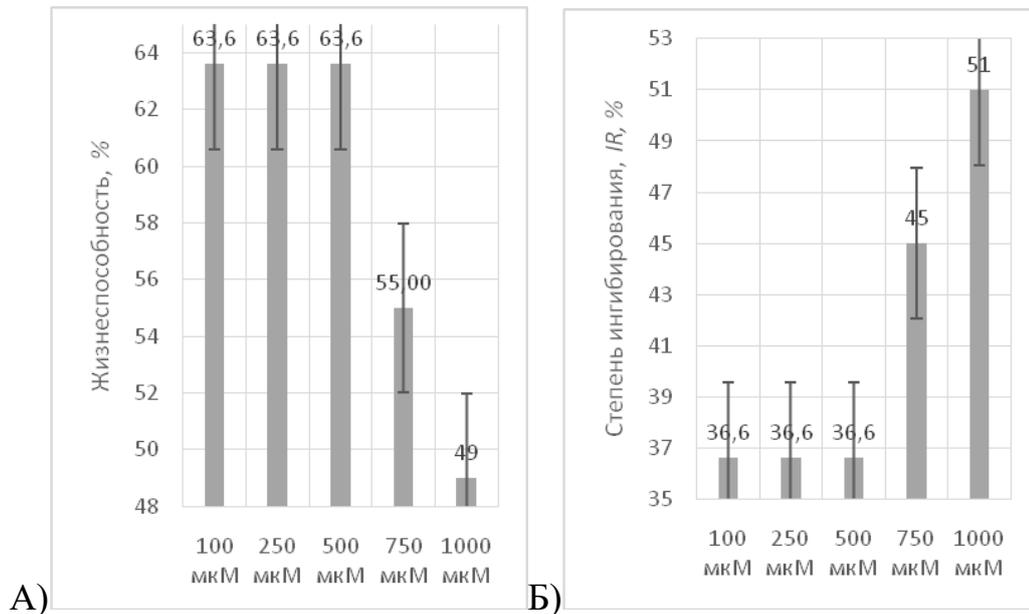


Рисунок 44. Изменение жизнеспособности клеток Jurcat (А) и степени ингибирования (Б) клеток опытных групп в условиях культивирования с растворами виолацеина разной концентрации.

В ходе исследования чувствительности линии клеток Raji к неочищенному экстракту виолацеина выявлено, что при увеличении концентрации экстракта жизнеспособность клеток снижается (рис. 45. А), а степень ингибирования – увеличивается (рис. 45. Б).

Таблица 23. Особенности пролиферации клеток Raji в условиях культивирования в течение 24 часов в присутствии виолацеина в различных концентрациях (проточная цитофлуориметрия)

Варианты	Среднее арифметическое значение, M	Стандартное отклонение, σ	Стандартная ошибка среднего, $\varepsilon\%$
1	2	3	4
Контроль	0,87	0,02	0,01
100 мкМ	0,64	0,08	0,03
250 мкМ	0,6	0,07	0,03
500 мкМ	0,46	0,03	0,01
750 мкМ	0,4	0,06	0,02
1000 мкМ	0,4	0,03	0,01

При увеличении концентрации виолацеина цитотоксическая активность повышается, однако не было выявлено существенных различий между концентрациями 750,0 мкМ и 1000,0 мкМ, в обеих группах степень ингибирования составила 54,0% (рис. 45. Б).

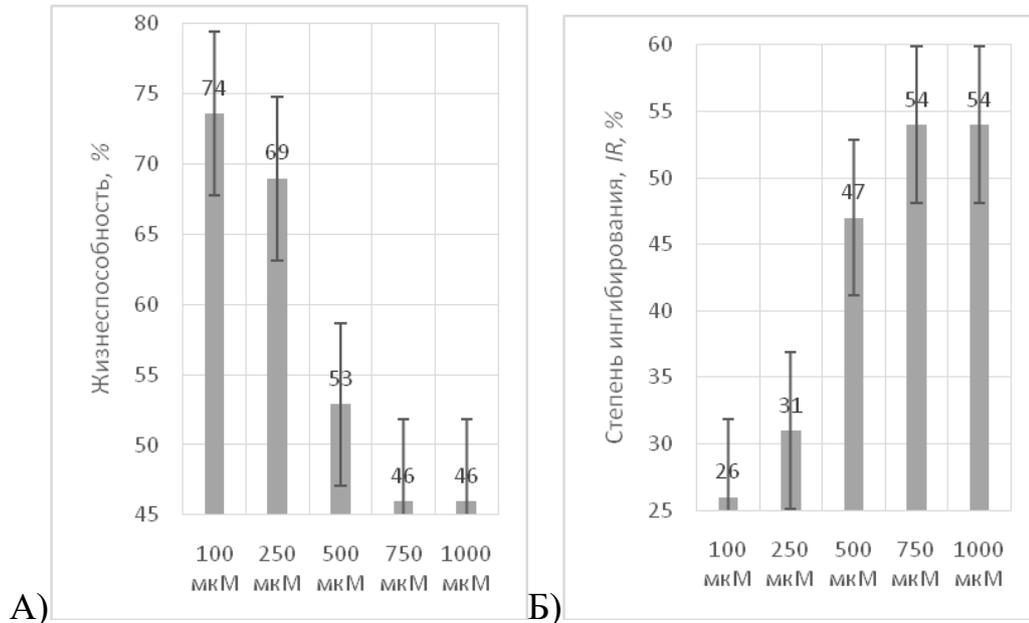


Рисунок 45. Изменение жизнеспособности клеток Raji (А) и степени ингибирования (Б) клеток опытных групп в условиях культивирования с растворами виолацеина разной концентрации.

При оценке чувствительности линии клеток TF-1 к фракции виолацеина в ДМСО выявлено, что внесение в среду 100,0 мкМ вещества не оказывает воздействия на изменение жизнеспособности клеток. При повышении концентрации пигмента до 250,0 мкМ степень ингибирования повысилась до 12,0% (рис. 46. Б), и увеличивалась по мере повышения концентрации. Так, для группы, с концентрацией пигмента 1000,0 мкМ степень ингибирования составила 50,0%. Полученные данные свидетельствуют о дозозависимом эффекте.

Таблица 24. Особенности пролиферации клеток TF-1 в условиях культивирования в течение 24 часов в присутствии виолацеина в различных концентрациях (Проточная цитофлуориметрия)

Варианты	Среднее арифметическое значение, M	Стандартное отклонение, σ	Стандартная ошибка среднего, $\varepsilon\%$
1	2	3	4
Контроль	0,8	0,01	0,006
100,0 мкМ	0,8	0,08	0,03
250,0 мкМ	0,7	0,01	0,003
500,0 мкМ	0,6	0,07	0,03
750,0 мкМ	0,5	0,05	0,02
1000,0 мкМ	0,4	0,04	0,02

Таким образом, в ходе оценки цитотоксической активности фракции виолацеина в ДМСО показано влияние на жизнеспособность нескольких линий клеток. При этом наибольшее значение степени ингибирования жизнеспособности выявлено для клеток линии HeLa и составило 99,6% при концентрации экстракта виолацеина 1000,0 мкМ. Для клеток линий Jurkat, Radj1 и TF-1 степень ингибирования составила около 50,0% при той же концентрации экстракта виолацеина, а при уменьшении концентрации вещества степень ингибирования жизнеспособности также снижалась.

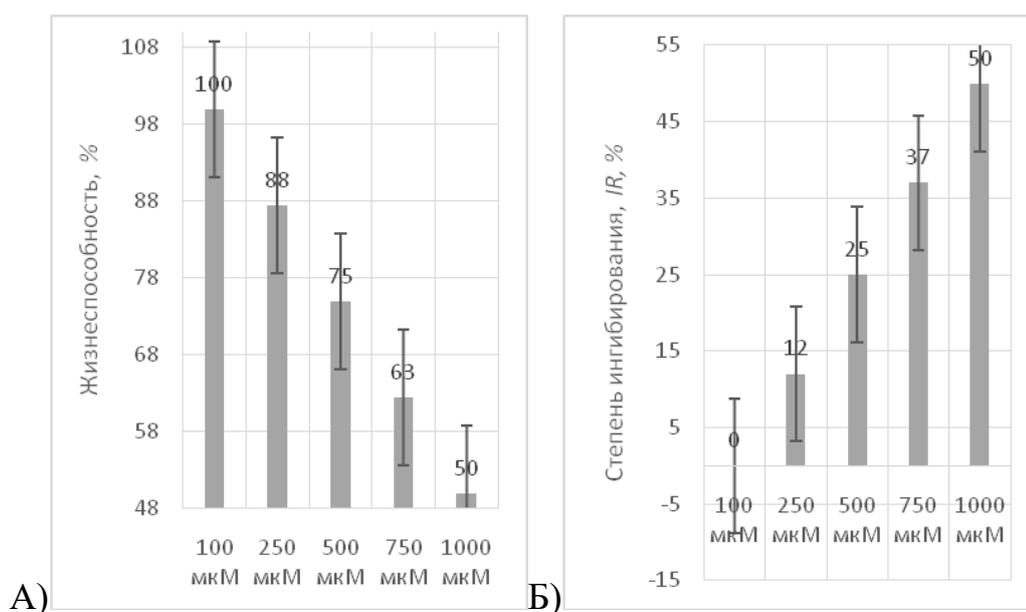


Рисунок 46. Изменение жизнеспособности клеток TF-1 (А) и степени ингибирования (Б) клеток опытных групп в условиях культивирования с растворами виолацеина разной концентрации.

Известно, что многие пигменты микробного происхождения обладают цитотоксической активностью и, как следствие, противоопухолевым потенциалом [90, 200-203]. Описанные эффекты являются предпосылкой разработки способов создания производных пигментов и составов на их основе с повышенной противораковой активностью. Например, имеются сведения об оценке эффективности галогенов продигозина в отношении четырех вариантов клеточных линий карциномы ($IC_{50} = 0,62-1,3$ мкг/мл). При этом ранее были описаны результаты цитотоксической активности чистого продигозина на 60 линиях клеток, где IC_{50} в среднем составлял 0,68 мкг/мл [204]. В свою очередь, в работе Kanelli с соавт. 2022 года описана цитотоксическая активность наноконструкции на основе виолацеина с парамагнитным оксидом железа и полимолочной кислоты, в отношении линий клеток глиобластомы и меланомы ($IC_{50} = 221,3$ и $201,6$ мкг/мл соответственно) [205]. Кроме того, возможно, предпосылкой для разработки способа инкапсуляции виолацеина в наноконструкции липидов с использованием хитозан-гидроксипропилметилцеллюлозы в качестве матрицы [206], стал известный факт высвобождения из клетки пигмента в составе липидных везикул [137].

В работе Miloshevos E., с соавт., описана активность виолацеина в отношении клеточных линий остеосаркомы и рабдомиосаркомы [207]. Авторы исследования оценивали цитотоксичность методами МТТ и FET. Также в работе приводятся сведения об исследовании миграции клеток с помощью оценки заживления ран. С помощью флуориметрического анализа оценено влияние виолацеина на образование внутриклеточных активных форм кислорода.

Таким образом, в научной литературе рассматривается противоопухолевая значимость микробных пигментов, в том числе виолацеина. Известны возможные механизмы действия виолацеина, которые

различаются в зависимости от используемых моделей клеточных линий. Так, активность пигмента может быть опосредована:

- 1 – блокированием активации Akt, что приводит к апоптозу клеток [208]. Согласно Martelli с соавт., *Akt* – представитель класса серин/треониновых протеинкиназ AGC с массой 56 кДа. Известно, что *Akt* участвует в предотвращении гибели клеток как за счет воздействия на механизм апоптоза, так и за счет экспрессии других генов, участвующих в механизмах пролиферации и выживании, аутофагии, ангиогенеза, подвижности и экзоцитоза [209];
- 2 – активацией каспазы 2, 3, 7 и 8 [14, 210];
- 3 – модификацией сульфгидрильных групп;
- 4 – гиперполяризацией мембраны митохондрий;
- 5 – транскрипцией генов-мишеней ядерного фактора κВ (NF-κВ);
- 6 – активацией митоген-активируемой протеинкиназы Р38 (MAP);
- 7 – стимуляцией выработки TNF-α;
- 8 – повышением экспрессии опухолевого супрессора p53;
- 10 – выработкой активных форм кислорода (АФК);
- 11 – была предложена модель механизма клеточной гибели, показывающая влияние виолацеина на индукцию апоптоза, используя эндоплазматический ретикулум, линейаризацию Гольджи и «подковообразные» ядра;
- 12 – влиянием на активность протеинфосфатаз.

В работе Bromberg с соавт. описано, что МТТ-тест позволяет судить о влиянии на митохондриальную активность сукцинатдегидрогеназы, кофакторов и пиридиновых нуклеотидов НАДН и НАДФН, так как этот метод основан на овсстановлении тетразолиевой соли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромида в ходе метаболических процессов (Bromberg, 2005). Тем не менее, согласно Berridge с соавт. локализация активности МТТ в клетке происходит за счет ингибирования процессов трансформации сукцинатдегидрогеназы и НАДН и НАДФН-зависимых механизмов: авторами выявлено, что большая часть клеточного восстановления происходит вне

внутренней мембраны митохондрий и включает НАДН и НАДФН [211]. Таким образом, нельзя предполагать влияние виолацеина на активность сукцинатдегидрогеназы на основании МТТ-теста.

Имеются сведения о том, что внутрибрюшные дозы виолацеина в концентрации 0,1 и 1 мкг/кг на протяжении всей жизни животных оказывали существенный противоопухолевый эффект (асцитная опухоль Эндрю), способствовали выживанию и не приводили к нежелательным последствиям *in vivo* [14].

Несмотря на то, что существуют данные о предполагаемых механизмах влияния виолацеина, в научной литературе не обнаружено сведений о влиянии пигмента на активность ферментов центрального метаболизма, таких как сукцинатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы и др.

Кроме того, способность пигмента стимулировать одни линии клеток (клетки яичников китайского хомячка) и снижать жизнеспособность других (клетки опухолей) – это привлекательное направление исследований. В настоящее время нет однозначного механизма, который объяснял бы это явление.

Таким образом, из реки Везёлка города Белгород был выделен штамм пигментообразующей бактерии. Микроорганизм был идентифицирован и депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов как *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D [128].

В ходе изучения признаков культуры было выявлено, что штамм представлен грамотрицательными палочковидными подвижными бактериями, не образующих споры. Существенно расширен список результатов тестов для идентификации бактерий рода *Janthinobacterium*, а именно, добавлено 39 признаков в том числе 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, дульцитола, 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-цетилглюкозамина, эскулина (железа-цитрата), ксилита, D-ликсозы, D-арабита и калия 2-кетоглюконата не выявлены в научной литературе и описаны впервые.

Штамм *J. lividum* ВКМ В-3705D способен подавлять рост некоторых тест-культур плесневых грибов *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754 и *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864, однако, наиболее существенным оказались результаты оценки бактериостатической активности в отношении *Clavibacterium michiganensis* ВКМ Ас-1402 при совместном культивировании: клавибактерия входит в перечень микроорганизмов, подлежащих экспортному контролю [128, 161].

Была получена фракция пигмента, идентифицированного как виолацеин, которая снижала ростовые свойства тест-культуры фитопатогена. Было выявлено, что фракция виолацеина способна снижать активность бесклеточного препарата АТФ-азы [161].

Выдвинуто предположение о том, что бактериостатическая активность *J. lividum* ВКМ В-3705D в отношении *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 обусловлена тем, что образуемый янтинобактерией пигмент виолацеин может влиять на проницаемость мембраны, а, исходя из того, что выявлен ингибирующий эффект на АТФ-азу клавибактерии, то возможно, что это может быть связано. Однако, необходимы дальнейшие исследования влияния очищенного пигмента, и использование молекулярно-генетических методов для оценки изменений в индукции кластеров гена. Кроме того, микробная клетка и её поверхность, представляет собой сложную структуру и совокупность системно действующих ферментов. Необходима оценка влияния виолацеина на другие мембранные ферменты для расширения спектра

возможных механизмов бактериостатической активности в отношении *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402.

В зависимости от температуры, влажности и других условий, ежегодно меняется фитопатогенный фон, поэтому существует риск распространения опасных возбудителей бактериозов на европейской части России, так как многие факторы вносят свой существенный вклад в снижение эффективности мер по защите растений [174]. Во многих странах *S. michiganensis* является серьезным карантинным возбудителем заболеваний растений. Выявленный бактериостатический эффект *J. lividum* ВКМ В-3705D может быть предпосылкой к разработке средства защиты растения.

Показано, что фракция виолацеина, образуемого штаммом *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D, обладает цитотоксической активностью в отношении таких линий клеток, как HeLa, Jurkat, Radji и TF-1. Выявлено, что эффект зависит от концентрации вещества. Так, при максимальной исследуемой концентрации (1000 мкМ) степень ингибирования жизнеспособности клеток линии HeLa составила 99,6%, а для клеток линий Jurkat, Radji и TF-1 степень ингибирования составила около 50%.

В научной литературе описаны возможные механизмы влияния виолацеина: индукция апоптоза клеток, активация каспазы-2, 3, 7 и 8, модификация сульфгидрильных групп, участие в конверсии АФК, гиперполяризация мембраны митохондрий и др. Однако данные, свидетельствующие о возможном влиянии виолацеина на активность ферментов центрального метаболического пути, включая цикл трикарбоновых кислот, отсутствуют.

Можно предположить, что пигмент обладает противоопухолевым потенциалом и, согласно литературным данным, не является потенциально опасным веществом. Необходимы дальнейшие исследования в таких направлениях, как поиск эффективного способа извлечения и очистки виолацеина из экстракта-сырца, а также оценка его активности в комбинации с действующими противоопухолевыми веществами как *in vivo*, так и *in vitro*.

Кроме того, необходимы исследования влияния пигмента на активность ферментов центрального метаболического пути: сукцинатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы и др, а также АТФ-азы.

ВЫВОДЫ

1. Из реки Везёлка города Белгород выделен штамм грамотрицательной 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 (ν) 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 , ν), 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 ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Указ Президента РФ от 28.01.2024 г. № 145 «О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации»;
2. Информация в «Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации», приведена по состоянию на 21 декабря 2022 г.;
3. Информация в «Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации», приведена по состоянию на 5 декабря 2023 г.;
4. Информация в «Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации», приведена по состоянию на 2 декабря 2024 г.;
5. Информация в «Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации», приведена по состоянию на 23 апреля 2025 г.;
6. Ramesh, C.; Vinithkumar, N.V.; Kirubakaran, R.; Venil, C.K.; Dufossé, L. Multifaceted Applications of Microbial Pigments: Current Knowledge, Challenges and Future Directions for Public Health Implications. *Microorganisms* 2019, 7, 186. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7070186>;
7. da Silva Barbirato, D., Fogacci, M.F., Guimarães, T.C. et al. Protective effect of *Chromobacterium violaceum* and violacein against bone resorption by periodontitis. *Clin Oral Invest* 27, 2175–2186 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00784-023-04891-w>;
8. Мартыянов С.В., Летаров А.В., Иванов П.А., Плакунов В.К. Стимуляция биосинтеза виолацеина в биопленках *Chromobacterium violaceum* под воздействием диметилсульфоксида. *Микробиология*. 2018. Т. 87. № 3. С. 325-329. DOI: 10.7868/S0026365618030102;
9. Захарова Ю.Р., Марцинечко А.С., Марченков А.М., Петрова Д.П., Федорова Г.А. Продукция фиолетового пигмента виолацеина психрофильными

- штаммами бактерий: экстракция и идентификация *Limnology and Freshwater Biology*. 2024. № 4. С. 1149-1154. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-1149;
10. Abhay Bajaj, Anand Kumar, Shivani Yadav, Gurwinder Kaur, Monu Bala, Nitin Kumar Singh, Rajendran Mathan Kumar, Natesan Manickam and Shanmugam Mayilraj. Isolation and characterization of a novel Gram-negative bacterium *Chromobacterium alkanivorans* sp. nov., strain IITR-71T degrading halogenated alkanes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2016), 66, 5228–5235. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001500>;
11. Ambrozic Avgustin, J., Zgur Bertok, D., Kostanjsek, R. et al. Isolation and characterization of a novel violacein-like pigment producing psychrotrophic bacterial species *Janthinobacterium svalbardensis* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 103, 763–769 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9858-0>
12. Antonio R.V., Creczynski-Pasa T.B. Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum* // *Genet. Mol. Res.* 2004. V. 3. №. 1. P. 85-91.
13. Aranda, S., Montes-Borrego, M., Landa, B.B. Purple-Pigmented Violacein-Producing *Duganella* sp. Inhabit the Rhizosphere of Wild and Cultivated Olives in Southern Spain. *Microb Ecol* 62, 446–459 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9840-9>;
14. Bromberg N., Justo G.Z., Haun M., Duran, N., Ferreira C.V. Violacein cytotoxicity on human blood lymphocytes and effect on phosphatases // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2005. V. 20.5449-454. <https://doi.org/10.1080/14756360500273052>;
15. Choi S.Y., Lim S., Cho G., Kwon J., Mun W., Im H., Mitchell R.J. *Chromobacterium violaceum* delivers violacein, a hydrophobic antibiotic, to other microbes in membrane vesicles // *Environmental Microbiology*. 2019. doi:10.1111/1462-2920.14888
16. Garcia-Rivera Peter, Hans-Jurgen Busse and Holger C. Scholz. *Chromobacterium piscinae* sp. nov. and *Chromobacterium pseudoviolaceum* sp. nov., from environmental samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2009), 59, 2486–2490. DOI 10.1099/ijms.0.008888-0;

17. Garcia-Rivera J, Cadsadevall A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. *Med. Mycol.* 2001; 39: 353–57. pmid:11556765 <https://doi.org/10.1080/mmy.39.4.353.357>;
18. Ahmad S, Lee SY, Kong HG, Jo EJ, Choi HK, Khan R, et al. (2016) Genetic Determinants for Pyomelanin Production and Its Protective Effect against Oxidative Stress in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS ONE* 11(8): e0160845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160845>;
19. Agarwal, H.; Bajpai, S.; Mishra, A.; Kohli, I.; Varma, A.; Fouillaud, M.; Dufossé, L.; Joshi, N.C. Bacterial Pigments and Their Multifaceted Roles in Contemporary Biotechnology and Pharmacological Applications. *Microorganisms* 2023, 11, 614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030614>;
20. Chidambaram Kulandaisamy Venil, Zainul Akmar Zakaria, Wan Azlina Ahmad, Bacterial pigments and their applications, *Process Biochemistry*, Volume 48, Issue 7, 2013, Pages 1065-1079, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.006>;
21. Bhosale, Mayuri & Waghmode, Meghmala & Patil, Neha. A Survey on Microbial Pigments: Production and Applications. *Gorteria*. (2022), 35. 10. P. 11-21;
22. Sengupta, S., Bhowal, J. Characterization of a blue-green pigment extracted from *Pseudomonas aeruginosa* and its application in textile and paper dyeing. *Environ Sci Pollut Res* 30, 30343–30357 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24241-9>;
23. Subhash Kumar, Vijay Kumar, Ambika, Deepika Nag, Virender Kumar, Sanyukta Darnal, Vikas Thakur, Vijeta Patial, Dharam Singh, Microbial pigments: learning from the Himalayan perspective to industrial applications, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Volume 49, Issue 5, September 2022, kuac017, <https://doi.org/10.1093/jimb/kuac017>;
24. Paillière-Jiménez ME, Stincone P and Brandelli A (2020) Natural Pigments of Microbial Origin. *Front. Sustain. Food Syst.* 4:590439. doi: 10.3389/fsufs.2020.590439;

25. Malik K., Tokkas J., Goyal S. Microbial pigments: a review // *Int J Microbial Res Technol.* – 2012. – V. 1. – №. 4. – P. 361-365.;
26. Vogl C. et al. Characterization of riboflavin (vitamin B2) transport proteins from *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum* // *Journal of bacteriology.* – 2007. – V. 189. – №. 20. – P. 7367-7375. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.00590-07>;
27. Lim, S.H., Choi, J.S. & Park, E.Y. Microbial production of riboflavin using riboflavin overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famate*: An overview. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6, 75–88 (2001). <https://doi.org/10.1007/BF02931951>;
28. Nandagopal, P.; Steven, A.N.; Chan, L.-W.; Rahmat, Z.; Jamaluddin, H.; Mohd Noh, N.I. Bioactive Metabolites Produced by Cyanobacteria for Growth Adaptation and Their Pharmacological Properties. *Biology* 2021, 10, 1061. <https://doi.org/10.3390/biology10101061>;
29. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 493570, Riboflavin; [cited 2023 Jan. 24]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Riboflavin>;
30. Behera, H.T., Mojumdar, A., Nivedita, S., Ray, L. (2021). Microbial Pigments: Secondary Metabolites with Multifaceted Roles. In: Vaishnav, A., Choudhary, D.K. (eds) *Microbial Polymers*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0045-6_25;
31. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 493570, Riboflavin; [cited 2023 Jan. 24]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Riboflavin>;
32. Castangia, I.; Manca, M.L.; Razavi, S.H.; Nácher, A.; Díez-Sales, O.; Peris, J.E.; Allaw, M.; Terencio, M.C.; Usach, I.; Manconi, M. Canthaxanthin Biofabrication, Loading in Green Phospholipid Vesicles and Evaluation of In Vitro Protection of

- Cells and Promotion of Their Monolayer Regeneration. *Biomedicines* 2022, 10, 157. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010157>;
33. Hagaggi, N.S., Abdul-Raouf, U.M. Production of bioactive β -carotene by the endophytic bacterium *Citricoccus parietis* AUCs with multiple in vitro biological potentials. *Microb Cell Fact* 22, 90 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02108-z>;
34. Avalos, J., Carmen Limón, M. Biological roles of fungal carotenoids. *Curr Genet* 61, 309–324 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0454-x>;
35. Sandmann, G. Carotenoids and Their Biosynthesis in Fungi. *Molecules* 2022, 27, 1431. <https://doi.org/10.3390/molecules27041431>;
36. National Center for Biotechnology Information. «PubChem Compound Summary for CID 5281227, Canthaxanthin» PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Canthaxanthin>. Accessed 19 July, 2023;
37. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5280489, Beta-Carotene; [cited 2023 May 29]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Beta-Carotene>;
38. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5281224, Astaxanthin; [cited 2023 July 31]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Astaxanthin>;
39. Goswami, G., Chaudhuri, S. & Dutta, D. The present perspective of astaxanthin with reference to biosynthesis and pharmacological importance. *World J Microbiol Biotechnol* 26, 1925–1939 (2010). <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0373-z>;
40. Antipova, T.V., Zhelifonova, V.P., Zaitsev, K.V. et al. Fungal Azaphilone Pigments as Promising Natural Colorants. *Microbiology* 92, 1–10 (2023). <https://doi.org/10.1134/S0026261722601737>;
41. Chidambaram Kulandaisamy Venil, Zainul Akmar Zakaria, Rajamanickam Usha, Wan Azlina Ahmad, Isolation and characterization of flexirubin type pigment

from *Chryseobacterium* sp. UTM-3T, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 3, Issue 4, 2014, Pages 103-107, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.02.006>;

42. Reichenbach, H., Kohl, W., Böttger-Vetter, A. et al. Flexirubin-type pigments in *Flavobacterium*. *Arch. Microbiol.* 126, 291–293 (1980). <https://doi.org/10.1007/BF00409934>;

43. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 6450309, Flexirubin; [cited 2023 Sept. 5]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flexirubin>;

44. Serafim, B.; Bernardino, A.R.; Freitas, F.; Torres, C.A.V. Recent Developments in the Biological Activities, Bioproduction, and Applications of *Pseudomonas* spp. Phenazines. *Molecules* 2023, 28, 1368. <https://doi.org/10.3390/molecules28031368>;

45. Abdelaziz, A.A., Kamer, A.M.A., Al-Monofy, K.B. et al. *Pseudomonas aeruginosa*'s greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. *Microb Cell Fact* 22, 110 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02122-1>;

46. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 4757, Phenazine; [cited 2023 Sept. 5]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenazine>;

47. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 6817, Pyocyanin; [cited 2023 Sept. 5]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyocyanin>;

48. Gee W. Lau; Daniel J. Hasset; Huimin Ran; Fansheng Kong (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection., 10(12), 0–606. doi:10.1016/j.molmed.2004.10.002;

49. Cude, W. N.; Mooney, J.; Tavanaei, A. A.; Hadden, M. K.; Frank, A. M.; Gulvik, C. A.; May, A. L.; Buchan, A. Production of the Antimicrobial Secondary

- Metabolite Indigoidine Contributes to Competitive Surface Colonization by the Marine *Roseobacter phaeobacter* sp. Strain Y4I. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), (2012). 4771–4780. doi:10.1128/AEM.00297-12;
50. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 193349, Indigoidine; [cited 2023 Sept. 12]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indigoidine>;
51. Reverchon, S.; Rouanet, C.; Expert, D.; Nasser, W. (2002). Characterization of Indigoidine Biosynthetic Genes in *Erwinia chrysanthemi* and Role of This Blue Pigment in Pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, 184(3), 654–665. doi:10.1128/JB.184.3.654-665.2002;
52. Williamson, Neil R.; Fineran, Peter C.; Leeper, Finian J.; Salmond, George P. C. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. (2006), 4 (12), 887–899. doi:10.1038/nrmicro1531;
53. German A. Islan, Boris Rodenak-Kladniew, Nehuen Noacco, Nelson Duran, Guillermo R. Castro. Prodigiosin: a promising biomolecule with many potential biomedical applications, *Bioengineered*, 13:6, (2022) 14227-14258, DOI: 10.1080/21655979.2022.2084498;
54. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 135408511, Prodigiosin; [cited 2023 Dec. 25]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Prodigiosin>;
55. Jing Yan, Qi Yin, Hao Nie, Jinyou Liang, Xiang-Ru Liu, Yingli Li & Hong Xiao (2023) Prodigiosin as an antibiofilm agent against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, *Biofouling*, 39:4, 444-458, DOI: 10.1080/08927014.2023.2226613;
56. German A. Islan, Boris Rodenak-Kladniew, Nehuen Noacco, Nelson Duran & Guillermo R. Castro (2022) Prodigiosin: a promising biomolecule with many potential biomedical applications, *Bioengineered*, 13:6, 14227-14258, DOI: 10.1080/21655979.2022.2084498;

57. Berning, L., Lenz, T., Bergmann, A.K. et al. The Golgi stacking protein GRASP55 is targeted by the natural compound prodigiosin. *Cell Commun Signal* 21, 275 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01275-1>;
58. Durán Nelson; Giselle Z. Justo; Carmen V. Ferreira; Patrícia S. Melo; Livia Cordi; Dorival Martins, Violacein: properties and biological activities // *Biotechnology and applied biochemistry*. – 2007. – V. 48. – №. 3. – P. 127-133. 10 r. <https://doi.org/10.1042/BA20070115>;
59. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 11053, Violacein; [cited 2024 Jan. 5]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Violacein>;
60. Poplawsky, A. R., Urban, S. C., & Chun, W. (2000). Biological Role of Xanthomonadin Pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5123–5127. doi:10.1128/aem.66.12.5123-5127.2000;
61. Cavalcante, S.B., dos Santos Biscaino, C., Kreusch, M.G. et al. The hidden rainbow: the extensive biotechnological potential of Antarctic fungi pigments. *Braz J Microbiol* 54, 1675–1687 (2023). <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01011-4>;
62. Sajjad, W., Din, G., Rafiq, M. et al. Pigment production by cold-adapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications. *Extremophiles* 24, 447–473 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01180-2>
63. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 г. (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ НМИЦР Минздрава России, 2019;
64. Кобякова О. и др. Роль пандемии новой коронавирусной инфекции в формировании динамики основных показателей Федерального проекта «Борьба с онкологическими заболеваниями» // *Вопросы онкологии*. – 2022. – Т. 68. – №. 2. – С. 131-139. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2022-68-2-131-139>;

65. Концевая А.В., Баланова Ю.А., Мырзаматова А.О., Худяков М.Б., Муканеева Д.К., Драпкина О.М. Экономический ущерб онкологических заболеваний, ассоциированных с модифицируемыми факторами риска // Анализ риска здоровью. 2020. №1.;
66. Нечаева О.Б., Михайлова Ю.В., Чухриенко И.Ю. Эпидемиологическая ситуация при онкологических заболеваниях в России. Медицинский алфавит. 2018;2(31):54-60;
67. Улумбекова Г.Э., Петрачков И.В. Онкогематологические заболевания в Российской Федерации и в развитых странах: смертность, заболеваемость, ресурсы и организация медицинской помощи с учетом пандемии COVID-19 // ОРГЗДРАВ: новости, мнения, обучение. Вестник ВШЦУЗ. 2022. Т. 8, № 2. С.22-47. DOI: <https://doi.org/10.33029/2411-8621-2022-8-2-22-47>;
68. Crombie Jennifer, Ann La Casce; The treatment of Burkitt lymphoma in adults. *Blood* 2021; 137 (6): 743–750. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.2019004099>;
69. Rochford, R., Cannon, M., Moormann, A. Endemic Burkitt's lymphoma: a polymicrobial disease? *Nat Rev Microbiol* 3, 182-187 (2005). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1089>;
70. Валиев Т. Т., Барях Е. А. Эволюция взглядов на диагностику и лечение лимфомы Беркитта // Клиническая онкогематология. 2014. №1.;
71. Sin CF, Man PM. Early T-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: Diagnosis, Updates in Molecular Pathogenesis, Management, and Novel Therapies. *Front Oncol*. 2021 Nov 29;11:750789. doi: 10.3389/fonc.2021.750789;
72. Benjamin, B. (2021). Cytotoxic Drugs. In: Paul, A., Anandabaskar, N., Mathaiyan, J., Raj, G.M. (eds) Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-33-6009-9_63;
73. Andima M, Ndakala A, Derese S, Biswajyoti S, Hussain A, Yang LJ, Akoth OE, Coghi P, Pal C, Heydenreich M, Wong VK, Yenesew A. Antileishmanial and cytotoxic activity of secondary metabolites from *Tabernaemontana ventricosa* and two aloe species. *Nat Prod Res*. 2022 Mar;36(5):1365-1369. doi: 10.1080/14786419.2021.1871906;

74. Lopez-Corona AV, Valencia-Espinosa I, González-Sánchez FA, Sánchez-López AL, Garcia-Amezquita LE, Garcia-Varela R. Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activity of Phenolic Compound Family Extracted from Raspberries (*Rubus idaeus*): A General Review. *Antioxidants* (Basel). 2022 Jun 17;11(6):1192. doi: 10.3390/antiox11061192;
75. Martínez MJ, Andreu AB, Barbini L. Cytotoxic activity of *Solanum tuberosum* polyphenolic extracts in human hepatocarcinoma cells is mediated by apoptosis and autophagy. *J Food Sci*. 2022 Nov 14. doi: 10.1111/1750-3841.16366;
76. Panggabean JA, Adiguna SP, Murniasih T, Rahmawati SI, Bayu A, Putra MY. Structure-Activity Relationship of Cytotoxic Natural Products from Indonesian Marine Sponges. *Rev Bras Farmacogn*. 2022;32(1):12-38. doi: 10.1007/s43450-021-00195-w;
77. Wang H, Ma G, Wang H, Li L, Dong A, Liu H, Huo X, Si J, Wang J. Novel Triterpenoid Alkaloids With Their Potential Cytotoxic Activity From the Roots of *Siraitia grosvenorii*. *Front Chem*. 2022 Apr 29;10:885487. doi: 10.3389/fchem.2022.885487;
78. Tiqiang Z, Zhenzhen W, Qianyu F, Rui Q, Guangjie Z, Bin L, Junxing D, Chengchu Z. A new oleanane-type triterpene from *Ardisia lindleyana* D.Dietr and its cytotoxic activity. *Nat Prod Res*. 2022 Mar 23:1-8. doi: 10.1080/14786419.2022.2053849;
79. Malarz J, Galanty A, Stojakowska A. Chemical Composition and Cytotoxic Activity of Extracts from *Carpesium divaricatum*: In Vitro- versus Field-Grown Plants. *Plants* (Basel). 2022 Oct 23;11(21):2815. doi: 10.3390/plants11212815;
80. Николаева Е.Ю., Щетинина Ю.Р., Шохин И.Е., Зверев В.В., Свитич О.А., Сусова О.Ю., Митрофанов А.А., Аммур Ю.И. Вирус кори как векторная платформа для иммунотерапии опухолей головного мозга (обзор). Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(1):51-58. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-51-58>;
81. Ammour, Y.; Susova, O.; Krasnov, G.; Nikolaeva, E.; Varachev, V.; Schetinina, Y.; Gavrilova, M.; Mitrofanov, A.; Poletaeva, A.; Bekyashev, A.; Faizuloev, E.;

- Zverev, V.V.; Svitich, O.A.; Nasedkina, T.V. Transcriptome Analysis of Human Glioblastoma Cells Susceptible to Infection with the Leningrad-16 Vaccine Strain of Measles Virus. *Viruses* 2022, 14, 2433. <https://doi.org/10.3390/v14112433>;
82. Abdel-Wahab B.A., F Abd El-Kareem H, Alzamami A, A Fahmy C, H Elesawy B, Mostafa Mahmoud M, Ghareeb A, El Askary A, H Abo Nahas H, G M Attallah N, Altwaijry N, M Saied E. Novel Exopolysaccharide from Marine *Bacillus subtilis* with Broad Potential Biological Activities: Insights into Antioxidant, Anti-Inflammatory, Cytotoxicity, and Anti-Alzheimer Activity. *Metabolites*. 2022 Jul 31;12(8):715. doi: 10.3390/metabo12080715;
83. Frey J, Kuhnert P. RTX toxins in *Pasteurellaceae*. *Int J Med Microbiol*. 2002 Sep;292(3-4):149-58. doi: 10.1078/1438-4221-00200;
84. Chen L, Liu C, Liu X, Wang GY. Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of culturable bacteria associated with the ascidian *Botryllus schlosseri*. *J Appl Microbiol*. 2020 Oct;129(4):892-905. doi: 10.1111/jam.14667;
85. Thakur AN, Thakur NL, Indap MM, Pandit RA, Datar VV, Müller WE. Antiangiogenic, antimicrobial, and cytotoxic potential of sponge-associated bacteria. *Mar Biotechnol (NY)*. 2005 May-Jun;7(3):245-52. doi: 10.1007/s10126-004-4085-y;
86. Wang L, Peng C, Gong B, Yang Z, Song J, Li L, Xu L, Yue T, Wang X, Yang M, Xu H, Liu X. Actinobacteria Community and Their Antibacterial and Cytotoxic Activity on the Weizhou and Xieyang Volcanic Islands in the Beibu Gulf of China. *Front Microbiol*. 2022 Jul 12;13:911408. doi: 10.3389/fmicb.2022.911408;
87. Noël A, Van Soen G, Rouaud I, Hitti E, Tomasi S. Optimization of cytotoxic activity of *Nocardia* sp culture broths using a design of experiments. *PLoS One*. 2020 Jan 14;15(1):e0227816. doi: 10.1371/journal.pone.0227816;
88. Darshan N, Manonmani HK. Prodigiosin and its potential applications. *J Food Sci Technol*. 2015 Sep;52(9):5393-407. doi: 10.1007/s13197-015-1740-4;
89. Ramesh C, Vinithkumar NV, Kirubagaran R, Venil CK, Dufossé L. Multifaceted Applications of Microbial Pigments: Current Knowledge, Challenges and Future

- Directions for Public Health Implications. *Microorganisms*. 2019 Jun 28;7(7):186. doi: 10.3390/microorganisms7070186;
90. 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
91. Ronco, C. (2005). Contributions to Nephrology Cardiovascular Disorders in Hemodialysis. *Oxidative Stress and Reactive Oxygen Species.*, (240–260), doi:10.1159/000085686;
92. Slauch, J.M. (2011), How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Molecular Microbiology*, 80: 580-583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07612.x>;
93. Low P.S.; Merida J.R.. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. (1996), 96(3), 533–542. doi:10.1111/j.1399-3054.1996.tb00469.x;
94. Toren Finkel, Oxygen radicals and signaling, *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 10, Issue 2, 1998, Pages 248-253, [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80147-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80147-6);
95. Gisela Storz, Louis A. Tartaglia, Spencer B. Farr, Bruce N. Ames, Bacterial defenses against oxidative stress, *Trends in Genetics*, Volume 6, 1990, Pages 363-368, [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(90\)90278-E](https://doi.org/10.1016/0168-9525(90)90278-E);
96. Gaupp R, Ledala N and Somerville GA (2012) Staphylococcal response to oxidative stress. *Front. Cell. Inf. Microbio.* 2:33. doi: 10.3389/fcimb.2012.00033;
97. George Y. Liu, Victor Nizet, Color me bad: microbial pigments as virulence factors, *Trends in Microbiology*, Volume 17, Issue 9, 2009, Pages 406-413, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.06.006>;
98. Mumtaz, R., Bashir, S., Numan, M. et al. Pigments from Soil Bacteria and Their Therapeutic Properties: A Mini Review. *Curr Microbiol* 76, 783–790 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1557-2>;

99. Flieger, J.; Raszewska-Famielec, M.; Radzikowska-Büchner, E.; Flieger, W. Skin Protection by Carotenoid Pigments. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 1431. <https://doi.org/10.3390/ijms25031431>;
100. Engelman, A., Cherepanov, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol* 10, 279–290 (2012). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2747>;
101. Dogancı, M.A., Ay Sal, F., Guler, H.I. et al. Investigation of potential inhibitor properties of violacein against HIV-1 RT and CoV-2 Spike RBD:ACE-2. *World J Microbiol Biotechnol* 38, 161 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03350-0>;
102. Vaishnavi M. et al. Antibacterial and anti-HIV activity of extracellular pigment from *Streptomyces* sp. S45 isolated from Sabarimala forest soil, India. – 2020;
103. Gomes M, Soares G. A Review of Bacterial Pigments: Harnessing Nature's Colors for Functional Materials and Dyeing Processes. *Textile & Leather Review*. 2023; 6:167-190. <https://doi.org/10.31881/TLR.2023.016>;
104. Humpherson-jones F.M., Maude R.B. Studies on the epidemiology of *Alternaria brassicicola* in *Brassica oleracea* seed production crops. *Annals of Applied Biology*, 100 (1), 61–71. doi:10.1111/j.1744-7348.1982.tb07192.x;
105. Abuamsha R., Salman M., Ehlers R. U. Improvement of seed bio-priming of oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) with *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas chlororaphis* // *Biocontrol Science and Technology*. – 2011. – V. 21. – №. 2. – P. 199-213. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.537311>;
106. Egamberdieva D. *Pseudomonas chlororaphis*: a salt-tolerant bacterial inoculant for plant growth stimulation under saline soil conditions // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2012. – V. 34. – №. 2. – P. 751-756.
107. Raio, A., Puopolo, G. *Pseudomonas chlororaphis* metabolites as biocontrol promoters of plant health and improved crop yield. *World J Microbiol Biotechnol* 37, 99 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03063-w>;
108. Weimer, A., Kohlstedt, M., Volke, DC et al. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: achievements and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 7745–7766 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10811-9>;

109. Mavrodi, D. V., Blankenfeldt, W., Thomashow, L. S. (2006). Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* sp. Biosynthesis and Regulation. Annual Review of Phytopathology, 44(1), 417–445. doi:10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710;
110. Phyllis A. W. Martin, Dawn Gundersen-Rindal, Michael Blackburn¹ and Jeffrey Buyer. *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2007), 57, 993–999. DOI 10.1099/ijs.0.64611-0;
111. Chiu-Chung Young, A. B. Arun,¹ Wei-An Lai, Wen-Ming Chen, Jiu-Hsing Chao, Fo-Ting Shen, P. D. Rekha and Peter Kämpfer. *Chromobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from spring water samples. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2008), 58, 877–880. DOI 10.1099/ijs.0.65573-0;
112. Xiang Y. Han, Faye S. Han and Jonathan Segal. *Chromobacterium haemolyticum* sp. nov., a strongly haemolytic species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2008), 58, 1398–1403. DOI 10.1099/ijs.0.64681-0;
113. Kämpfer Peter, Wellner Stefanie, Lohse Kerstin, Martin Karin, Lodders Nicole, *Duganella phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the leaf surface of *Trifolium repens* and proposal to reclassify *Duganella violaceinigra* into a novel genus as *Pseudoduganella violceinigra* gen. nov., comb. nov., Systematic and Applied Microbiology, Volume 35, Issue 1, 2012, Pages 19-23, ISSN 0723-2020, <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.10.003>;
114. Scott D. Soby, Sudhindra R. Gadagkar, Cristina Contreras and Frank L. Caruso. *Chromobacterium vaccinii* sp. nov., isolated from native and cultivated cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) bogs and irrigation ponds. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2013), 63, 1840–1846. DOI 10.1099/ijs.0.045161-0;
115. Menezes C.B.A., Afonso C.B., Parma M., de Melo I.S. Zucchi T.D., Destefano S.A.L., Fantinatti-Garboggini F. *Chromobacterium amazonense* sp. nov. isolated

- from water samples from the Rio Negro, Amazon, Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek* 107, 1057–1063 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0397-3>;
116. Shan Zhou, Xiang Guo, Huimin Wang, Delong Kong, Yanwei Wang, Jie Zhu, Weiwei Dong, Mingxiong He, Guoquan Hu, Bingqiang Zhao, Bin Zhao and Zhiyong Ruan. *Chromobacterium rhizoryzae* sp. nov., isolated from rice roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2016), 66, 3890–3896. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001284>;
117. Blackburn M. B. et al. *Chromobacterium phragmitis* sp. nov., isolated from estuarine marshes // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2019. – V. 69. – №. 9. – P. 2681-2686. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003508>;
118. Logan NA. Numerical taxonomy of violet-pigmented, Gram-negative bacteria and description of *Iodobacter fluviatile* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39:450-456. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-4-450>;
119. Su W, Zhou Z, Jiang F, Chang X, Liu Y, Wang S, Kan W, Xiao M, Shao M, Peng F, Fang C. *Iodobacter limnosediminis* sp. nov., isolated from Arctic lake sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; 63:1464-1470. <https://doi.org/10.1099/ijse.0.039982-0>;
120. Srinivas TN, Manasa P, Begum Z, Sunil B, Sailaja B, Singh SK, Prasad S, Shivaji S. *Iodobacter arcticus* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from meltwater stream sediment of an Arctic glacier. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; 63:2800-2805. <https://doi.org/10.1099/ijse.0.044776-0>;
121. Schloss Patrick D., Allen Heather K., Klimowicz Amy K., Mlot Christine, Gross Jessica A., Savengsuksa Sarah, McEllin Jennifer, Clardy Jon, Ruess Roger W., and Handelsman Jo. Psychrotrophic Strain of *Janthinobacterium lividum* from a Cold Alaskan Soil Produces Prodigiosin. *DNA and Cell Biology* 2010 29:9, 533-541. <http://doi.org/10.1089/dna.2010.1020>;
122. Pantanella, F., Berlutti, F., Passariello, C., Sarli, S., Morea, C. and Schippa, S., Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *Journal of Applied Microbiology*, (2007), 102: 992-999. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03155.x;

123. Pesciaroli C., Cupini F., Selbmann L., Barghini P., Fenice M. Temperature preferences of bacteria isolated from seawater collected in Kandalaksha Bay, White Sea, Russia. *Polar Biol* 35, 435–445 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00300-011-1091-1>;
124. Shcherbakov A.V., Kuzmina E.Yu., Lapshina E.D., Shcherbakova E.N., Gonchar L.N., Chebotar V.K. Taxonomic diversity of bacterial populations inhabiting gametophytes of *Sphagnum* mosses from different geographic regions of Russia // *Agronomy Research*. – 2015. – V. 13. – P. 192-201;
125. Dagurova O.P., Garankina V.P., Dambaev V.B., Belkova N.L. Microbiological indexes of water of lake Gusinoe (Western Zabaikalie) // *Тезисы докладов и стендовых сообщений*. – 2015. – V. 32. – №. 1. – P. 267
126. Golovchenko A.V., Dmitrienko J.D., Dobrovolskaya T.G., Gracheva T.A., Inisheva L.I., Kozhevnikov P.A. Bacterial Complexes in Fens of Tomsk Oblast: Abundance, Taxonomic Structure, an Activity // *Moscow University Soil Science Bulletin*. – 2020. – V. 75. – №. 4. – P. 184-191. <https://doi.org/10.3103/S0147687420040031>;
127. Fedotova A.V., Serkebaeva Y.M., Sorokin V.V., Dedysh S.N. Filterable microbial forms in the Rybinsk water reservoir // *Microbiology*. – 2013. – V. 82. – №. 6. – P. 728-734. <https://doi.org/10.1134/S0026261713060052>;
128. 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.; Churikova D.A.; Sirotin A.A.; Suzina N.E.; Solyanikova I.P. A Blue-purple pigment-producing bacterium isolated from the Vezelka River in the city of Belgorod // *Microorganisms*. 2021. V. 9. P. 102. <https://doi.org/10.3390/microorganisms901010>;
129. Hiraishi A., Shin Y. K., Sugiyama J. Proposal To Reclassify *Zoogloea ramigera* IAM 12670 (PR Dugan 115) as *Duganella zoogloeoidea* gen. nov., sp. nov // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1997. – V. 47. – №. 4. – P. 1249-1252. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1249>;

130. Li W. J. et al. *Duganella violaceinigra* sp. nov., a novel mesophilic bacterium isolated from forest soil // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2004. – V. 54. – №. 5. – P. 1811-1814. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63141-0>;
131. De Boer Wietse, Leveau Johan H. J., Kowalchuk George A., Gunnewiek Paulien J. A. Klein, Abeln Edwin C. A., Figge Marian J., Klaas Sjollema, Janse Jaap D., Van Veen Johannes A. *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2004. – V. 54. – №. 3. – P. 857-864. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02920-0>;
132. Hakvag Sigrid, Fjærvik Espen, Klinkenberg Geir, Borgos Sven Even F., Josefsen Kjell D., Ellingsen Trond E. and Zotchev Sergey B. Violacein-producing *Collimonas* sp. from the sea surface microlayer of costal waters in Trøndelag, Norway // Marine drugs. – 2009. – V. 7. – №. 4. – P. 576-588. <https://doi.org/10.3390/md7040576>;
133. La Scola Bernard, Birtles Richard J., Mallet Marie-Noëlle, Raoult Didier. *Massilia timonae* gen. nov., sp. nov., isolated from blood of an immunocompromised patient with cerebellar lesions // Journal of clinical microbiology. – 1998. – V. 36. – №. 10. – P. 2847-2852. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.10.2847-2852.1998>;
134. Wang Haisheng, Zhang Xiaoxia, Wang Shuangyan, Zhao Baisuo, Lou Kai, Xing Xin-Hui. *Massilia violaceinigra* sp. nov., a novel purple-pigmented bacterium isolated from glacier permafrost // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2018. – V. 68. – №. 7. – P. 2271-2278. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002826>;
135. Yang Endong, Zhao Meiyi, Li Shanshan, Wang Yanxiang, Sun Leni, Liu Jing, Wang Weiyun. *Massilia atriviolacea* sp. nov., a dark purple-pigmented bacterium isolated from soil // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2019. – V. 69. – №. 7. – P. 2135-2141. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003449>;

136. Wang H.S., Wang F.Z., Zhu X.F., Yan Y.C., Yu X.H., Jiang P.X., Xing X.H. Biosynthesis and characterization of violacein, deoxyviolacein and oxyviolacein in heterologous host, and their antimicrobial activities // *Biochem. Eng. J.* 2012. V. 67. P. 148–55.;
137. Hoshino T., Ogasawara N. Biosynthesis of violacein: evidence for the intermediacy of 5-hydroxy-1-tryptophan and the structure of a new pigment, oxyviolacein, produced by the metabolism of 5-hydroxytryptophan // *Agricultural and Biological Chemistry.* 1990. V. 54. No. 9. P. 2339-2346, DOI: 10.1080/00021369.1990.10870288;
138. He L., Xiu Y., Jones J.A., Baidoo E.E., Keasling J.D., Tang Y.J., Koffas M.A. Deciphering flux adjustments of engineered *E. coli* cells during fermentation with changing growth conditions // *Metab. Eng.* 2017. V. 39. P. 247–56.;
139. Dodou H.V., Batista A.H.M., Medeiros S.C., Sales G.W.P., Rodrigues M.L., Pereira P.I.O., Nogueira P.C.N., Silveira E.R., Grangeiro T.B., Nogueira N.A.P. Violacein antimicrobial activity on *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Nat Prod Res.* 2020 Dec;34(23):3414-3417. doi: 10.1080/14786419.2019.1569654
140. Batista J.H., Leal F.C., Fukuda T.T.H., Diniz J.A., Almeida F., Pupo M.T., Silva Neto J.F. Interplay between two quorum sensing-regulated pathways, violacein biosynthesis and VacJ/Yrb, dictates outer membrane vesicle biogenesis in *Chromobacterium violaceum* // *Environmental Microbiology.* 2020. V. №. doi:10.1111/1462-2920.15033;
141. Wang M., Zhu P., Jiang J., Zhu H., Tan S. Signaling molecules of quorum sensing in bacteria // *Rev. Biotechnol. Biochem.* 2020.;
142. Czapek, Friedrich. *Biochemie der pflanzen.* Vol. 2. G. Fischer, 1920, Paech, K. (1950). Rückblick. In: *Biochemie und Physiologie der Sekundären Pflanzenstoffe.* Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-29290-7_8;
143. Blackburn M.B., Farrar Jr. R. R., Sparks M.E., Kuhar D., Mitchell A., Gundersen-Rindal D.E. *Chromobacterium sphagni* sp. nov., an insecticidal bacterium isolated from *Sphagnum* bogs. Taxonomic description // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 3417–3422. DOI 10.1099/ijsem.0.002127;

144. Leon L.L., Miranda C.C., De Souza A.O., Duran N., Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum* // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2001. V. 48. Iss. 3. P. 449–450. <https://doi.org/10.1093/jac/48.3.449>;
145. Im H., Choi S.Y., Son S., Mitchell R.J. Combined application of bacterial predation and violacein to kill polymicrobial pathogenic communities // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 14415. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14567-7>;
146. Kido M., Idogaki H., Nishikawa K. et al. Violacein improves recombinant IgG production by controlling the cell cycle of Chinese hamster ovary cells // Cytotechnology. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00434-3>;
147. Hui C.Y., Guo Y., Liu L., Zhang N.X., Gao C.X., Yang X.Q., Yi J. Genetic control of violacein biosynthesis to enable a pigment-based whole-cell lead biosensor // RSC Advances. 2020. V. 10. №. 47. P. 28106–28113;
148. Tamfu A.N., Ceylan O., Fru G.C., Ozturk M., Duru M.E., Shaheen F. Antibiofilm, anti-quorum sensing and antioxidant activity of secondary metabolites from seeds of *Annona senegalensis*, Persoon // Microbial Pathogenesis. 2020. P. 104191.;
149. Short, S.M., van Tol, S., MacLeod, H.J. et al. Hydrogen cyanide produced by the soil bacterium *Chromobacterium* sp. Panama contributes to mortality in *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *Sci Rep* 8, 8358 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26680-2>;
150. Kimura, H., Takahashi, T., Hiraka, H. et al. Effective Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) from Plant Oils by *Chromobacterium* sp. *Polym J* 31, 210–212 (1999). <https://doi.org/10.1295/polymj.31.210>;
151. Tay, S., Natarajan, G., Rahim, M. et al. Enhancing gold recovery from electronic waste via lixiviant metabolic engineering in *Chromobacterium violaceum*. *Sci Rep* 3, 2236 (2013). <https://doi.org/10.1038/srep02236>;
152. Mendes, A.S., de Carvalho, J.E., Duarte, M.C. et al. Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum*

- production. *Biotechnology Letters* 23, 1963–1969 (2001).
<https://doi.org/10.1023/A:1013734315525>;
153. Практикум по микробиологии: Учеб. Пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.;
154. Frediansyah, A.; Manuhara, Y.S.W.; Kristanti, A.N.; Luqman, A.; Wibowo, A.T. Fermentation in Minimal Media and Fungal Elicitation Enhance Violacein and Deoxyviolacein Production in Two *Janthinobacterium* Strains. *Fermentation* 2022, 8, 714. <https://doi.org/10.3390/fermentation8120714>;
155. Weisburg W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *Journal of bacteriology*. – 1991. – V. 173. – №. 2. – P. 697-703;
156. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Res.* 1994. V. 22. P. 4673–4680;
157. Снегин Э.А. Практикум по биометрии: учебное пособие / Э.А. Снегин. – Белгород: ИД «Белгород» НИУ «БелГУ», 2016 – 56 с.;
158. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: Колос, 1979. – 216 с., ил. – (Учебники и учеб. пособия для высш. с.-х. учеб. заведений).;
159. Погорелова Н. А., Молибога Е. А., Сарницкая Н. А. Исследование процесса биоконверсии полимеров пшеничных отрубей ферментным препаратом протеолитического действия // *Вестник Омского государственного аграрного университета*. — 2018. — № 4 (32). — С. 31–35.;
160. Avakova A., Lyakhovchenko N., Lopin R, Goltseva E, Belozerskikh M, Solyanikova I. Antagonistic activity of the native strain of *Pseudomonas chlororaphis* 3 of the Belgorod region against the bacterium of the genus *Ralstonia*, *ILS 2021*, *BIO Web of Conferences* 40, 01008 (2021) DOI: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20214001008>;

161. Lyakhovchenko, N.S.; Efimova, V.A.; Seliverstov, E.S.; Anis'kov, A.A.; Solyanikova, I.P. Bacteriostatic Activity of *Janthinobacterium lividum* and Purified Violacein Fraction against *Clavibacter michiganensis*. *Processes* 2024, 12, 1116. <https://doi.org/10.3390/pr12061116>;
162. Нестерова Л. Ю., Ахова А. В., Ушаков В. Ю. Культивирование бактерий, одноклеточных эукариот и изолированных клеток. — Пермь: ПГУ, 2024. — 88 с.;
163. Kirby, W. M. M., G. M. Yoshihara, K. S. Sundsted, and J. H. Warren. 1957. Clinical usefulness of a single disc method for antibiotic sensitivity testing. *Antibiotics Annu.* 1956-1957:892.;
164. Choi, W.-H., Yun, J.-H., Chu, J.-P. and Chu, K.-B., *Hermetia illucens* antibacterial activity. *Entomological Research*, 42: 219-226. (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2012.00465.x>;
165. Егоров Н. С. Микробы антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. – М: И-тво «Высшая школа», 1965. – 211 с.;
166. Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А. и др. Методы экспериментальной микологии. Справочник. Уч. изд. Изд-тво «Наукова думка» - Киев. 1982 - 535 с;
167. Биссвангер Х. Практическая энзимология / Х. Биссвангер ; пер. с англ. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017. -328 с.: ил.;
168. Mitskevich, P.B., Kosmacheva, S.M., Ibragimova, Zh.A., Shman, T.V., Myslitsky, V.F. 2023. The use of the MTT test to assess the sensitivity of leukemia cells to cytostatic drugs in vitro and predict the response to chemotherapy in leukemia. *Instructions for use.* – Minsk. 2003 (In Russian);
169. Mosmann T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63.;
170. de Sousa Lea, A.M., de Queiroz, J.D.F., de Medeiros, S.R.B, de Souza Lima, T.K., Agnez-Lima, L.F. 2015. Violacein induces cell death by triggering

- mitochondrial membrane hyperpolarization in vitro. *BMC Microbiology* 15:115. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0452-2>;
171. Bendale, Y., Bendale, V., Paul, S. 2017. Evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles against normal and cancer cells and its anticancer potential through induction of apoptosis. *Integrative Medicine Research* 6(2):141-148. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2017.01.006>;
172. Huang C, Chu X, Hui W, Xie C, Xu X. Study on extraction and characterization of new antibiotics violacein from engineered *Escherichia coli* VioABCDE-SD. *Biotechnol Appl Biochem.* 2023; 1– 15. <https://doi.org/10.1002/bab.2454>;
173. Gwon, Da., Seo, E. & Lee, J.W. Construction of Synthetic Microbial Consortium for Violacein Production. *Biotechnol Bioproc E* (2023). <https://doi.org/10.1007/s12257-022-0284-5>;
174. Haisheng Wang, Peixia Jiang, Yuan Lu, Zhiyong Ruan, Ruibo Jiang, Xin-Hui Xing, Kai Lou, Dong Wei, Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 44, Issues 2–3, 2009, Pages 119-124, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.11.008>;
175. Игнатов, А. Н., Пунина, Н. В., Матвеева, Е. В., Корнев, К. П., Пехтерева, Э. Ш., & Политыко, В. А. (2009). Новые возбудители бактериозов и прогноз их распространения в России. *Защита и карантин растений*, (4), 38-40;
176. Cazoto, L., Martins, D., Ribeiro, M. et al. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from Bovine Mastitis. *J Antibiot* 64, 395–397 (2011). <https://doi.org/10.1038/ja.2011.13>;
177. Martins, D., Costa, F.T.M., Brocchi, M. et al. Evaluation of the antibacterial activity of poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. *J Nanopart Res* 13, 355–363 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0037-9>;
178. Yamada, Y., Patel, N., Fukuda, H., Nagata, T., Mitarai, S., & Azam, F. (2023). Bacterial surface roughness regulates nanoparticle scavenging in seawater. *Limnology and Oceanography*, 68(4), 780-789;

179. Zheng, S., Bawazir, M., Dhall, A., Kim, H. E., He, L., Heo, J., & Hwang, G. (2021). Implication of surface properties, bacterial motility, and hydrodynamic conditions on bacterial surface sensing and their initial adhesion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 643722;
180. Blaker, Lilah Dorothy, Difference in the Inhibitory Effects of Violacein on Various Yeast Isolate Strains From the Hudson Valley Region (2023). Senior Projects Spring 2023. 233;
181. Humpherson-jones F.M., Maude R.B. Studies on the epidemiology of *Alternaria brassicicola* in *Brassica oleracea* seed production crops. *Annals of Applied Biology*, 100 (1), 61–71. doi:10.1111/j.1744-7348.1982.tb07192.x;
182. Macioszek V., Gapinska M., Zmienko A., Sobczak M., Skoczowski A., Oliwa J., Kononowicz A. Complexity of *Brassica oleracea-Alternaria brassicicola* Susceptible Interaction Reveals Downregulation of Photosynthesis at Ultrastructural, Transcriptional, and Physiological Levels. *Cells*. 9. 2329. (2020). doi: 10.3390/cells9102329;
183. Berto P., Commenil P., Belingheri L., Dehorter B., Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves, *FEMS Microbiology Letters*, V. 180, I. 2, November 1999, Pages 183–189, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08794.x>;
184. Zhu G. Y. et al. First report of *Aspergillus flavus* causing fruit rot on kiwifruit in China // *Plant Disease*. – 2022. – V. 106. – №. 7. – P. 1990. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-21-1771-PDN>;
185. Camiletti B.X.; Moral J.; Asensio C.M.; Torrico A.K.; Lucini E.I.; Giménez-Pecci M. de la Paz; Michailides T.J. Characterization of Argentinian endemic *Aspergillus flavus* isolates and their potential use as biocontrol agents for mycotoxins in maize // *Phytopathology*. – 2018. – V. 108. – №. 7. – P. 818-828. doi:10.1094/PHYTO-07-17-0255-R;
186. Belludi, R., Sandhu, P.S., Sharma, P. et al. Diversity analysis of aflatoxigenic isolates of *Aspergillus* sp. from major groundnut growing states of India. *Indian Phytopathology* 75, 681–690 (2022). <https://doi.org/10.1007/s42360-022-00492-x>;

187. Camiletti B.X.; Moral J.; Asensio C.M.; Torrico A.K.; Lucini E.I.; Giménez-Pecci M. de la Paz; Michailides T.J. Characterization of Argentinian endemic *Aspergillus flavus* isolates and their potential use as biocontrol agents for mycotoxins in maize // *Phytopathology*. – 2018. – V. 108. – №. 7. – P. 818-828. doi:10.1094/PHYTO-07-17-0255-R;
188. Cai J. et al. Antimicrobial compounds from *Athyrium sinense* damage the cell membrane of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* // *Journal of Applied Botany and Food Quality*. – 2020. – V. 93. – P. 76-83.;
189. Kleitman, F., Barash, I., Burger, A. et al. Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *Eur J Plant Pathol* 121, 463–475 (2008). <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9264-z>;
190. Nandi, M., Macdonald, J., Liu, P., Weselowski, B. and Yuan, Z.-C. (2018), *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Molecular Plant Pathology*, 19: 2036-2050. <https://doi.org/10.1111/mpp.12678>;
191. Wang, Y.; Deng, S.; Li, Z.; Yang, W. Advances in the Characterization of the Mechanism Underlying Bacterial Canker Development and Tomato Plant Resistance. *Horticulturae* 2022, 8, 209. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030209>;
192. Flügel M, Becker A, Gartemann KH, Eichenlaub R. Analysis of the interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with its host plant tomato by genome-wide expression profiling. *J Biotechnol*. 2012 Jul 31;160(1-2):42-54. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.01.023. Epub 2012 Feb 1. PMID: 22326627;
193. Kozukue, Nobuyuki; Han, Jae-Sook; Lee, Kap-Rang; Friedman, Mendel. Dehydrotomatine and α -Tomatine Content in Tomato Fruits and Vegetative Plant Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), (2004), 2079–2083. doi:10.1021/jf0306845;
194. Masaru Nakayasu, Kohei Ohno, Kyoko Takamatsu, Yuichi Aoki, Shinichi Yamazaki, Hisabumi Takase, Tsubasa Shoji, Kazufumi Yazaki, Akifumi Sugiyama, Tomato roots secrete tomatine to modulate the bacterial assemblage of the

- rhizosphere, *Plant Physiology*, Volume 186, Issue 1, May 2021, Pages 270–284, <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab069>;
195. Balaji Vasudevan, Mayrose Maya, Sherf Ofra, Jacob-Hirsch Jasmine, Eichenlaub Rudolf, Iraki Naim, Manulis-Sasson Shulamit, Rechavi Gideon, Barash Isaac, Sessa Guido, Tomato Transcriptional Changes in Response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Reveal a Role for Ethylene in Disease Development, *Plant Physiology*, Volume 146, Issue 4, April 2008, Pages 1797–1809, <https://doi.org/10.1104/pp.107.115188>;
196. Yokotani, N., Hasegawa, Y., Sato, M. et al. Transcriptome analysis of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-infected tomatoes: a role of salicylic acid in the host response. *BMC Plant Biol* 21, 476 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03251-8>;
197. Gust A.A. Peptidoglycan Perception in Plants. *PLoS Pathog.* (2015), 11 (12): e1005275. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005275>;
198. Lee, SM., Kong, H.G., Song, G.C. et al. Disruption of Firmicutes and Actinobacteria abundance in tomato rhizosphere causes the incidence of bacterial wilt disease. *ISME J* 15, 330–347 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00785-x>;
199. Dobrzyński J, Jakubowska Z, Kulkova I, Kowalczyk P, Kramkowski K. Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*. *Front Microbiol.* 2023 Jul 25; 14:1194606. doi: 10.3389/fmicb.2023.1194606;
200. Kamble, G.R., Hiremath, G.B., Hiremath, S.V., Hiremath, M.B. 2022. Bacterial pigments: An Untapped Colorful Microbial World. In Mulla S.I., Bharagava, R.N. (eds). *Enzymes for Pollutant Degradation. Microorganisms for Sustainability.* Springer Nature 30. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4574-7_15;
201. Mahendran, S., Sankaralingam, S., Maheswari, P., Annalakshmi, P., Pandiarajan, J., Seethapathy, P., Harinathan, B., Palpperumal, S., Yasothkumar, N., Benkatesh, S. 2022. Isolation and purification of phycocyanin pigments from *Spirulina* sp. biomass and evaluation of its anticancer and antioxidant potential. *Biomass Conversion and Biorefinery.* <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02765-x>

202. Sy Le Thanh Nguyen, Tien Cuong Nguyen, Thi Tuyen Do, Trong Luong Vu, Thi Thao Nguyen, Thi Thao Do, Thi Hien Trang Nguyen, Thanh Hoang Le, Dinh Kha Trinh, Thi Anh Tuyet Nguyen. 2022. Study on the Anticancer Activity of Prodigiosin from Variants of *Serratia Marcescens* QBN VTCC 910026. *BioMed Research International* 2022:4053074. <https://doi.org/10.1155/2022/4053074>;
203. Polapally, R, Mansani, M, Rajkumar, K, Burgula, S, Hameeda, B, Alhazmi, A, Bantun, F., Almalki, A.H., Haque, S., El Enshasy, H.A., Sayyed, R.Z. 2022. Melanin pigment of *Streptomyces puniceus* RHPR9 exhibits antibacterial, antioxidant and anticancer activities. *PLoS ONE* 17(4):e0266676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266676>;
204. Lazic, J.; Skaro Bogojevic, S.; Vojnovic, S.; Aleksic, I.; Milivojevic, D.; Kretschmar, M.; Gulder, T.; Petkovic, M.; Nikodinovic-Runic, J. Synthesis. 2022. Anticancer Potential and Comprehensive Toxicity Studies of Novel Brominated Derivatives of Bacterial Biopigment Prodigiosin from *Serratia marcescens* ATCC 27117. *Molecules* 27:3729. <https://doi.org/10.3390/molecules27123729>;
205. Kanelli, M., Saleh, B., Webster, T.J., Bouyiouka, S., Topakas, E. 2022. Co-encapsulation of violacein and iron oxide in poly (lactic acid) nanoparticles for simultaneous antibacterial and anticancer applications *Journal of Biomedical Nanotechnology* 18(3):729-739. <https://doi.org/10.1166/jbn.2022.3305>;
206. Rivero Berti, I., Rodenak-Kladniew, B.E., Katz, S.F., Arrua, E.C., Alvarez, V.A., Duran, N., Castro, G.R. 2022. Enzymatic active release of violacein present in nanostructured lipid carrier by lipase encapsulated in 3D-bioprinted chitosan-hydroxypropyl methylcellulose matrix with anticancer activity. *Frontiers in Chemistry* 10:914126. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.914126>;
207. Milosevic, E., Stanisavljevic, N., Boskovic, S., Stamenkovic, N., Novkovic, M., Bavelloni, A., Cenni, V., Kojic, S., Jasnic, J. 2023. Antitumor activity of natural pigment violacein against osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s00432-023-04930-9>;

208. Ahmadi Fakh, Fatemeh. 2012. An investigation of antileukemia activity of violacein-loaded dendrimer in Jurkat cell lines. *African Journal of Microbiology Research*. Vol 6(33):6235-6242. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.741>;
209. Martelli, A.M., Tabellini, G., Bressanin, D., Ognibene, A., Goto, K., Cocco, L., Evangelisti, C. 2012. The emerging multiple roles of nuclear Akt, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. *Molecular Cell Research* 1823(12):2168-2178. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.08.017>;
210. Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R.L., Cepero E., H Boise, L. 2013. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *Biomolecular and Cell Biology* 14(32). <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-32>;
211. Berridge, M.V., Tan, A.S. 1993. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303(2):474-482. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Удельный прирост колониеобразующих единиц ($lg(KOE/мл)$) штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D как показатель при подборе состава жидкой питательной среды

Наименование питательной среды	Численность колоний, N		Численность колониеобразующих единиц, $lg(KOE/мл)$		Удельный прирост, R
	0 час	12 час	0 час	12 час	
Среда NB	23	5	7,36	7,69	0,07
	22	10	7,34	8,00	
	19	8	7,28	7,90	
Среднее арифметическое значение, M			7,33	7,87	
Среда LB	31	207	7,491362	9,32	0,26
	22	215	7,342423	9,33	
	22	223	7,342423	9,35	
Среднее арифметическое значение, M			7,39	9,33	
Среда 1% пептон	21	633	7,32	9,80	0,34
	25	664	7,39	9,82	
	20	672	7,30	9,83	
Среднее арифметическое значение, M			7,34	9,82	
Среда 3% пептон	27	868	7,431364	9,94	0,34
	22	847	7,342423	9,93	
	24	817	7,380211	9,91	
Среднее арифметическое значение, M			7,38	9,93	
Среда Сабуро	24	402	7,380211	9,60	0,31
	21	423	7,322219	9,63	
	26	437	7,414973	9,64	
Среднее арифметическое значение, M			7,37	9,62	

Генеральные параметры средней арифметической численности колониеобразующих единиц ($lg(KOE/мл)$) штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D как показатель при подборе состава жидкой питательной среды

Генеральные параметры средней арифметической	Значения для питательных сред на момент измерения									
	Среда NB		Среда LB		Среда 1% пептон		Среда 3% пептон		Среда Сабуро	
	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12
Средняя арифметическая, М	7,33±0,07	7,87±0,25	7,39±0,14	9,33±0,03	7,34±0,14	9,82±0,02	7,38±0,07	9,93±0,02	7,37±0,08	9,62±0,03
Сумма квадратов разницы, $\sum(V_i-M)^2$	0,00	0,05	0,01	0,001	0,01	0,0004	0,004	0,0003	0,004	0,0007
Ср. квадратическое отклонение, σ	0,04	0,15	0,09	0,02	0,09	0,01	0,04	0,01	0,05	0,02
Ошибка репрезентативности, m	0,03	0,09	0,05	0,01	0,05	0,01	0,03	0,01	0,03	0,01
Относительная погрешность измерения, $\xi\%$	0,34	1,13	0,67	0,10	0,68	0,08	0,35	0,08	0,37	0,11

Приложение 3

Количество колоний штаммов *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 и *J. lividum* ВКМ В-3705D при совместном культивировании в жидкой питательной среде

Варианты	Время инкубации			
	0	6	12	24
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	2	10	138	10
	3	11	282	20
<i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	13	9	50	845
	9	5	95	723
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 совместно с <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	28	9	58	3
	42	5	80	2
<i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D совместно с <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	4	8	4	403
	2	7	7	350

Приложение 4

Колониеобразующие единицы ($lg(KOE/мл)$) штаммов *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 и *J. lividum* ВКМ В-3705D при совместном культивировании в жидкой питательной среде как показатель численного соотношения популяций

Варианты	Время инкубации							
	0		6		12		24	
	<i>KOE/мл</i>	<i>lg(KOE/мл)</i>	<i>KOE/мл</i>	<i>lg(KOE/мл)</i>	<i>KOE/мл</i>	<i>lg(KOE/мл)</i>	<i>KOE/мл</i>	<i>lg(KOE/мл)</i>
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	$3 \cdot 10^6$	6,48	$1 \cdot 10^7$	7	$1,38 \cdot 10^{13}$	13,14	$1 \cdot 10^{10}$	10,0
	$2 \cdot 10^6$	6,3	$1,1 \cdot 10^7$	7,04	$2,82 \cdot 10^{13}$	13,45	$2 \cdot 10^{10}$	10,3
Среднее арифметическое значение (M)	$2,5 \cdot 10^6$	6,39	$1,05 \cdot 10^7$	7,02	$2,1 \cdot 10^{13}$	13,3	$1,5 \cdot 10^{10}$	10,15
<i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	$1,3 \cdot 10^7$	7,11	$2,1 \cdot 10^7$	7,32	$5 \cdot 10^{10}$	10,7	$8,45 \cdot 10^{11}$	11,93
	$9 \cdot 10^6$	6,95	$3,6 \cdot 10^7$	7,56	$9,5 \cdot 10^{10}$	10,98	$7,23 \cdot 10^{11}$	11,86
Среднее арифметическое значение (M)	$1,1 \cdot 10^7$	7,03	$2,85 \cdot 10^7$	7,44	$7,25 \cdot 10^{10}$	10,84	$7,84 \cdot 10^{11}$	11,89
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 совместно с <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	$2,8 \cdot 10^7$	7,45	$9 \cdot 10^6$	6,95	$5,8 \cdot 10^{12}$	12,76	$3 \cdot 10^{11}$	11,48
	$4,2 \cdot 10^7$	7,62	$5 \cdot 10^6$	6,7	$8 \cdot 10^{12}$	12,9	$2 \cdot 10^{11}$	11,3
Среднее арифметическое значение (M)	$3,5 \cdot 10^7$	7,54	$7 \cdot 10^6$	6,83	$6,9 \cdot 10^{12}$	12,83	$2,5 \cdot 10^{11}$	11,39
<i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D совместно с <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	$4 \cdot 10^6$	6,6	$8 \cdot 10^6$	6,9	$4 \cdot 10^{11}$	11,6	$4,03 \cdot 10^{13}$	13,61
	$2 \cdot 10^6$	6,3	$7 \cdot 10^6$	6,85	$7 \cdot 10^{11}$	11,85	$3,5 \cdot 10^{13}$	13,54
Среднее арифметическое значение (M)	$3 \cdot 10^6$	6,45	$7,5 \cdot 10^6$	6,87	$5,5 \cdot 10^{11}$	11,72	$3,77 \cdot 10^{13}$	13,57

Приложение 5

Расчет относительной погрешности измерения численности колониеобразующих единиц ($lg(KOE/мл)$) штаммов *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 и *J. lividum* ВКМ В-3705D при совместном культивировании в жидкой питательной среде как показатель численного соотношения популяций

Варианты	Параметры			
	$KOE/мл$	$lg(KOE/мл) \pm \Delta$	Среднее квадратическое отклонение, σ	Относительная погрешность измерения, %
0 час инкубации (исходные значения)				
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	$1,1 \cdot 10^7$	$7,03 \pm 1,0$	0,1	1,1
чистая культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	$2,5 \cdot 10^6$	$6,4 \pm 1,1$	0,1	1,4
культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D в присутствии <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	$3 \cdot 10^6$	$6,5 \pm 1,9$	0,2	2,3
культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 в присутствии <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	$3,5 \cdot 10^7$	$7,5 \pm 1,1$	0,1	1,2
6 час инкубации				
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	$2,85 \cdot 10^7$	$7,4 \pm 1,5$	0,2	1,6
чистая культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	$1,05 \cdot 10^7$	$7,0 \pm 0,3$	0,03	0,3
культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D в присутствии <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	$7,5 \cdot 10^6$	$6,9 \pm 0,4$	0,04	0,4
культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 в присутствии <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	$7 \cdot 10^6$	$6,8 \pm 1,6$	0,2	1,9
12 час инкубации				
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	$7,25 \cdot 10^{10}$	$10,8 \pm 1,8$	0,2	1,3
чистая культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	$2,1 \cdot 10^{13}$	$13,3 \pm 2$	0,2	1,2
культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D в присутствии <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	$5,5 \cdot 10^{11}$	$11,7 \pm 1,5$	0,2	1,0
культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 в присутствии <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	$6,9 \cdot 10^{12}$	$12,8 \pm 0,9$	0,1	0,5
24 час инкубации				
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	$7,84 \cdot 10^{11}$	$11,9 \pm 0,4$	0,05	0,3
чистая культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	$1,5 \cdot 10^{10}$	$10,2 \pm 1,9$	0,2	1,5
культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D в присутствии <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	$3,8 \cdot 10^{13}$	$13,6 \pm 0,4$	0,04	0,2
культура <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 в присутствии <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	$2,5 \cdot 10^{11}$	$11,4 \pm 1,1$	0,1	0,8

Приложение 6

Расчет достоверности различия средних арифметических значений численности колониеобразующих единиц ($lg(KOE/мл)$) штаммов *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 и *J. lividum* ВКМ В-3705D разностным методом с использованием критерия Стьюдента (t-критерий) при совместном культивировании в жидкой питательной среде на нулевой час инкубации

Варианты	Разность $lg(KOE/мл)$ сравниваемых вариантов, d	Квадрат разницы $lg(KOE/мл)$ сравниваемых вариантов и средней арифметической, $(d-\bar{d})^2$	Sd	Критерий достоверности Стьюдента, t
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402- <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 совместно с <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	0,97	0,03	0,18	6,5
	1,32	0,03		
	$\bar{d} = 1,15$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,06$		
<i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D - <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D совместно с <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	0,51	0,005	0,07	8,24
	0,65	0,005		
	$\bar{d} = 0,58$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,01$		
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 совместно с <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D - <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D совместно с <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	0,85	0,06	0,24	4,54
	1,32	0,06		
	$\bar{d} = 1,08$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,11$		

Расчет достоверности различия средних арифметических значений численности колониеобразующих единиц ($lg(KOE/мл)$) штаммов *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 и *J. lividum* ВКМ В-3705D разностным методом с использованием критерия Стьюдента (t-критерий) при совместном культивировании в жидкой питательной среде на шестой час инкубации

Варианты	Разность $lg(KOE/мл)$ сравниваемых вариантов, d	Квадрат разницы $lg(KOE/мл)$ сравниваемых вариантов и средней арифметической, $(d-\bar{d})^2$	Sd	Критерий достоверности Стьюдента, t
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402- <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 совместно с <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	0,05	0,02	0,15	1,3
	0,34	0,02		
	$\bar{d} = 0,19$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,04$		
<i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D - <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D совместно с <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	0,42	0,02	0,15	3,87
	0,71	0,02		
	$\bar{d} = 0,57$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,04$		
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 совместно с <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D - <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D совместно с <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	0,05	0,01	0,1	0,48
	-0,15	0,01		
	$\bar{d} = -0,05$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,02$		

Расчет достоверности различия средних арифметических значений численности колониеобразующих единиц ($lg(KOE/мл)$) штаммов *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 и *J. lividum* ВКМ В-3705D разностным методом с использованием критерия Стьюдента (t-критерий) при совместном культивировании в жидкой питательной среде на двенадцатый час инкубации

Варианты	Разность $lg(KOE/мл)$ сравниваемых вариантов, d	Квадрат разницы $lg(KOE/мл)$ сравниваемых вариантов и средней арифметической, $(d-\bar{d})^2$	Sd	Критерий достоверности Стьюдента, t
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402- <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 совместно с <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	1,48	0,06	0,24	5,19
	1,00	0,06		
	$\bar{d} = 1,24$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,11$		
<i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D - <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D совместно с <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	1,68	0,0001	0,01	156
	1,7	0,0001		
	$\bar{d} = 1,69$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,0002$		
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 совместно с <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D - <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D совместно с <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	2,13	0,003	0,01	38,06
	2,24	0,003		
	$\bar{d} = 2,19$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,01$		

Расчет достоверности различия средних арифметических значений численности колониеобразующих единиц ($lg(KOE/мл)$) штаммов *C. michiganensis* ВКМ Ас-1402 и *J. lividum* ВКМ В-3705D разностным методом с использованием критерия Стьюдента (t-критерий) при совместном культивировании в жидкой питательной среде на двадцать четвертый час инкубации

Варианты	Разность $lg(KOE/мл)$ сравниваемых вариантов, d	Квадрат разницы $lg(KOE/мл)$ сравниваемых вариантов и средней арифметической, $(d-\bar{d})^2$	Sd	Критерий достоверности Стьюдента, t
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 - <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 совместно с <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D	1,48	0,06	0,24	5,19
	1,00	0,06		
	$\bar{d} = 1,24$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,11$		
<i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D - <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D совместно с <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	1,68	0,0001	0,01	156
	1,7	0,0001		
	$\bar{d} = 1,69$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,0002$		
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 совместно с <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D - <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D совместно с <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402	2,13	0,003	0,01	38,06
	2,24	0,003		
	$\bar{d} = 2,19$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,01$		

Расчет достоверности различия средних арифметических значений
численности колониеобразующих единиц ($lg(KOE/мл)$) штамма *J. lividum*
ВКМ В-3705D в жидкой питательной среде разностным методом с
использованием критерия Стьюдента (t-критерий)

Варианты	Разность $lg(KOE/мл)$ сравниваемых вариантов, d	Квадрат разницы $lg(KOE/мл)$ сравниваемых вариантов и средней арифметической, $(d-\bar{d})^2$	Sd	Критерий достоверности Стьюдента, t
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D на 0 час инкубации (исходные значения) - чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D на 6 час инкубации	0,21	0,04	0,2	2,06
	0,60	0,04		
	$\bar{d} = 0,41$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,08$		
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D на 6 час инкубации - чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D на 12 час инкубации	3,38	0,0005	0,02	152,2
	3,42	0,0005		
	$\bar{d} = 3,4$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,001$		
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D на 12 час инкубации - чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D на 24 час инкубации	1,23	0,03	0,17	6,09
	0,88	0,03		
	$\bar{d} = 1,05$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,06$		
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D на 0 час инкубации (исходные значения) - чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D на 12 час инкубации	3,59	0,05	0,22	17,35
	4,02	0,05		
	$\bar{d} = 3,8$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,1$		
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D на 0 час инкубации (исходные значения) - чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D на 24 час инкубации	4,81	0,002	0,05	105,7
	4,9	0,002		
	$\bar{d} = 4,86$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,004$		
чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D на 6 час инкубации - чистая культура <i>J. lividum</i> ВКМ В-3705D на 24 час инкубации	4,6	0,023	0,15	29,5
	4,3	0,023		
	$\bar{d} = 4,45$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,046$		

Расчет достоверности различия средних арифметических значений численности колониеобразующих единиц ($lg(KOE/мл)$) штамма *S. michiganensis* ВКМ Ас-1402 в жидкой питательной среде разностным методом с использованием критерия Стьюдента (t-критерий)

Варианты	Разность $lg(KOE/мл)$ сравниваемых вариантов, d	Квадрат разницы $lg(KOE/мл)$ сравниваемых вариантов и средней арифметической, $(d-\bar{d})^2$	Sd	Критерий достоверности Стьюдента, t
чистая культура <i>S. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 на 0 час инкубации (исходные значения) - чистая культура <i>S. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 на 6 час инкубации	0,52	0,012	0,11	5,81
	0,74	0,012		
	$\bar{d} = 0,63$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,024$		
чистая культура <i>S. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 на 6 час инкубации - чистая культура <i>S. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 на 12 час инкубации	6,14	0,018	0,13	46,7
	6,41	0,018		
	$\bar{d} = 3,4$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,036$		
чистая культура <i>S. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 на 12 час инкубации - чистая культура <i>S. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 на 24 час инкубации	3,14	0,00002	0,005	673,4
	3,15	0,00002		
	$\bar{d} = 1,05$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,00004$		
чистая культура <i>S. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 на 0 час инкубации (исходные значения) - чистая культура <i>S. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 на 12 час инкубации	6,66	0,06	0,24	28,4
	7,15	0,06		
	$\bar{d} = 6,9$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,12$		
чистая культура <i>S. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 на 0 час инкубации (исходные значения) - чистая культура <i>S. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 на 24 час инкубации	3,52	0,06	0,24	15,8
	4,00	0,06		
	$\bar{d} = 3,76$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,11$		
чистая культура <i>S. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 на 6 час инкубации - чистая культура <i>S. michiganensis</i> ВКМ Ас-1402 на 24 час инкубации	3,00	0,017	0,13	24,1
	3,26	0,017		
	$\bar{d} = 3,13$	$\Sigma(d-\bar{d})^2 = 0,034$		