

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
"КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"**

**ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ**

---

**БОЛЬШОЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРАКТИКУМ.**

**Часть 1**

**Учебно-методическое пособие**

**КАЗАНЬ – 2023**

УДК330.15

Рекомендовано учебно-методической комиссией  
Института экологии и природопользования  
(Протокол № 6 от 18 декабря 2023 г.)

**Бикташева Л.Р., Данилова Н.В., Селивановская С.Ю.** Большой биотехнологический практикум. Часть 1: Учебно-методическое пособие. - Казань, 2023. - 20 с.

Учебно-методическое пособие содержит информацию о биотехнологических методах, применяемых для работы с микроорганизмами. В учебном пособии представлены указания по выполнению лабораторных работ, целью которых является изучение биотехнологических способов получения биосурфактантов с использованием различных микроорганизмов-продуцентов, а также физико-химических и биологических методов анализа полученных веществ.

Предназначено для сопровождения курса «Большой биотехнологический практикум» для бакалавров, обучающихся по направлению «Биотехнология».

Может представлять интерес для преподавателей, студентов, аспирантов, а также специалистов в области экономики и управления в сфере охраны окружающей среды и биотехнологической деятельности.

Ил. 6. Библиогр.: 13 назв.

Рецензент: д.б.н., проф. Степанова Н.Ю. (Казанский  
(Приволжский) федеральный университет)

## Содержание

1. Выделение микроорганизмов, способных к образованию биосурфактантов, из объектов окружающей среды .....	4
2. Культивирование бактерий, продуцирующих биосурфактанты на средах с разными углеродными субстратами .....	6
3. Оценка эмульгирующей активности биосурфактантов .....	7
4. Определение поверхностного натяжения .....	8
5. Косвенные методы измерения поверхностной/межфазной активности .....	9
6. Экстракция биосурфактантов .....	11
7. Проведение качественной характеристики продукта с помощью ИК-Фурье .....	12
8. Проведение качественной характеристики продукта с помощью ТСХ .....	13
9. Оценка влияния биосурфактантов на фитопатогены растений в чашках .....	15
10. Оценка влияния биосурфактантов на фитопатогены растений <i>in vitro</i> .....	17
Список литературы .....	20

## **1. Выделение микроорганизмов, способных к образованию биосурфактантов, из объектов окружающей среды**

Живые организмы способны продуцировать поверхностно-активные вещества (ПАВ), из-за их биологического происхождения такие соединения получили название биоПАВ [1]. Биосурфактанты, представляют интерес с точки зрения их использования в различных областях, таких как борьба с фитопатогенами растений, усиление добычи сырой нефти, изготовление бытовой химии и лекарственных препаратов. Биосурфактанты в сельском хозяйстве могут применяться в качестве адъювантов совместно с пестицидами (заменяя токсичные синтетические ПАВ), в качестве агентов биоконтроля для подавления роста грибковых патогенов растений, а также в качестве удобрений улучшающих свойства почв [2]. Достоинствами применения биосурфактантов в сельском хозяйстве является их безопасность для окружающей среды, а также родственность микробному сообществу почвы. Использование биосурфактантов в области повышения нефтедобычи, обусловлено их способностью сокращать межфазное натяжение между нефтью и породой, а, следовательно, и уменьшать капиллярные силы. В связи с большим интересом к применению биосурфактантов разработка и поиск эффективных биосурфактантов и их продуцентов продолжается. Многие живые организмы способны к получению биосурфактантов, это и грибы, водоросли и высшие растения. Наибольшим разнообразием типов биосурфактантов, однако характеризуются бактерии.

Они продуцируют биоПАВ с разнообразными химическими структурами [3]. Гидрофобная часть этих веществ (неполярный “хвост”) наиболее часто представлена остатками жирных кислот, а гидрофильная (полярная “головка”) – остатками фосфорной кислоты, карбоксильными группами природных кислот, аминокислотами, пептидами, моно-, ди-, или полисахаридами и др. БиоПАВ характеризуются высокой поверхностной и эмульгирующей активностью. БиоПАВ разделяют на два основных класса: низкомолекулярные соединения, называемые биосурфактантами (липopeптиды, гликолипиды, пептиды), и высокомолекулярные полимеры (полисахариды, протеины, липополисахариды, липопротеины или комплекс этих биополимеров), которые называются биоэмульсанами или биоэмульгаторами. В первую группу входят молекулы, которые могут эффективно снижать поверхностное и межфазное натяжение, а ко второй относятся амфифильные и полифильные полимеры, обладающие высокой и стабильной эмульгирующей активностью в системе «масло-вода», но не высокой поверхностной активностью. По своему строению биоПАВ классифицируются на гликолипиды (рамнолипиды, трегалолипиды, софоролипиды); липopeптиды и липопротеины; жирные

кислоты; фосфолипиды; полимерные сурфактанты; связанные биосурфактанты. Для микроорганизмов разных таксономических групп характерны различные типы биоПАВ.

#### Средства измерений, реактивы и материалы

- Воронки стеклянные лабораторные;
- стеклянные стаканы;
- шейкер для приготовления водных вытяжек;
- чашки Петри;
- спиртовая горелка;
- стерильный бокс;
- стерильные наконечники для дозаторов;
- лабораторная плитка;
- холодильник;
- стеклянные колбы на 50, 250 мл;
- стерильные пробирки;
- дозаторы одноканальные;
- автоклав;
- колбы конические объемом 250 мл со шлифом;
- пробки;
- термостат;
- центрифуга;
- дистиллированная вода

#### Ход работы

Берут 1 г нефтезагрязненной почвы (чистые почвы, ризосфера растений, нефтешламы, отходы) и помещают его в жидкую среду с глицерином в качестве единственного источника углерода ( $\text{Na}_4\text{NO}_3$  - 1,38 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 3 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  - 9,2 г,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 г, Глицерин - 30 г, доводим дистиллированной водой до 1л).

Культивируют при 28°C в термостате при равномерном перемешивании 120 rpm в течение 5 суток. Из жидкой среды методом предельных разведений из разведений  $10^4$ - $10^7$  степеней сеют микроорганизмы на чашки Петри с твердой средой МПА.

Метод предельных разведений предполагает разбавления исходной культуры заключается в последовательном десятикратном разведении исходной культуральной жидкости до тех пор, пока в последней пробирке можно будет предположить наличие хотя бы одной бактериальной клетки. Для чего из исходной жидкой культуры стерильной

пипеткой берут 1 мл суспензии и переносят в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды. Таким образом концентрация клеток в растворе уменьшится в 10 раз (разведение  $10^{-1}$ ). Другой стерильной пипеткой берут 1 мл из первой пробирки и переносят во вторую, тщательно промывая пипетку. Таким образом культуру разводят необходимое количество раз ( $10^4$ - $10^7$ ).

Посев из жидкой культуры проводят методом Дригальского - посевной материал распределяют по поверхности чашки Петри с помощью шпателем Дригальского.

Чашки Петри выдерживают в термостате в течение суток при  $28^{\circ}\text{C}$ . Выросшие колонии оценивают по внешнему виду и пересевают отдельные изоляты на новые чашки Петри со средой МПА (42 г готового порошка МПА, *доводим дистиллированной водой до 1л*).

Отдельные колонии сеют «на чистоту» следующим образом:

Прокаливают микроскопическую петлю в пламени горелки, остужают ее о стенку чашки либо чистый участок среды. Затем с чашки захватывают немного материала и переносят его в чистую чашку Петри со средой и наносят 3 параллельных штриха. Все манипуляции производят над пламенем горелки. Затем петлю снова прокаливают и остужают. Следующие три штриха проводят также параллельно, и к тому же пересекаясь с тремя предыдущими. Штрихи наносят таким образом, чтобы получилось 9 штрихов.

Чашки с посевами выдерживают в течение суток вверх дном (для избежания запотевания) в термостате при  $28^{\circ}\text{C}$ , затем хранят при  $4^{\circ}\text{C}$  при необходимости.

## **2. Культивирование бактерий, продуцирующих биосурфактанты на средах с разными углеродными субстратами**

На производство бактериями биосурфактантов влияют многие факторы, одним из основных является состав питательной среды. От среды зависит как количество продуцируемых биосурфактантов, так и их природа. Для подбора наиболее эффективных параметров культивирования производится посев штаммов на среды с разными типами субстратов в качестве источника углеродов.

### Средства измерений, реактивы и материалы

- воронки стеклянные лабораторные;
- стеклянные стаканы,
- колбы;
- дозаторы одноканальные;
- лабораторная плитка;

- холодильник;
- стерильные пробирки;
- автоклав;
- весы лабораторные;
- колбы конические объемом 250 мл со шлифом;
- термостат;
- центрифуга;
- дистиллированная вода;

### Ход работы

В ходе работы выделенных на первом этапе микроорганизмы с чашек Петри будут культивированы на жидких средах для последующей оценки их способности к продуцированию биосурфактантов.

Чистые колонии микроорганизмов переносят с чашки Петри в прекультуру – 20 мл раствор среды LB (NaCl - 10 г, пептон - 10 г, дрожжевой экстракт - 5 г, доводим дистиллированной водой до 1л, готовую среду автоклавируем при 121 °С в течение 20 минут).

Наращивание биосурфактантов будет проводиться на минеральной среде (NaNO<sub>3</sub> 2,0, KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> 0,5, K<sub>2</sub>НРO<sub>4</sub> 1,0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5, KCl 0,1, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,01) с разными углеродными субстратами в количестве 2% – глицерин, глюкоза, гексан, нефть, маслосодержащие отходы.

В данные среды вносят инокулят прекультуры в объеме 2% (об./об.), что соответствует оптической плотности 1,0 при 600 нм и 10<sup>8</sup> колониеобразующих единиц КОЕ/мл. Штаммы бактерий инокулируют в колбы на 250 мл, содержащие 100 мл среды. Колбы инкубируют при 28 °С и 150 об/мин в роторном инкубаторе в течение 72 часов.

В ходе культивирования проводится изучение влияния состава среды на динамику численности клеток микроорганизмов методом измерения оптической плотности с помощью фотоэлектроколориметра КФК и количество вырабатываемых биосурфактантов методами E24 и падающей капли.

### **3. Оценка эмульгирующей активности биосурфактантов**

Некоторые микроорганизмы продуцируют амфифильные и полифильные полимеры, которые обладают высокой и стабильной эмульгирующей активностью в системе «масло-вода». В этом случае следует оценивать способность продуцируемых микроорганизмами соединений эмульгировать две несмешивающиеся жидкости.

### Средства измерений, реактивы и материалы

- Стеклянные пробирки (объемом 10 мл)
- Сырая нефть
- Центрифуга (5000 обор./мин.)
- Дозаторы (1-5 мл)
- Пластиковые наконечники (1-5 мл)
- Раствор синтетического ПАВ
- Вортекс
- Линейка

### Ход работы

Индекс эмульсификации E24 определяется для каждого штамма в двух повторностях следующим образом: к 4 мл сырой нефти добавляют 4 мл бесклеточного супернатанта [4] Полученную смесь встряхивают на вортексе в течение 5 минут для получения стойкой эмульсии и оставляют на 24 часа. Затем измеряют высоту слоя эмульсии и общую высоту столба жидкости в пробирке. Отрицательный контроль представляет собой воду, а в качестве положительного контроля используют сырую нефть с синтетическим ПАВ. Индекс E24 рассчитывают по формуле (1):

$$E24 = \frac{\text{высота слоя эмульсии}}{\text{общая высота столбика жидкости в пробирке}} \times 100 \% \quad (1)$$

## **4. Определение поверхностного натяжения**

Этот простой метод исследования подходит для предварительного скрининга микроорганизмов, способных продуцировать биосурфактанты. Межфазное или поверхностное натяжение жидкости можно измерить различными способами. Однако существует ограничение в диапазоне измерений. Поверхностное натяжение снижается с увеличением концентрации биосурфактантов до достижения значения ККМ. Если концентрация биосурфактанта находится выше значения ККМ, то более высокие концентрации невозможно определить. Таким образом, две среды с разными концентрациями биосурфактанта могут иметь одинаковое поверхностное натяжение. Эта проблема может быть решена путем серийного разбавления до тех пор, пока не будет наблюдаться резкое увеличение поверхностного натяжения. Соответствующее разбавление бесклеточной среды называется критическим мицеллярным разбавлением (critical micelle dilution - CMD) и коррелирует с концентрацией биосурфактанта. Кроме того, на результаты



измерения значительно влияют факторы, такие как рН среды и ионная сила. В случае присутствия гидрофобных веществ в культуральной среде, например, в качестве субстратов, то они тоже влияют на значение поверхностного натяжения. Для скрининга применяются несколько методов, которые могут быть использованы для измерения поверхностного и межфазного натяжения жидкости. Наибольшее применение нашел простой метод отрыва кольца Дю Нуи (Du-Nouy Ring).

Метод отрыва кольца основан на измерении силы, необходимой для отсоединения кольца на границе двух жидких фаз или на поверхности раздела фаз «жидкость/воздух». Сила отрыва пропорциональна поверхностному натяжению на границе раздела фаз. Ее можно измерить с помощью автоматизированного тензиометра. Купер [5] выяснил, что уменьшение поверхностного натяжения на границе «вода-воздух» до 40 мН/м и ниже, свидетельствует о присутствии биосурфактантов в культуральной среде. Уильямсен и Карлсон [6] предложили аналогичный подход для обнаружения биосурфактантов и их продуцентов: эффективными продуцентами биосурфактантов являются бактерии, которые способны снижать поверхностное натяжение среды больше чем на 20 мН/м, по сравнению с дистиллированной водой.

#### Средства измерений, реактивы и материалы

- Тензиометр К20 (KRUSS)
- стеклянные стаканы
- дистиллированная вода
- газовая горелка

#### Ход работы

Оценка поверхностного натяжения проводится в бесклеточном супернатанте культуры штаммов. Бесклеточный супернатант получают с помощью центрифугирования жидкой культуры клеток (10 минут, 5000 обор./мин.). Первоначально измеряется поверхностное натяжение холостой жидкости (дистиллированной воды и среды для культивирования). Стеклянные стаканы для измерения поверхностного натяжения промывают водой с содой, без использования ПАВ. Перед измерением на газовой или спиртовой горелке прокаливается платиновое кольцо Дю Нуи. Затем с помощью тензиометра измеряется сила отрыва кольца, определяющее поверхностное натяжение жидкости.

### **5. Косвенные методы измерения поверхностной/межфазной активности**

#### ***Метод падения капли (Drop Collapse Assay)***

Эти методы основаны на взаимодействии среды, содержащей ПАВ, с гидрофобными поверхностями или веществами. Заин с соавт. в работе [7] разработали метод коллапса капель. Этот метод основан на дестабилизации жидкой капли биосурфактантами. Капли жидкости (культуральная среда, бесклеточный супернатант, суспензия биосурфактантов) наносят на твердую поверхность, покрытую гидрофобным субстратом. В случае отсутствия биосурфактантов полярные молекулы воды отталкиваются от гидрофобной поверхности, и капли остаются стабильными. Наоборот, в присутствии биосурфактантов капли расширяются или даже разрушаются из-за уменьшения силы отталкивания между каплями жидкости и гидрофобной поверхностью. Стабильность капли зависит от концентрации биосурфактантов и коррелирует с поверхностным и межфазным натяжением. Подобный анализ был описан Перссон и Молин [8] с использованием поверхности стекла вместо поверхности, покрытой гидрофобным субстратом. Метод падения капли выполняется быстро и легко на небольшом объеме образца, не требует специального оборудования.

#### Средства измерений, реактивы и материалы

- Предметные стекла
- дистиллированная вода
- сырая нефть
- дозаторы (10-100 мкл)
- пластиковые наконечники (10-100 мкл)
- линейка

#### Ход работы

На предметное стекло помещается 100 мкл сырой нефти, в центр помещается 10 мкл бесклеточного супернатанта, содержащего биосурфактанты. Через 5 мин измеряют диаметр вытесненной капли и детектируют результат с помощью фотографирования на фоне линейки.

## 6. Экстракция биосурфактантов

Для дальнейшего использования необходимо отделить продуцированный бактериями биосурфактант из культуральной жидкости. Традиционные методы разделения и очистки биосурфактантов включают кислотное осаждение, осаждение органическими растворителями и высаливание, а также разделение пенной флотацией и мембранное разделение. Полученные и очищенные биосурфактанты в дальнейшем могут храниться и использоваться для оценки их свойств и подавления фитопатогенных грибов.

### Средства измерений, реактивы и материалы

- Стерильные фильтры Millipore 0,22 мкм;
- пробирки типа Эппендорф 2 мл;
- воронки стеклянные лабораторные;
- стеклянные стаканы,
- колбы;
- дозаторы одноканальные;
- лабораторная плитка;
- холодильник;
- автоклав;
- весы лабораторные;
- колбы конические объемом 250 мл со шлифом;
- термостат;
- центрифуга;
- дистиллированная вода;
- этанол;
- хлороформ;
- 5М HCl;

### Ход работы

#### **Кислотное осаждение биосурфактантов**

Для выделения биосурфактантов из ферментативного бульона предварительно с помощью центрифугирования (2400 об./мин., 30 минут, 24 °C) удаляют клетки микроорганизмов. Бесклеточный супернатант подкисляют 5М HCl до pH 2. Осадок, образовавшийся после выдерживания при 4 °C в течение 12 ч, осаждают центрифугированием (2400 об./мин., 30 минут, 4 °C) [9].

## Жидкостная экстракция биосурфактантов

Подкисленный осадок биосурфактантов добавляют к смеси метанол:хлороформ 1:1, при соотношении твердого вещества к жидкости 1:10. Экстракт отделяют фильтрованием через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, отгоняя растворитель на роторном испарителе при температуре 55°C, а затем лиофилизируют до получения воскоподобной массы биосурфактантов. Выход продукта определяют гравиметрически.

### 7. Проведение качественной характеристики продукта с помощью ИК-Фурье

Отнесение полученных продуктов к биосурфактантам проводится с помощью ИК-спектроскопии. Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR) используется для определения типов химических связей и функциональных групп по поглощению инфракрасного излучения в разных областях спектра, следовательно, может быть использована для идентификации принадлежности к классам органических соединений некоторых компонентов неизвестной смеси, а также выявления отдельных фрагментов природных макромолекул.

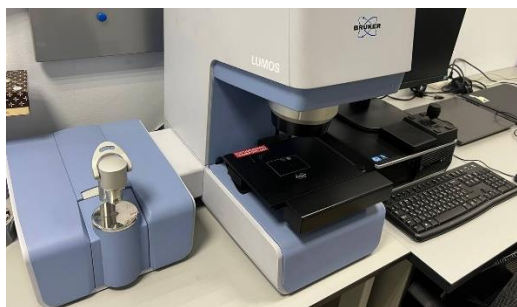


Рис.1. Исследовательский ИК-Фурье микроскоп Bruker LUMOS I

#### Средства измерений, реактивы и материалы

- Стеклянные стаканы,
- стерильные колбы;
- стерильные фильтры Millipore 0,22 мкм;
- дозатор одноканальные;
- холодильник;
- автоклав;
- весы лабораторные;
- фальконы 50 мл;
- пробирки типа Эппендорф 2 мл;
- центрифуга;
- ультразвуковая ванна;

- дистиллированная вода;
- Lumos I (Bruker, США);

### Ход работы

Для определения типа и структуры осажденных биосурфактантов используют технику спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО), позволяющую наносить лиофилизированный образец без дополнительных процедур пробоподготовки, с использованием прибора Lumos I (Bruker, Billerica, MA, USA). Спектры были получены в диапазоне волновых чисел от 4000 до 600  $\text{cm}^{-1}$  со спектральным разрешением 4  $\text{cm}^{-1}$  при накоплении 128 сканов с последующим усреднением. Каждое измерение производится в трёхкратной повторности.

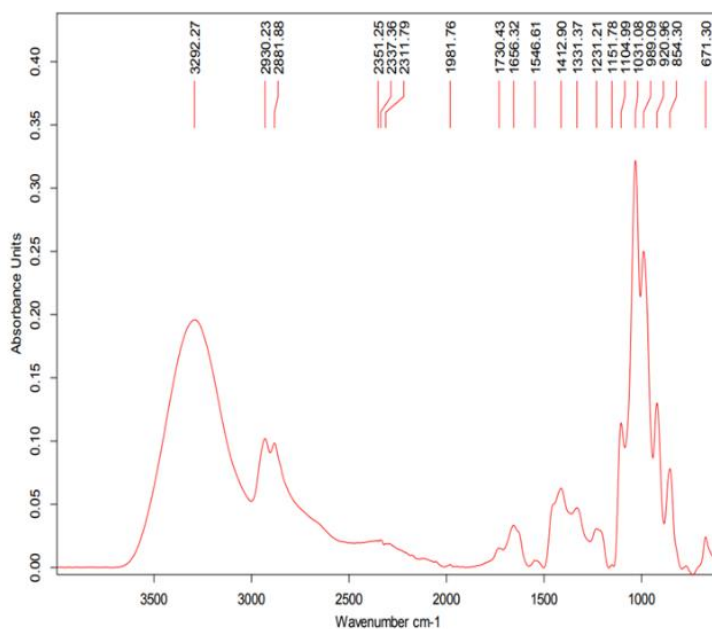


Рис.2. ИК-спектр рамнолипида, полученного при культивировании штамма *Pseudomonas fluorescens*

## 8. Проведение качественной характеристики продукта с помощью ТСХ

Отнесение биосурфактантов к определенной группе (гликолипиды, пептолипиды, липиды) будет проводиться с помощью разделения методом тонкослойной хроматографии и детекции с помощью окрашивания парами йода, растворами нингидрина и анисальдегида.



Рис.3. Комплекс для высокоэффективной тонкослойной хроматографии (CAMAG, Швейцария)

Средства измерений, реактивы и материалы

- Стеклянные стаканы,
- стерильные колбы;
- стерильные фильтры Millipore 0,22 мкм;
- дозатор одноканальные;
- холодильник;
- автоклав;
- весы лабораторные;
- фальконы 50 мл;
- пробирки типа Эппендорф 2 мл;
- центрифуга;
- ультразвуковая ванна;
- дистиллированная вода;
- стеклянных пластинах с силикагелем (G60-UV254, Merck, Германия);
- система тонкослойной хроматографии Camag ATS4 и ADC2 (CAMAG, Швейцария);
- растворители (толуол, этанол, гексан, хлороформ);
- система визуализации GelDoc XR (Bio-Rad, США);
- растворы йода, нингидрина и п-анисальдегида.

Ход работы

Разделение биосурфактантов и примесей в препарате компонентов проводят на стеклянных пластинах с силикагелем (G60-UV254, Merck, Darmstadt, Germany). Раствор биосурфактантов готовят следующим образом: 10 мг очищенного биосурфактанта растворяют в 1.5 мл смеси хлороформа и метанола (1:2) (об/об) под воздействием ультразвука. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор

0,22 мкм. Фильтрат разбавляют смесью метанол-хлороформ в соотношении 1:5 и наносят на пластину с последующей разгонкой. 20 мкл раствора наносят на стеклянные пластинки с неподвижной фазой из силикагеля с добавкой флуоресцентного индикатора Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck Millipore, Germany). Нанесение и элюирование осуществляется в автоматической системе для тонкослойной хроматографии Camag ATS 4 и ADC 2 (CAMAG, Швейцария). В качестве подвижной фазы используется система толуол: метанол: гексан (70:20:10) как наиболее распространённый элюент для разделения биосурфактантов различного происхождения и структуры [10]. После разделения на силикагеле визуализация осуществляется под УФ-лампой. Разделение компонентов продуктов регистрируется в ультрафиолете при  $\lambda=254$  нм, Характерные пятна на фоне люминесценции пластины демонстрируют наличие различных компонентов в смеси. В качестве окрашивающих агентов используют пары йода, 1% раствор нингидрина в абсолютном спирте, 1% раствор п-анизальдегида в смеси серной и уксусной кислот используют для выявления липидных фрагментов, наличия пептидов и остатков углеводов. Данный метод является стандартным протоколом подтверждения ожидаемой структуры биосурфактанта [11].

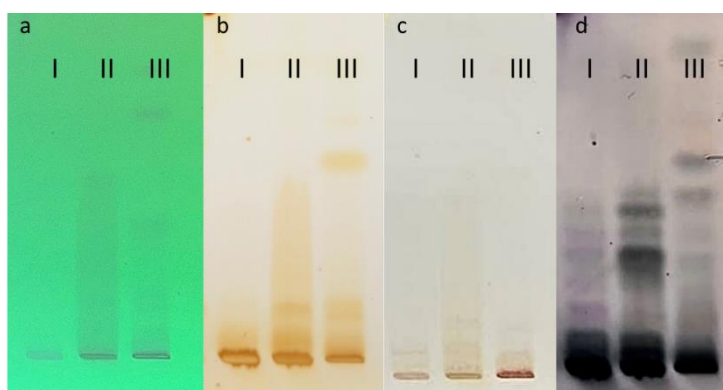


Рис. 4. ТСХ-анализ биосурфактантов, продуцируемых *Bacillus amyloliquefaciens* в ходе динамики роста (образцы I, II, III). Пятна выявляются: в УФ-свете (a); после окраски парами йода (b); после окраски нингидрином (c), после окраски анисовым альдегидом (d).

## 9. Оценка влияния биосурфактантов на фитопатогены растений в чашках

Метаболиты, продуцируемые микроорганизмами, ингибируют рост фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium chlamydosporum*, *Ascochyta pisi*, *Alternaria Alternaria* и проч. Испытания фунгицидного действия биосурфактантов будут проводиться методом подавления радиального роста и продуцирования микотоксинов *in vitro*. Для проверки потенциала, полученного биосурфактанта, осуществляется испытание по воздействию его растворов на споры патогенного гриба.

Средства измерений, реактивы и материалы

- Чашки Петри;
- Колбы стеклянные 250 мл;
- картофельно-декстрозный агар (0,4 % мас./об. экстракта картофеля, 2% мас./об. глюкозы, 1,5 % мас./об. агара);
- губки;
- термостат;
- автоклав;
- горелка;
- раствор биосурфактанта;
- ручной автоматический счетчик клеток Scepter с наконечниками;
- дистиллированная вода;
- холодильник;
- микробиологический бокс;
- марля.

#### Ход работы

В колбу с картофельно-глюкозным агаром добавляют раствор биосурфактанта в концентрациях 100-1000 ppm. Питательный раствор с биосурфактантом разливают в чашки Петри. Изготавливают маленькие губки диаметром 0,5 см и стерилизуют автоклавированием. Губки пропитывают раствором спор гриба (*Fusarium* sp или *Verticillium* sp.) и помещают в центр чашки Петри. В качестве контроля используют чашки Петри с картофельно-глюкозным агаром без добавления биосурфактанта с губками, которые пропитаны раствором спор гриба рода *Fusarium*. На 5 день роста измеряется диаметр роста гриба. Вычисляется процент зарастания поверхности питательного субстрата. Все исследования проводили в трех повторностях.



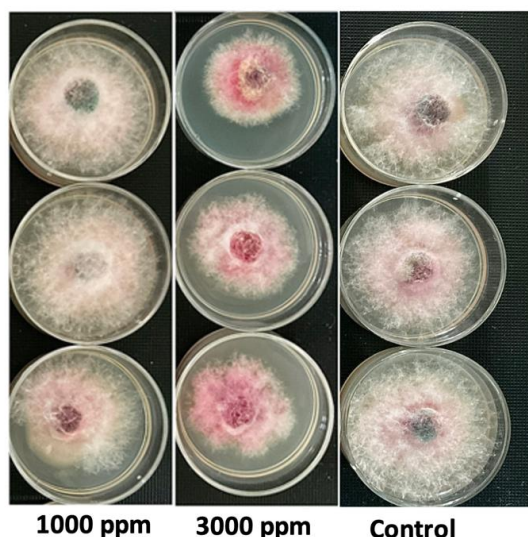


Рис.5. Оценка влияния биосурфактанта, продуцируемого *Bacillus mojavenensis*, на грибы рода *Fusarium graminearum*.

#### 10. Оценка влияния биосурфактантов на фитопатогены растений in vitro

В ходе работы будет проведена оценка влияния биосурфактантов на фитопатогены растений in vitro на листьях и плодах томатов. Для проверки потенциала, полученного биосурфактанта in vivo осуществляется испытание воздействию раствора биосурфактантов на поражённые плоды культурного растения - помидоры Черри (*Solanum lycopersicum var. cerasiforme*).

##### Средства измерений, реактивы и материалы

- Воронки стеклянные лабораторные;
- стеклянные стаканы;
- бумажные фильтры;
- ручной автоматический счетчик клеток Scepter с наконечниками;
- линейки;
- холодильник;
- марля или вата;
- 1,5 мл микропробирки;
- колбы на 100 мл;
- стерильные пробирки;
- стерильный планшет на 96 лунок;
- дозатор 8-ми канальный и стерильные наконечники на 200 мкл;
- автоклав;

- Растения томата *Solanum lycopersicum var. Cerasiforme*;
- Овес посевной (*Avena sativa*);
- весы лабораторные;
- инкубационные сосуды;
- колбы конические объемом 250 мл со шлифом;
- термостат;
- центрифуга;
- дистиллированная вода;
- картофельно-декстрозный агар (0,4 % мас./об. экстракта картофеля, 2 % мас./об. глюкозы, 1,5 % мас./об. агара);
- агар с солодовым экстрактом (солодовый экстракт 2% мас./об., пептон 0,1% масс./об., глюкоза 2% масс./об.);
- мешалка ММ400 (Retsch, Наан, Германия);
- микропланшет Мультикан FC (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

#### Ход работы

Для проверки потенциала, полученного биосурфактанта *in vivo* осуществляется испытание по воздействию его раствора на поражённые плоды культурного растения - помидоры Черри (*Solanum lycopersicum var. cerasiforme*). Для эксперимента отбирают плоды без морфологических признаков инфекционных поражений болезней и видимых механических повреждений, длиной 2–3 см и диаметром 1,0–1,5 см. Поверхность плодов стерилизуют в 75% растворе этанола в течение 30 с, трижды промывают стерильной дистиллированной водой в течение 60 с, а затем сушат в стерильных условиях [12]. На каждый плод помидора стерильной металлической трубкой наносят одинаковые повреждения (диаметр 3 мм и глубина 2 мм). В каждую рану в стерильных условиях вносят по 10 мкл раствора биосурфактанта в концентрациях 0,5, 2,5, 10 и 20 г/л. Через 2 часа наносят по 10 мкл суспензии спор патогенного гриба *F. oxysporum* ( $10^6$  спор/мл). В качестве контроля вместо биосурфактантов вносят 10 мкл стерильной воды. Для каждого варианта используют по шесть томатов (разные концентрации биосурфактанта, отрицательный и положительный контроль). Плоды, относящиеся к одному варианту, хранят вместе в закрытой бумажной коробке при 28 °С в темноте в течение 2 и 7 дней.



Рис. 6. Плоды томата пораженные фитопатогеном (а), пораженные и обработанные биосурфактантом (б), не пораженные фитопатогеном (контроль) (в).

После инкубации заболеваемость оценивается, как описано Khaliq et al. (2015) с небольшими изменениями [13]. В частности, рост грибка на каждом плоде оценивают визуально по шкале от 0 до 5, где 0 = нет признаки гниения, 1 = видны небольшие колонии возбудителя, 2 = колонии возбудителя занимают 30–50 % раны, 3 = колонии возбудителя занимают 50–100 % раны, 4 = диаметр распада незначительно превышает диаметр раны (10–50%), 5 = диаметр распада значительно превышает диаметр раны (>50%). Для расчёта заболеваемости используется следующая формула

$$\text{Disease incidence (\%)} = \frac{\sum_1^5 (\text{DI level}) \times \text{Number of tomato fruit at the DI level}}{\text{Total number of tomato fruit in the treatment} \times \text{The highest score (5)}} \times 100$$

## Список литературы

1. Microbial Biosurfactants and their Environmental and Industrial Applications (1st ed.)/ Banat, I.M., Thavasi, R. (Eds.)// CRC Press. 2018, 380 pp.
2. Sachdev D.P., Cameotra S.S. Biosurfactants in agriculture// *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2013. – V. 97. – №3. – P. 1005-16.
3. Jianjie Niu, Qi Liu, Jing Lv, Bo Peng, Review on microbial enhanced oil recovery: Mechanisms, modeling and field trials//*Journal of Petroleum Science and Engineering.* – 2020. – V. 192. –107350
4. Понаморева О. Н., Нечаева И. А., Мо Л. Т. Методы скрининга биосурфактант-продуцирующих бактерий (мини обзор) //Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2019. – №. 4. – С. 98-111
5. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // *Appl Environ Microbiol.* – 1987. – V. 53. – № 2. – P. 7.
6. Willumsen P.A., Karlson U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers // *Biodegradation.* – 1996. – V. 7. – № 5. – P. 415-423.
7. Jain D.K., Collins-Thompson D.L., Lee H., A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms // *J Microbiol Methods.* – 1991. – V. 13. – № 4. – P. 271-279.
8. Persson A., Molin G. Capacity for biosurfactant production of environmental *Pseudomonas* and *Vibrionaceae* growing on carbohydrates // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 1987. – V. 26. – № 5. – P. 439-442.
9. Javaheri M. et al. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2 // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1985. – V. 50. – №. 3. – P. 698-700
10. Prabha S. P., Karthik C., Chandrika S. H. Phytol—A biosurfactant from the aquatic weed *Hydrilla verticillata* // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* – 2019. – V. 17. – P. 736-742.).
11. Zargar A. N. et al. Isolation and chemical characterization of the biosurfactant produced by *Gordonia* sp. IITR100 // *Plos one.* – 2022. – V. 17. – №. 4. – P. e0264202.
12. Medina-Romero Y. M., Roque-Flores G., Macías-Rubalcava M. L. Volatile organic compounds from endophytic fungi as innovative postharvest control of *Fusarium oxysporum* in cherry tomato fruits // *Applied microbiology and biotechnology.* – 2017. – V. 101. – P. 8209-8222.
13. Khaliq G. et al. Effect of gum arabic coating combined with calcium chloride on physico-chemical and qualitative properties of mango (*Mangifera indica* L.) fruit during low temperature storage // *Scientia Horticulturae.* – 2015. – V. 190. – P. 187-194.