

На правах рукописи

Акимова Елена Евгеньевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БАКТЕРИЙ  
*PSEUDOMONAS* SP. B-6798 НА ФИТОПАТОГЕННЫЕ  
ГРИБЫ И ВЫСШИЕ РАСТЕНИЯ**

03.00.16 – Экология

**А в т о р е ф е р а т**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Томск – 2007

Работа выполнена на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии ГОУ ВПО «Томский государственный университет»

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор

**Евгений Васильевич Евдокимов**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор **Большаков Михаил Алексеевич**, кафедра физиологии человека и животных, ГОУ ВПО «Томский государственный университет»

доктор биологических наук, профессор **Штерншис Маргарита Владимировна**, кафедра биологической защиты растений, ФГОУ ВПО «Новосибирский государственный аграрный университет»

**Ведущая организация:**

Институт биофизики СО РАН

Защита диссертации состоится «2» ноября 2007 г. в 12 час. на заседании диссертационного совета Д 212.267.10 при ГОУ ВПО «Томский государственный университет» по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ГОУ ВПО «Томский государственный университет»

Автореферат разослан «  » октября 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Е.Ю. Просекина

**Актуальность работы.** В последнее время большое внимание уделяется развитию экологических методов борьбы с заболеваниями культурных растений, которые рассматриваются как альтернатива химическим (Сорокина и др., 1999; Штерншис и др., 2000). По сравнению с химическими средствами защиты биопрепараты отличаются экологической безопасностью, избирательностью действия; их применение не нарушает взаимосвязи между элементами агроэкосистемы и не вызывает резистентности у фитопатогенных микроорганизмов. В связи с этим проблема поиска высокоактивных, конкурентоспособных, технологичных штаммов микроорганизмов-антагонистов и разработки на их основе биопрепаратов с широким спектром полезного действия является весьма актуальной (Соколов, 1990; Боронин, 1998; Романовская и др., 2002).

Бактерии *Pseudomonas* sp. В-6798 обладают выраженным ризосферным эффектом, несмотря на то, что были получены с помощью автоселекции и скрининга к повышенным концентрациям формальдегида, который является одним из наиболее токсичных отходов ряда химических производств. Благодаря возможности использования формальдегида в качестве единственного источника углерода и энергии, являющегося одновременно стерилизатором питательной среды, производство биопрепарата на основе бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 по сравнению с известными аналогами будет отличаться высокой технологичностью, уменьшением энергоемкости, соответственно уменьшением загрязнения окружающей среды (например, выбросами углекислого газа в атмосферу) и рядом других положительных аспектов. Однако неясными остаются механизмы взаимоотношения данных бактерий с высшими растениями и их патогенами и поведение интродуцированной популяции, исходно чужеродной почвенной микрофлоры, в ризосфере сельскохозяйственных растений.

**Целью данной работы** являлось изучение взаимодействия формальдегидутилизующих бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 с фитопатогенными грибами и высшими растениями.

В задачи исследования входило:

1. Изучение влияния качественного состава среды на фунгистатические и ростстимулирующие свойства бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798, их культивирования и утилизации формальдегида.
2. Исследование кинетики ингибирования роста фитопатогенных грибов рода *Fusarium* бактериями *Pseudomonas* sp. В-6798 в зависимости от концентрации в среде ионов железа ( $Fe^{3+}$ ).
3. Изучение влияния формальдегидутилизующих бактерий на рост и развитие картофеля в лабораторных и полевых экспериментах и их выживаемость в ризосфере.
4. Изучение взаимоотношений бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 с фитопатогенами картофеля в полевых экспериментах.

5. Сравнительная оценка эффективности применения бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798, с официально рекомендованным к применению биопрепаратом «Планриз» на основе бактерий *Pseudomonas fluorescens* AP-33.

**Научная новизна работы.** Показано, что среда М9 с формальдегидом положительно влияет на фунгистатическую и ростстимулирующую активность исследуемых бактерий, по сравнению с богатыми средами, рекомендуемыми для культивирования бактерий данного семейства. Построена и экспериментально подтверждена математическая модель кинетики ингибирования роста фитопатогенных грибов бактериями *Pseudomonas* sp. В-6798 *in vitro* посредством сидерофорного механизма. Полученные результаты моделирования могут служить основой селекции бактерий-антагонистов, способных более эффективно конкурировать с фитопатогенами за железо при его высоких концентрациях в почве, за счет увеличения активности сидерофорной системы.

В лабораторных и полевых экспериментах выявлена стимуляция роста и развития картофеля под действием бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798. Полезная продуктивность картофеля при бактеризации увеличивается на 10-40 %. Бактеризация клубней бактериями *Pseudomonas* sp. В-6798 позволяет уменьшить развитие ризоктониоза и парши обыкновенной на 40-70 % и фитофтороза в вегетационный период на 45-50 %.

**Практическая значимость.** Проведенные лабораторные и полевые эксперименты позволяют рекомендовать бактерии *Pseudomonas* sp. В-6798 к применению в качестве биопрепарата, повышающего продуктивность картофеля, а также в защите растений против комплекса возбудителей его заболеваний. При выращивании бактерий на среде, содержащей формальдегид, стоимость препарата снижается за счет уменьшения затрат, направленных на достижение стерильности процесса культивирования. При этом биологическая эффективность применения препарата на основе формальдегидутилизирующих бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 на 20-30 % выше аналогового биопрепарата «Планриз».

**Апробация результатов работы.** Результаты работы были представлены на городской конференции молодых ученых и специалистов (Томск, 2003), VII и VIII Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2003, 2004), XLI и XLII Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2003, 2004), Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии (Томск, 2004), III российско-монгольской конференции молодых ученых и студентов (Бийск, 2004), XI молодежной научной конференции Института биологии Коми НЦ УрО РАН «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2004).

**Публикации по теме диссертации.** Всего по теме диссертации было сделано 9 публикаций, из них 2 в изданиях, рецензируемых ВАК.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 134 страницах, содержит 29 рисунков, 5 таблиц. Список литературы включает 223 источника, из них 104 – иностранных источников.

Работа не состоялась бы без идейного вдохновителя – научного руководителя, д.б.н., профессора [Евгения Васильевича Евдокимова] за что ему особая благодарность. Автор выражает глубокую признательность и благодарность А.В. Евдокимову за методическую помощь при культивировании; ст. преп. кафедры с/х биотехнологии Ю.Е. Якимову за методическую помощь в постановке полевых экспериментов и оформлении работы; ст. преп. кафедры с/х биотехнологии О.М. Минаевой за ценные советы, без помощи и поддержки которой работа не была бы закончена; к.б.н., доценту А.В. Куровскому и к. с-х. н., доценту Н.Н.Терещенко за методическую помощь; и.о. зав. кафедры с/х биотехнологии, к.б.н., доценту С.Ю.Семенову за постоянное внимание и большую помощь в работе и обсуждении результатов.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 2. Объекты и методы исследований

Объектом исследования являлись формальдегидрезистентные бактерии *Pseudomonas* sp. ВКПМ В-6798. Штамм получен методами направленной автоселекции и скрининга на устойчивость к формальдегиду из активного ила очистных сооружений Томского нефтехимического комбината (ТНХК) в лаборатории биокинетики и биотехнологии НИИ ББ.

В качестве эталонного контроля для оценки эффективности применения формальдегидрезистентных псевдомонад использовались бактерии *Pseudomonas fluorescens* ВКПМ АР 33, являющиеся активным началом биопрепарата «Планриз». Для оценки антагонистической активности исследуемых бактерий в качестве тест-объекта взят гриб *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*; ростстимулирующей – семена пшеницы сорта Новосибирская-15, клубни картофеля сортов Фреско, Невский, Луговской, Жуковский ранний, колонизирующей способности – семена кукурузы сорта Молдавская-215 АМВ, овса – сорта Нарымский.

Питательные среды и культивирование. Культивирование бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 осуществлялось на минимальной среде М9 (Миллер, 1976) с формальдегидом (4 г/л) путем каскадного пересева культуры. В процессе роста культуры происходило закисление среды до рН=4.5-5.0, поэтому в среду добавлялся аммиак. Контроль численности клеток осуществляли согласно общепринятой методике (Руководство к практическим занятиям по микробиологии, 1995). Бактерии *P. fluorescens* АР-33 (биопрепарат «Планриз») в 2002 г. культивировали на ферментационной установке; в 2004 г. были предоставлены ФГУ «Томская станция защиты растений». Для выращивания фитопатогенных грибов использовался 20 % сусло-агар, крепостью 4-6 ° по Баллингу.

Изучение влияния сред различного состава. В ходе экспериментов семена пшеницы замачивались на 30 мин в суспензии бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 выращенных на различных средах в концентрации  $10^6$ - $10^7$  клеток/мл: минеральной среде М9 с глюкозой, среде М9 с формальдегидом (4 г/л), богатой питательной среде, содержащей пептон, глицерин, свекловичную мелассу и кукурузный экстракт. В качестве контроля использовалась дистиллированная вода. Эксперимент проводился в пяти повторностях, по 100 семян на каждый вариант. Влияние сред на активность бактериальной культуры оценивали с помощью фитопатологического анализа одновременно с замером длины молодого растения.

Изучение кинетики ингибирования бактериями роста фитопатогенных грибов в зависимости от концентрации ионов железа ( $Fe^{3+}$ ) в среде. В питательную среду добавлялось необходимое количество железа ( $Fe^{3+}$ ), на чашки Петри со средой газонм высевались бактериальные суспензии (0.1 мл). После появления видимого бактериального роста для предотвращения физического контакта бактериальных и грибных колоний посеы заливали тонким слоем агаризованной среды. На поверхность помещались агаровые блоки с мицелием гриба диаметром 1 мм равномерно по шаблону. Блоки вырезались из сплошного шестисуточного газона мицелия гриба цилиндрическим пробкорезом. Чашки инкубировались в термостате ( $24 \pm 1.0$  °C). В качестве измеряемого параметра, отражающего рост гриба, использован диаметр колоний. Единым параметром оценки степени антифунгального влияния предложено использование константы ингибирования. Описанным способом без нанесения бактериальной суспензии поставлена серия экспериментов для изучения влияния ионов железа ( $Fe^{3+}$ ) на рост фитопатогенных грибов.

Исследование влияния формальдегидутилизующих псевдомонад на рост и развитие картофеля в лабораторных условиях. В экспериментах была создана экосистема, состоящая из трех звеньев: почвогрунт – растение-хозяин – опытный бактериальный штамм в концентрации  $1 \cdot 10^6$ – $10^7$  клеток/мл. В качестве растения-хозяина – проростки картофеля сорта Луговской длиной 1 см, которые отделялись от клубня, замачивались на 30 мин в суспензии бактерий, в контроле – в воде с минеральными солями. Растения выращивали в фитокамерах при 12-ти часовом освещении и температуре  $22 \pm 1.0$  °C. Спустя 30 дней после посадки, растения повторно проливались бактериальной культурой в указанной концентрации. Эксперимент был проведен в трех повторностях, по 35-40 растений на каждый вариант. С момента появления ростков замерялась высота побега, по окончании эксперимента у каждого растения измерялась сырая вегетационная масса, количество листьев, учитывались количество и масса клубней.

Изучение влияния бактерий *Pseudomonas* sp. штамм В-6798 на рост, развитие и урожайность картофеля в полевых условиях. Полевые эксперименты были заложены в вегетационные периоды 2002, 2004–2005 гг. на клубнях картофеля сортов Невский, Луговской, Жуковский ранний, Фреско. В ходе экспериментов клубни, а затем и растения кар-

тофеля обрабатывали бактериальной суспензией изучаемого штамма из расчета  $1-3 \cdot 10^6$  клеток на клубень или растение. В контроле клубни картофеля обрабатывались водой с минеральными солями. В качестве эталонного контроля использован биопрепарат «Планриз». Растения высаживались из расчета 42 000 клубней/га.

Учет численности бактерий в ризосфере оценивался с помощью метода разведения и высева на плотные питательные среды (Руководство к практическим занятиям по микробиологии, 1995).

Антагонистическую активность бактерий оценивали путем проведения фитопатологических анализов клубней картофеля, полученных от бактеризованных и контрольных растений, в период хранения в соответствии с ГОСТ 11856-89 и ГОСТ 7194-81. В вегетационный период 2005 года был проведен ряд фитопатологических учетов фитофтороза. Определение процента поражения и степени развития заболеваний проводилось по стандартной методике (Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков, 1989).

Статистическая обработка материала. Данные, полученные в ходе экспериментов, обрабатывались с помощью пакета STATISTICA for Windows, версия 6.0. Данные в работе представлены в виде средней арифметической с доверительным интервалом с учетом критерия Стьюдента для 95 % уровня значимости. Оценка достоверности полученных результатов фитоанализа семян проводилась сравнением выборочных долей с учетом критерия Стьюдента для вероятностей 25–75 % включительно, с учетом критерия Фишера для других значений вероятностей. Сравнение данных параметров роста и развития растений в полевых экспериментах проводили по непараметрическому критерию Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Определение скоростей роста грибных колоний на твердой питательной среде проводилось с использованием линейного регрессионного анализа. Параметры уравнений для исследования кинетики ингибирования бактериями роста грибов и параметров роста растений вычислялись с использованием нелинейного регрессионного анализа.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1 Технология культивирования бактерий *Pseudomonas* sp. штамм В-6798 на ферментационной установке

Существует проблема утилизации формальдегида из его водных растворов, например, как побочного продукта ряда технологических процессов. Известен способ аэробной биологической очистки промышленных сточных вод на очистных сооружениях типа аэротенков путем окисления формальдегида микроорганизмами активного ила. Недостатком способа являются низкие (до 1 г/л) предельно допустимые концентрации формальдегида в сточных водах, которые могут быть поданы на очистные сооружения, что ограничивает применимость способа. Учитывая аномально высокую устойчивость бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 к значительным дозам формальдегида (8000 мг/л) целью

экспериментов данного раздела являлось получение большого количества биомассы формальдегидутилизирующих бактерий одновременно с утилизацией формальдегида на ферментационной установке «Bioengineering».

В соответствии с поставленной задачей предлагаемый способ культивирования микроорганизмов осуществляется с помощью реактора объемом 15 л с микробной популяцией в водно-минеральной среде, без соблюдения условий строгой стерильности, аэробным глубинным способом в периодическом режиме в течение трех суток до концентрации  $3-6 \times 10^{11-12}$  и полной утилизации формальдегида. Засев реактора осуществлялся культурой бактерий рода *Pseudomonas* sp. В-6798 объемом 8-10 % от объема ферментера.

Биологическую производительность микробной популяции в среде реактора развивали путем введения плавно увеличивающихся порций водного раствора формальдегида. Для увеличения количества вводимых доз формальдегида на стадии падения рН (до 6.2) под действием ввода новой порции, в среду подавали порцию 25 % водного раствора аммиака в количестве, обеспечивающем увеличение кислотности до 90 % от диапазона его уменьшения. По соотношению периода восстановления содержания кислорода и периода восстановления нейтрального значения рН в среде под воздействием формальдегида и аммиака судят о сохранении дееспособности микробной популяции, что позволяет оптимизировать величину порций формальдегида на наибольшем уровне.

Порционное введение формальдегида в режиме рН-стата позволяет увеличить вводимую порцию формальдегида до 64000 мг/л, при этом максимальная удельная скорость роста бактерий В-6798  $\mu=0.3 \text{ час}^{-1}$ , а концентрация биомассы 3.0-3.5 г АСБ/л соответствует скорости усвоения формальдегида 85 мг в минуту на 1 г АСБ.

Проведенные в лаборатории длительные эксперименты с использованием селективного штамма формальдегидутилизирующих псевдомонад В-6798 показали высокую стабильность штамма. В сравнении с известными способами биологического производства биомассы предлагаемый способ характеризуется простотой и дешевизной технологии и аппаратного обеспечения. Использование этого штамма позволит значительно удешевить процесс производства бакпрепаратов, по сравнению с традиционным, за счет уменьшения энерго- и ресурсозатрат и увеличить эффективность применения в различных областях биотехнологии, в частности для полной утилизации формальдегида из очистных вод промышленных предприятий.

### **3.2 Влияние качественного состава среды на фунгистатические и ростстимулирующие свойства *Pseudomonas* sp. В-6798**

Образование псевдомонадами антибиотиков и сидерофоров в значительной степени зависят от углеродного и минерального питания бактерий (Кравченко и др., 2003; Штарк, 2003; Bellis, Ercolani, 2001; Nielsen et al., 1998).



Для всех вариантов с бактеризацией семян, наблюдается значимое снижение общей зараженности в среднем в 2.4 раза, о чем свидетельствует рисунок 1. Общая зараженность семян включала возбудителей корневых гнилей, альтернариоза, бактериоза и плесневых грибов. Варианты с использованием бактерий выращенных на разных средах отличались друг от друга статистически незначимо.

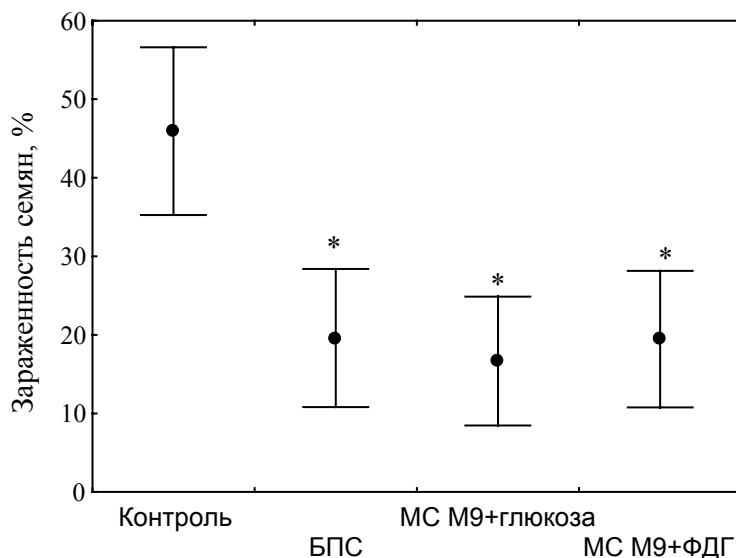


Рисунок 1 – Общая зараженность семян пшеницы сорта Новосибирская-15 возбудителями семенных инфекций в различных вариантах эксперимента

*Примечание.* – Контроль – семена замоченные в воде; БПС – богатая питательная среда для культивирования бактерий; МС М9+глюкоза – минеральная среда с глюкозой; МС М9+ФДГ – минеральная среда с формальдегидом (4 г/л); \* – статистически значимое отличие от контрольного варианта ( $p < 0.05$ ).

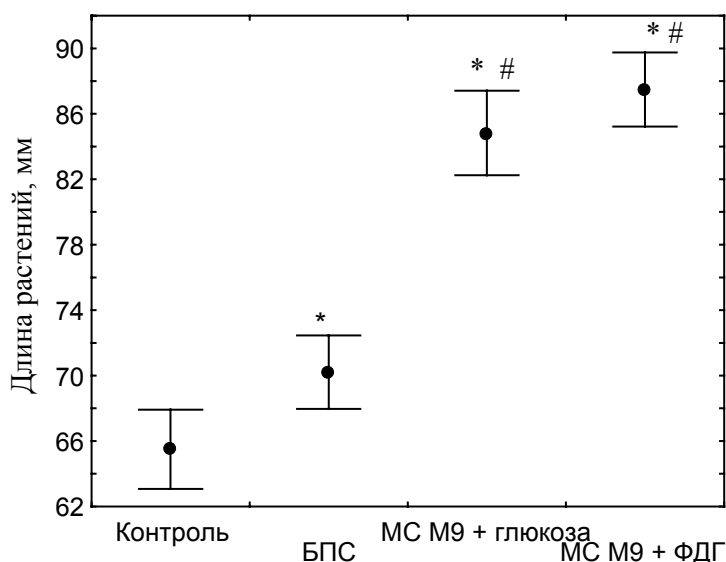


Рисунок 2 – Длина растений пшеницы сорта Новосибирская-15 в зависимости от варианта эксперимента

*Примечание.* –\*– статистически значимое отличие от контрольного варианта; # – статистически значимое отличие от варианта с бактериями, выращенными на БПС ( $p < 0.05$ ).

Во всех вариантах с обработкой семян бактериальной культурой конечная длина молодого растения увеличилась по сравнению с контролем (рисунок 2). Однако наибольшее влияние оказали бактерии, выращенные на минеральной среде М9 с глюкозой и с формальдегидом. Длина растений в этих вариантах статистически значимо отличалась как от контрольного варианта, так и от варианта с бактериями, выращенными на БПС.

### 3.3 Построение математической модели кинетики ингибирования роста фитопатогенных грибов бактериями *Pseudomonas sp. B-6798 in vitro*

#### 3.3.1 Кинетика ингибирования роста фитопатогенных грибов бактериями *Pseudomonas sp. B-6798*

Подавление роста растений фитопатогенными микроорганизмами есть результат их выигрыша в конкуренции с другими видами микроорганизмов микрофлоры почвы. Известно, что железо, является одним из элементов питания, за который конкурируют микроорганизмы (Neilands, 1957; Шавловский, Логвиненко, 1988). В этой ситуации выигрывают те виды, которые более эффективно усваивают железо и делают его недоступным для конкурентов. Предварительные эксперименты (Минаева, 2007) показали, что бактерии *Pseudomonas sp. B-6798* обладают преимуществом перед фитопатогенами. Из литературы известно, что в основе этого лежит способность флуоресцирующих псевдомонад к повышенной продукции сидерофорных соединений (Боронин, 1998; Штерншис и др., 2000). Исследование антагонизма бактерий может также оказаться полезным для решения проблем их экологии и систематики, а также для использования в качестве средства биологической борьбы с вредителями сельскохозяйственных растений (Соколов, 1990).

В работе О.М. Минаевой (2007) показано, что зависимость скорости роста колоний грибов на питательных средах с различными концентрациями бактерий подчиняется модифицированному уравнению Н.Д. Иерусалимского (Евдокимов, 2001):

$$V(C) = V_{\infty} + V_{\max} \frac{K_i^{\alpha}}{K_i^{\alpha} + C^{\alpha}}; \quad [1]$$

где  $V(C)$  – скорость увеличения диаметра колоний фитопатогенных грибов (мм/ч);  $V_{\infty}$  – остаточная скорость роста гриба при “бесконечной” концентрации бактерий (мм/ч);  $V_{\max}$  – кинетический параметр, отражающий скорость роста грибов в отсутствии бактерий и в сумме с  $V_{\infty}$ , численно равный максимальной скорости роста данного гриба (мм/ч);  $K_i$  – константа ингибирования, численно равная концентрации бактерий, при которой достигается половина от максимального эффекта ингибирования (клеток/мл);  $\alpha$  – коэффициент нелинейности ингибирования;  $C$  – концентрация клеток бактерий в инокулюме (клеток/мл).

Количественным показателем описанной модели при унифицированной методике постановки эксперимента предложено использование константы ингибирования ( $K_i$ ), которая отражает степень влияния бактерий на скорость роста гриба: чем она выше, тем ниже антифунгальный эффект, и наоборот. Например,  $K_i$  для *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini*

и *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* составила порядка  $10^3$  клеток/мл, для *Fusarium oxysporum* f.sp. –  $10^2$  клеток/мл.

Нами была предложена и апробирована методика, позволяющая численно оценить эффект подавления роста грибных колоний на плотных питательных средах в чашках Петри. В ходе экспериментов каждые 24 часа проводили измерение диаметра грибных колоний, образующихся на агаризованных питательных средах с различными концентрациями железа и бактерий в концентрации  $10^6$ - $10^7$  клеток/мл в инокулюме. На рисунке 3 представлена зависимость ингибирования скоростей роста диаметра гриба *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* бактериями *Pseudomonas* sp. В-6798 от различных концентраций ионов железа  $Fe^{3+}$  в питательной среде.

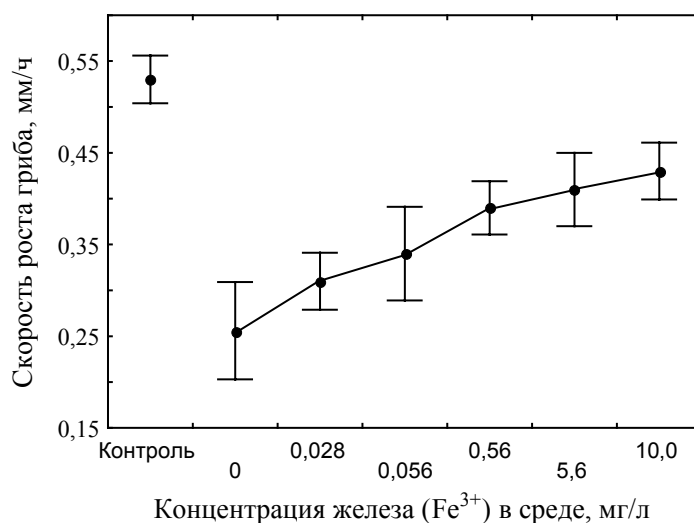


Рисунок 3 – Кинетика ингибирования скорости роста *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* бактериями *Pseudomonas* sp. В-6798 при различных концентрациях ионов железа ( $Fe^{3+}$ ) в среде

*Примечание.* – Контроль – рост гриба на стандартной среде (10 мг/л  $Fe^{3+}$ ) без бактерий; 0 – рост гриба с бактериями *Pseudomonas* sp. В-6798 на среде без внесения ионов железа; 0,028, 0,056, 0,56, 5,6, 10,0 – рост гриба с бактериями *Pseudomonas* sp. В-6798 при заданных концентрациях железа (мг/л  $Fe^{3+}$ ) в среде.

С ростом концентрации ионов железа ( $Fe^{3+}$ ) в среде, степень ингибирования скорости роста *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* бактериями *Pseudomonas* sp. В-6798 снижается, как продемонстрировано на рисунке 3: добавление в среду ионов железа даже в концентрации 0,028 мг/л частично снимает ингибирование роста грибных колоний, что связано со снижением конкуренции за этот элемент сидерофор бактерий с сидерофорами фитопатогенного гриба. Следует отметить, что добавление ионов железа  $Fe^{3+}$  не полностью снимает фунгистатический эффект оказываемый бактериями В-6798 на развитие фитопатогена даже в концентрации 10 мг/л, что может быть связано со способностью исследуемого штамма продуцировать отличные от сидерофор антибиотические вещества.

### 3.3.2 Влияние ионов железа ( $Fe^{3+}$ ) в среде на рост фитопатогенных грибов

Зависимость скорости роста грибных колоний можно описать с помощью классического уравнения Моно. Скорость роста грибных колоний при отсутствии добавленного

железа в среде очень низка, но не равна нулю. Поэтому, введем в уравнение дополнительный член  $\mu_0$ :

$$\mu = \mu_0 + \mu_m \cdot \frac{S}{Ks + S}, \quad [2]$$

где  $\mu_0$  – удельная скорость роста гифов при отсутствии ионов железа в среде;  $\mu_m$  – максимальная удельная скорость роста гифов;  $S$  – концентрация субстрата;  $Ks$  – константа насыщения.

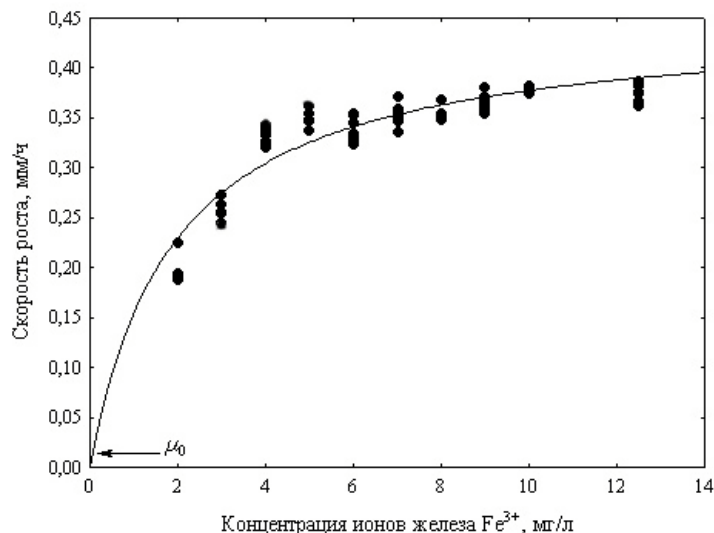


Рисунок 4 – Зависимость скорости роста диаметра гриба *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* от концентрации железа ( $Fe^{3+}$ ) в питательной среде

*Примечание.* – В виде точек отображены практически полученные данные, в виде линии – теоретически рассчитанная кривая.

С помощью метода нелинейного регрессионного анализа нами были рассчитаны коэффициенты для зависимости скоростей роста диаметра колоний гриба *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* от концентрации железа ( $Fe^{3+}$ ) в питательной среде (рисунок 4). В описанной модели  $\mu_m$  составляла 0,45 мм/ч,  $Ks$  находилась на уровне 1,95, а  $\mu_0$  не превышала 0,005 мм/ч.

Таким образом, описанная нами модель является классической и универсальной для описания зависимости удельной скорости размножения от концентрации лимитирующего субстрата.

### 3.3.3 Математическая модель кинетики ингибирования бактерий рода *Pseudomonas* sp. В-6798 при сидерофорном механизме

Для максимально эффективного использования популяции микробов-антагонистов в борьбе с фитопатогенами необходимо математическое описание кинетики конкурентного взаимодействия популяций (Печуркин, 1978). Биологический аспект применения микроорганизмов в защите растений основан на популяционных взаимодействиях конкурирующих видов с фитопатогенами. При этом популяции антагонистических видов либо интродуцируются, либо активизируется деятельность уже существующих антагонистов.

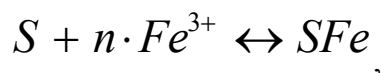
Методы эти популяционные, и для успешного их развития необходимо знать кинетические характеристики используемых природных популяций.

Известно, что бактерии при росте в условиях недоступности ионов железа способны образовывать сидерофоры (Соколов, 1990; Боронин, 1998). Для удобства обозначим количество выделяемых молекул сидерофор через  $S$ . Концентрация молекул сидерофор, выделяемых в питательную среду, пропорциональна титру бактерий. Следовательно, исходную концентрацию молекул сидерофор в культуре бактериальных клеток можно принять за  $[S]$  (Варфоломеев, Гуревич, 1999):

$$[S] = C \cdot k, \quad [3]$$

где  $C$  – титр клеток псевдомонад, клеток/л;  $k$  – удельная продуктивность синтеза сидерофор клетками, моль/клеток.

Как известно из литературных данных, связывание ионов 3-х валентного железа из питательной среды молекулами сидерофор как продуктов метаболизма при нейтральных рН происходит в реакциях комплексообразования (Neilands, 1957; Gill, Warren, 1988; Alexander, Zuberer, 1993):



к которым применимо классическое уравнение равновесия (Варфоломеев, Гуревич, 1999):

$$K = \frac{[SFe]}{[Fe^{3+}]^n \cdot [S]}, \quad [4]$$

где  $K$  – константа равновесия,  $[ ]$  – концентрация вещества.

Из уравнения 4. выразим концентрацию свободных ионов железа  $Fe^{3+}$  в среде с сидерофор-образующими бактериальными клетками:

$$[Fe^{3+}] = \frac{[SFe]^{\frac{1}{n}}}{[K]^{\frac{1}{n}} \cdot [S]^{\frac{1}{n}}}, \quad [5]$$

где  $n$  – целое число, стехиометрический коэффициент.

Используя уравнение [2] и заменив  $[Fe^{3+}]$  из выражения [5] преобразуем его к следующему виду:

$$\mu([Fe^{3+}]) = \mu_0 + \mu_m \cdot \frac{1}{\frac{K_{Fe} \cdot [K]^{\frac{1}{n}} \cdot [S]^{\frac{1}{n}}}{[SFe]^{\frac{1}{n}}} + 1}; \quad [6]$$

где  $K_{Fe}$  – константа насыщения.

Обозначим  $\frac{1}{n}$  как  $\alpha$  (коэффициент нелинейности), и  $\frac{K_{Fe} \cdot [K]^{\frac{1}{n}}}{[SFe]^{\frac{1}{n}}}$  как  $\frac{1}{k^\alpha \cdot K_i^\alpha}$ , а также поделим числитель и знаменатель в дроби в выражении [6] на  $\frac{1}{k^\alpha \cdot K_i^\alpha}$ . В результате получаем:

$$\mu([S]) = \mu_0 + \mu_m \cdot \frac{k^\alpha K_i^\alpha}{k^\alpha K_i^\alpha + [S]^\alpha} \quad [7]$$

Заменив  $[S]$  в соответствии с [3] на  $C \cdot k$  и разделив числитель и знаменатель дроби в выражении [7] на  $k^\alpha$  получаем искомую формулу, описывающую зависимость удельной скорости роста гифов  $\mu$  от концентрации клеток ризобактерий  $[C]$ :

$$\mu([S]) = \mu_0 + \mu_m \cdot \frac{K_i^\alpha}{K_i^\alpha + [C]^\alpha} \quad [8]$$

Из этого следует, что выражение [8] полностью совпадает с модифицированным уравнением Иерусалимского [1], при этом

$$K_i = \frac{[SFe]}{k \cdot K_{Fe}^n \cdot K}$$

Получив методом регрессионного анализа среднее значение  $\alpha$ , можно узнать  $n$ , а именно, сколько ионов железа участвует в сидерофорном транспорте одной бактериальной клетки. В работе О.М. Минаевой (2007) показано, что  $\alpha$  (коэффициент нелинейности ингибирования) грибов рода *Fusarium* и *Bipolaris* бактериями *Pseudomonas* sp. В-6798 в среднем равен  $0.19 \pm 0.02$ , следовательно  $n \approx 5$ , то есть столько ионов железа связываются сидерофорной системой одной бактериальной клетки *Pseudomonas* sp. В-6798.

Антагонизм псевдомонад в отношении фитопатогенов, обусловленный конкуренцией за железо, эффективен только при низком содержании железа в почве (Боронин, 1998; Соколов, 1990). При высоких концентрациях железа в почве возможно два пути повышения эффективности применяемых бактерий. Первый основан на увеличении плотности популяции агента, что практически реализовать достаточно сложно, второй – на применении агентов, имеющих более высокую активность сидерофорной системы транспорта. Предложенная математическая модель кинетики сидерофорного механизма ингибирования позволяет численно оценить этот параметр по экспериментально полученному коэффициенту нелинейности ингибирования. На основании этого возможна целенаправленная селекция бактерий-антагонистов по активности сидерофорной системы.

### 3.4 Влияние формальдегидутилизирующих бактерий штамм В-6798 на рост и развитие картофеля

#### 3.4.1 Влияние бактерий В-6798 на рост и развитие картофеля в лабораторных условиях

Из литературы известно о положительном влиянии на рост, развитие и урожайность сельскохозяйственных растений при внесении ризосферных бактерий рода *Pseudomonas*. Установлено, что бактерии *Pseudomonas* sp. В-6798 эффективно влияют на рост и развитие овса, пшеницы, кукурузы, как в лабораторных, так и полевых условиях (Минаева, 2007), но неизвестно влияние данного штамма бактерий на параметры развития и урожайность картофеля.

В ходе обработки данных установлено, что рост картофеля, соответствовал S-образной кривой. Для описания данной кривой было использовано логистическое уравнение следующего вида (Ризниченко, Рубин, 1993):

$$y(t) = \frac{Ae^{rt}}{B + x_0e^{rt}}; \quad [9]$$

где  $y$  соответствует длине проростка с течением времени (мм);  $t$  – время (сут.);  $r$  – скорость удлинения проростка (мм/сут.);  $x_0$  – «минимальная» длина проростка, соответствующая длине проростка после активации семени в течение 24 часов (мм);  $A$  – константа уравнения, численно соответствующая произведению минимальной длины проростка на максимально возможную в условиях эксперимента (мм)  $A=x_0x_{\max}$ ;  $B$  – константа уравнения, численно соответствующая вычитанию минимальной длины проростка из максимальной (мм),  $B= x_{\max} - x_0$ .

В ходе эксперимента установлено, что обработка растений бактериальной культурой положительно повлияла как на кинетические параметры роста растений: удельная скорость роста растений ( $r$ ) статистически значимо увеличилась по сравнению с необработанными растениями, конечная длина растения ( $x_{\max}$ ) в варианте с обработкой бактериями увеличилась в 1.3 раза; так и на все параметры развития растения: увеличилась конечная длина растений, масса растений, количество листьев, количество и масса клубней. Количество растений, обработанных бактериями, находящихся в фазе клубнеобразования, было выше в 2 раза, по сравнению с контрольным вариантом. Масса клубней, собранных в вариантах с обработкой растений бактериями В-6798 по сравнению с необработанными, увеличилась в 3.6 раза.

### 3.4.2 Влияние формальдегидутилизирующих бактерий штамм В-6798 на рост и развитие картофеля в полевых условиях

#### 3.4.2.1. Влияние бактерий на рост картофеля в полевых условиях

Рост растений картофеля в полевых условиях в зависимости от сезона описывался в 2002 и 2004 гг. логистической, в 2005 экспоненциальной кривыми, что может быть связано с разными почвенно-климатическими условиями в период роста растений в течение вегетационных экспериментах. Культура бактерий для эксперимента *Pseudomonas* sp. В-6798 и *P. fluorescens* AP-33 были выращены на ферментационной установке «Bioengineering». В ходе эксперимента в течение месяца от всходов растений измерялась длина максимального побега в каждом кусте во всех вариантах. Также в эксперименте учитывалось количество стеблей в кусте, интенсивность цветения растений.

Для описания начального участка кривой логистического роста растений было использовано экспоненциальное уравнение следующего вида (Ризниченко, Рубин, 1993):

$$x = x_0 e^{rt}; \quad [10]$$

где  $L$  – длина вегетативной части растения через время ( $t$ ) (мм);  $x_0$  – первоначальная (исходная) длина проростка, при  $t=0$  (мм);  $r$  – скорость удлинения растения (мм/час);  $t$  – время (час).

В ходе экспериментов установлено, что обработка клубней и растений бактериальными препаратами в целом положительно повлияла на все параметры развития растений: отмечена тенденция, а в 2002 г. статистически значимое увеличение конечной длины растений  $x_{\max}$  в вариантах с применением бактериальных препаратов, увеличилось количество стеблей в кусте; цветение в вариантах с обработкой начиналось раньше и было более обильное, чем в контроле.

Известно (Мишустин, 1972; Боронин, 1998), что стимулирующее влияние на рост и развитие вегетативной массы основано на том, что бактерии рода *Pseudomonas* способны к синтезу различных регуляторов роста (ИУК, гиббереллины), витаминов. По данным Ю.А. Гущиной и И.Ф. Головацкой (2001) бактерии штамма В-6798 способны секретировать в среду вещества ауксиновой природы, и, в частности, ИУК в количестве 0.8 мкг/мл.

Бактерии опытного штамма на протяжении полевых экспериментов 2002 и 2004 гг. оказывали на рост и развитие растений больший положительный эффект, чем зарегистрированный и применяемый в России биопрепарат «Планриз».

#### 3.4.2.4 Влияние бактериализации на урожайность картофеля

Для изучения влияния бактерий штамма В-6798 на полезную продуктивность картофеля в вегетационных экспериментах после выкопки учитывалась масса (г/куст) и количество клубней в лунке, фракционный состав.



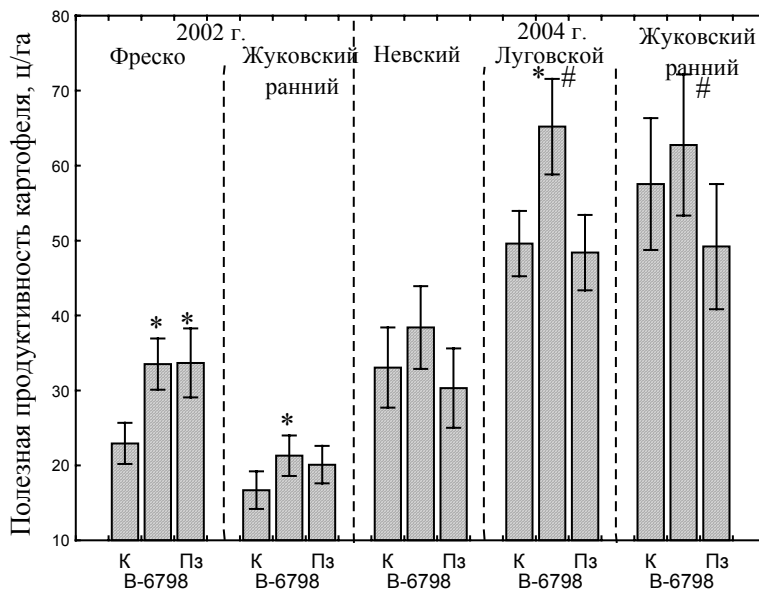


Рисунок 5 –Полезная продуктивность картофеля в полевых экспериментах 2002 и 2004 гг.

*Примечание.* – К – контроль; В-6798 – вариант с применением бактерий штамма В-6798; Пз – вариант с применением биопрепарата Планриз; \* – статистически достоверное отличие от контроля, # – статистически достоверное отличие от Планриза ( $p < 0.05$ ).

В 2002 г. полезная продуктивность от применения штамма В-6798 увеличилась в среднем на 26-31 % в зависимости от сорта (рисунок 5); от применения биопрепарата «Планриз» на 22-32 %; наблюдается тенденция к увеличению количества клубней в лунке от бактериализации. В 2004 г. полезная продуктивность растений в варианте с использованием бактерий В-6798 сорта Луговской увеличилась на 30-32 %, сорта Невский на 13-15 %, сорта Жуковский ранний на 8-10 % по сравнению с контрольным вариантом, в то время как в варианте с применением биопрепарата Планриз она снизилась на всех сортах даже по сравнению с контролем. На растениях сорта Жуковский и Луговской отмечена тенденция к увеличению количества клубней в лунке в вариантах с обработкой растений бактериями штамма В-6798.

Известно, что стимулирование роста картофеля флуоресцирующими псевдомонадами эффективно только при коротком севообороте (1:1) и только для семенного картофеля (Ваккер и др., 1986; Geels и др., 1986). Поэтому, в полевом эксперименте 2005 г. дважды за вегетацию проводился учет формирования урожая. Отмечено, что именно на ранних этапах развития растений эффективность применения бактерий В-6798 выше: на картофеле сорта Невский значительно увеличилась масса клубней (в 2.2 раза), сорта Луговской в 2.5 раза, а количество клубней с лунки увеличилось в 2.8 раза по сравнению с контролем, в дальнейшем отмеченное отличие сглаживается.

Таким образом, показано, что биологические препараты оказывают положительное влияние на урожайность клубней, но, в итоге, эффективность применения зависит от сорта, почвы, севооборота и погодных условий.

### 3.4.3 Выживаемость бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 в ризосфере сельскохозяйственных растений

Успешная колонизация корней растений и дальнейшая способность бактерий поддерживать численность в зоне ризосферы на достаточно высоком уровне являются обязательными свойствами, предъявляемыми к штаммам-интродуцентам (Боронин, 1998; Benizgi et al., 2001). Только при наличии данных условий бактерии способны проявлять весь комплекс положительных эффектов на рост и развитие растений.

В наших экспериментах установлено, что бактерии *Pseudomonas* sp. В-6798 в ризосфере кукурузы, овса, пшеницы и картофеля способны не только выживать, но и успешно размножаться, значительно увеличивая свою численность, как в лабораторных, так и полевых экспериментах. Следует отметить, что период наибольшего увеличения численности бактерий в прикорневой зоне совпадает с периодом активного роста проростков.

Динамика численности интродуцированного штамма в целом соответствует общему изменению количества бактериальной флоры в ризосфере кукурузы (рисунок 6). Максимальное количество бактерий в зоне ризосферы кукурузы наблюдалось приблизительно на 70 сутки с момента постановки экспериментов, соответствующие периоду цветения–образования початков, после чего наблюдается некоторое снижение общей бактериальной численности.

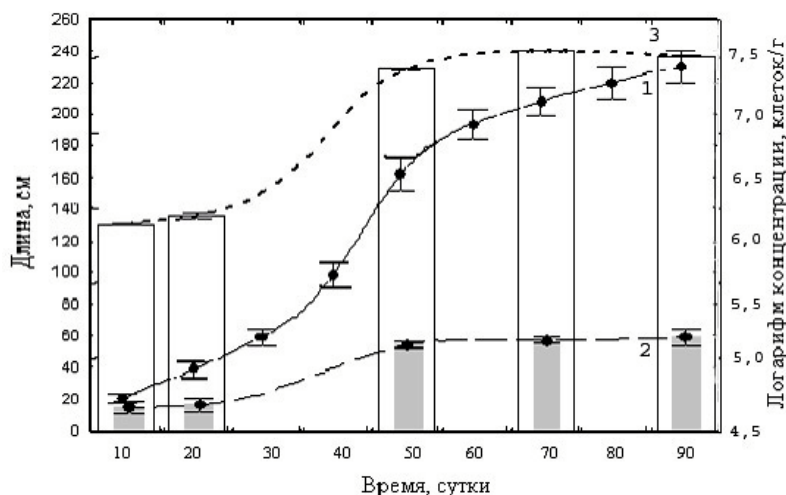


Рисунок 6 – Рост кукурузы и динамика численности бактериальной флоры в зоне ризосферы в полевых экспериментах

Примечание. – 1 – длина кукурузы; 2 – общая численность бактерий; 3 – численность бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798.

Для эффективной работы биопрепарата необходимо поддерживать в ризоплане минимальную концентрацию бактериальных клеток ( $\geq 10^4$  бактерий/см корня); этот порог зависит также от вида растения, его возраста (Соколов, 1990). В наших экспериментах численность бактерий-интродуцентов устанавливалась на уровне свыше  $1 \cdot 10^4$  КОЕ/г почвы, примыкающей к растительному корню уже на 20 сутки эксперимента для всех исследованных видов растений (кукуруза, пшеница, овес), после чего численность бак-

терий в зоне ризосферы до окончания цветения нарастала. После окончания вегетации бактерии полностью вытеснялись из бактериальной флоры почвы, сохраняя экологическое равновесие и не вызывая бактериального загрязнения почв. Однако периода их наличия в ризосфере растений достаточно для оказания значительного ростостимулирующего эффекта (длина бактеризованных растений кукурузы в 1.6 раз превышала длину контрольных, пшеницы и овса – в 1.4 и 1.5 раза соответственно).

Таким образом, бактерии *Pseudomonas* sp. В-6798 способны поддерживать численность на достаточно высоком уровне в ризосфере сельскохозяйственных культур в вегетационный период в лабораторных и полевых условиях, используя в качестве источников углерода и энергии корневые выделения растений.

### 3.4.3 Влияние формальдегидутилизирующих псевдомонад на зараженность картофеля возбудителями листовых инфекций в вегетационный период

Как известно из литературных источников, растение, находящееся в благоприятных условиях, при сбалансированном поступлении питательных веществ формирует иммунитет, способный противостоять внедрению патогенов и развитию заболевания. Поэтому проведение учета пораженности растений фитофторозом в вегетационный период косвенным образом отражает их способность противостоять поражению фитопатогенными грибами и свидетельствует об уровне их иммунитета (Павлюшин и др., 2002).

Распространенность болезни отражает количество больных растений или отдельных органов, выраженное в процентах от общего числа обследованных растений на участке, в поле:

$$P = \frac{n \times 100}{N} ; \quad [11]$$

где  $P$  – распространенность болезней, %;  $n$  – число больных растений (клубней) в пробе, шт.;  $N$  – общее число растений (клубней) в пробе, шт.

Степень развития болезни или интенсивность поражения служит качественным показателем болезни и рассчитывается по формуле:

$$R = \frac{\sum(a \times b)}{N} ; \quad [12]$$

где  $R$  – степень развития болезни, %;  $\sum(a \times b)$  – сумма произведений числа больных растений (клубней) ( $a$ ) на соответствующий процент поражения ( $b$ );  $N$  – общее число растений (клубней) в пробе.

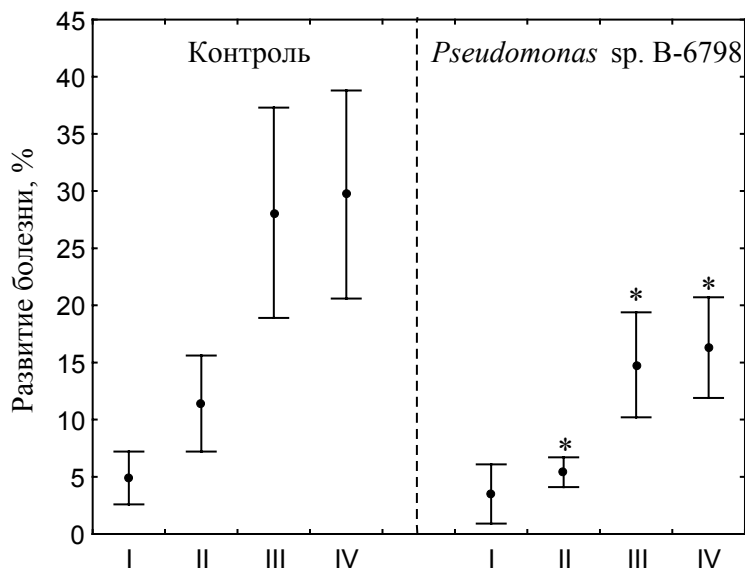


Рисунок 7 – Развитие фитофтороза на посадках картофеля сорта Невский в полевом эксперименте 2005 г.

Примечание. – I, II, III, IV – фазы замеров. \* – достоверное отличие от контрольного варианта ( $p < 0,05$ ).

Представленный рисунок демонстрирует, что с момента проявления на посадках картофеля фитофтороза на опытном участке болезнь получила значительно меньшее распространение. К окончанию вегетации развитие фитофтороза на опытных участках на 45-50 % ниже, чем на участках контроля. Процент пораженных растений при этом в контроле и опыте достигал 100. В связи с чем, уменьшение развития фитофтороза можно связать только со снижением интенсивности поражения.

Как известно, урожай, а также интенсивность развития заболеваний клубней при хранении находятся в прямой зависимости от степени проявления болезней картофеля в период вегетации. Приемы, снижающие развитие фитофтороза в вегетационный период позволяют получить большее число здоровых клубней с минимальным предрасположением к заражению гнилями и развитию их в период хранения.

#### 3.4.4 Влияние бактерий *Pseudomonas sp.* штамм B-6798 на устойчивость клубней картофеля к заболеваниям при хранении

Микробные сообщества, формирующиеся на поверхности корня растения и в прикорневой зоне почвы, оказывают существенное влияние на рост и развитие растений. Так, значительная численность фитопатогенных микроорганизмов в прикорневой зоне создает повышенный риск заболевания, а усиленная конкуренция непатогенных популяций, напротив, снижает этот риск. При биоконтроле происходит не полное уничтожение нежелательного микроорганизма, а ограничение его доминирования, безудержного размножения, приводящего к уничтожению растения-хозяина.

Таким образом, цель экспериментов данного раздела – оценить фунгистатический эффект формальдегидутилизирующих псевдомонад на клубнях картофеля нового урожая

в период хранения. Для этого картофель во всех экспериментах после выкопки закладывался на зимнее хранение.

Для определения степени пораженности клубней картофеля использовалась балльная шкала (Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков, 1989). Распространенность болезни в партии клубней рассчитывается по формуле [11], степень развития болезней на клубнях по формуле [12]. Данные о развитии болезней на клубнях картофеля представлены на рисунке 8.

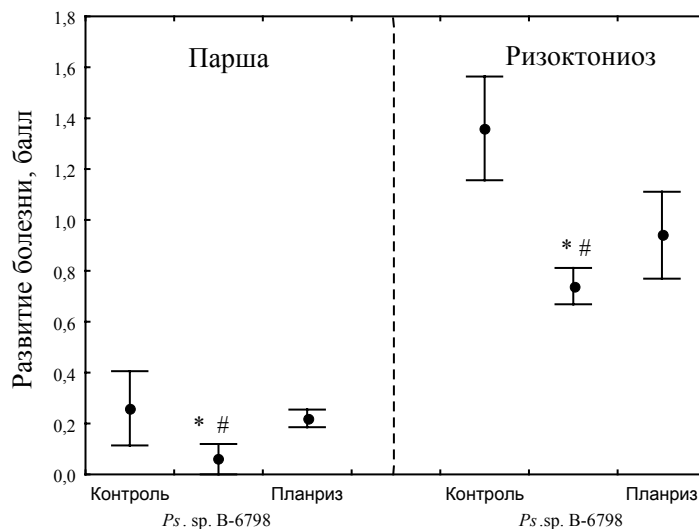


Рисунок 8 – Развитие заболеваний на клубнях картофеля на примере сорта Жуковский ранний 2002 г.

*Примечание.* – \* – статистически достоверное отличие от контрольного варианта, # – статистически достоверное отличие от варианта с бактеризацией планризом ( $p < 0.05$ ).

Следует отметить, что обработка клубней и растений в вегетационный период бактериями штамма В-6798 позволило значительно снизить развитие заболеваний образовавшихся клубней. На приведенном рисунке в опытном варианте показано статистически значимое снижение развития парши обыкновенной (в 2 раза) и ризоктониоза (в 4 раза) по сравнению с контролем. В среднем снижение развития парши и ризоктониоза при бактеризации опытным штаммом псевдомонад составило 40-50 % и 50-75 % соответственно. На снижении развития заболеваний главным образом оказало влияние снижение интенсивности поражения, в меньшей степени – уменьшение количества больных клубней.

Меньшее влияние на снижение развития заболеваний оказала бактеризация клубней планризом: в среднем снижение достигало 30-40 %. В некоторых случаях уменьшение развития заболеваний не отмечено и даже превысило контрольные показатели. Таким образом в наших экспериментах наблюдался нестабильный эффект от применения био-препарата «Планриз»: препарат или не снижал развитие заболеваний, или снижал, но менее эффективно по сравнению со штаммом В-6798.

Известно, что предпосадочная обработка посевных клубней и последующее опрыскивание растений в ходе вегетации препаратами способствует снижению популяцион-

ной плотности на клубнях нового урожая возбудителей заболеваний как за счет снижения плотности популяции фитопатогенов в почве, так и за счет увеличения резистентности растений к данным возбудителям. Отмечено, что применение биопрепаратов, как правило, способствует улучшению фитосанитарного состояния клубней нового урожая (Куликов и др., 2006).

### Выводы

1. Установлено влияние качественного состава питательной среды на фунгистатические и ростстимулирующие свойства бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798: наибольший положительный эффект отмечен при культивировании бактерий на минеральной среде М 9 с глюкозой и минеральной среде М 9 с формальдегидом в качестве единственного источника углерода и энергии.
2. Построена математическая модель кинетики ингибирования грибов бактериями *Pseudomonas* sp. В-6798 посредством сидерофорного механизма, на основании которой возможна количественная оценка активности сидерофорной системы бактериальной клетки, что дает основание для целенаправленной селекции штаммов бактерий-антагонистов по увеличению способности связывания ионов железа ( $Fe^{3+}$ ).
3. Отмечено положительное влияние формальдегидутилизирующих псевдомонад на рост и продуктивность растений картофеля, при этом полезная продуктивность увеличивается как в лабораторных (в 2.5-3 раза), так и полевых условиях (на 10-40 % в зависимости от сорта).
4. Бактеризация клубней и растений *Pseudomonas* sp. В-6798 положительно сказывается на снижении развития заболеваний картофеля: фитофтороза в вегетационный период на 45-50 %, ризоктониоза и парши обыкновенной в период хранения на 40-70 %.
5. Показано, что бактерии *Pseudomonas* sp. В-6798 при интродукции в ризосферу пшеницы, овса, кукурузы, картофеля способны выживать и сохранять свою численность на уровне, достаточном для оказания значительного положительного эффекта (не менее  $10^4$  клеток/г почвы).
6. В полевых экспериментах показано, что биологическая эффективность бактерий *Pseudomonas* sp. В-6798 на 20-30 % выше эффективности бактерий официально рекомендованного к применению биопрепарата «Планриз».

### Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Акимова Е.Е. Использование искусственных экосистем в качестве моделей для изучения и реализации устойчивого развития в агрофитоценозах / Минаева О.М., Акимова Е.Е. // Вестник ТГУ. Приложение. Материалы международных, всероссийских и региональных научных конференций, симпозиумов, школ, проводимых в ТГУ. – 2005. – № 13. – С. 107–109.

2. Акимова Е.Е. Использование малых моделей искусственных экосистем для изучения взаимодействия ризобактерий с растением-хозяином и микроскопическими почвенными грибами / Минаева О.М., Акимова Е.Е. // Исследовано в России. – Электрон. журнал. – 2006. – № 062. – С. 617–623.
3. Акимова Е.Е. Бактерии *Pseudomonas* sp. В-6798 как антагонисты роста фитопатогенных грибов и стимуляторы роста растений / Минаева О.М., Акимова Е.Е., Гущина Ю.А., Евдокимов Е.В. // Проблемы экологической безопасности и природопользования в Западной Сибири. Труды ТГУ, серия биологическая. – Т. 266 – Томск: 2004. – С. 55–59.
4. Акимова Е.Е. Влияние ризосферных псевдомонад на урожайность сельскохозяйственных культур // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии. Сборник научных работ. – Т. 3. – № 3. – Томск: 2004. – С. 400-401. СГМУ.
5. Акимова Е.Е. Формальдегидутилизирующие псевдомонады, способствующие росту и развитию растений // Материалы XLII Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Молекулярный дизайн и экологически безопасные технологии. – Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т., 2004. – 52 с. – С. 13–14.
6. Акимова Е.Е. Действие формальдегидутилизирующих псевдомонад // Биология – наука XXI века: VIII Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. – Пущино: Авторская редакция, 2004. – С. 348–348.
7. Акимова Е.Е. Действие формальдегидутилизирующих псевдомонад на урожайность картофеля // Алтай: экология и природопользование: Материалы III российско-монгольской конференции молодых ученых и студентов. – Бийск: НИЦ БПГУ им. В.М.Шукшина, 2004. – 431 – с. 282-285.
8. Акимова Е.Е. Использование формальдегидутилизирующих псевдомонад для защиты картофеля от фитопатогенных микроорганизмов // Материалы докладов XV Коми республиканской молодежной научной конференции (в 2-х томах), Т. 2: XI молодежная научная конференция Института биологии Коми НЦ УрО РАН «Актуальные проблемы биологии и экологии». – Сыктывкар: 2004. – 357 с. – С. 8-9.
9. Акимова Е.Е. Действие формальдегидутилизирующих псевдомонад // Биология – наука XXI века: VII Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов. – Пущино: Авторская редакция, 2003. – 452 с. – С. 83.