

На правах рукописи

ХАТЕМ АМЖАД

**ПОЛУЧЕНИЕ БИОМАССЫ ШТАММА *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*
ВКМ F-4876 D БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ ПУТЁМ И ИЗУЧЕНИЕ ЕЁ
ВЛИЯНИЯ НА ПАТОГЕНЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

Специальность: 1.5.6 – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена на кафедре микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева».

Научный руководитель: **Джавахия Вахтанг Витальевич,**
кандидат биологических наук, руководитель
группы биотехнологии физиологически активных
веществ ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН

Официальные оппоненты: **Смирнова Ирина Павловна,**
доктор биологических наук, профессор,
профессор-консультант медицинского института
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы
народов имени Патриса Лумумбы», заслуженный
профессор РУДН.

Асатурова Анжела Михайловна,
кандидат биологических наук, директор, ведущий
научный сотрудник лаборатории
микробиологической защиты растений ФГБНУ
«Федеральный научный центр биологической
защиты растений»

Ведущая организация: ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «24» апреля 2024 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета диссертационного совета 35.2.030.09, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел: 8 (499) 976-17-14.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте www.timacad.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент

Киракосян Рима Нориковна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В современной системе возделывания сельскохозяйственных культур ведущее место в арсенале средств борьбы с фитопатогенными микроорганизмами принадлежит методам химической защиты. В то же время, результатом постоянного использования синтетических пестицидов стало как снижение их эффективности, так и существенное накопление остатков в почве, водоемах и получаемой сельскохозяйственной продукции, что является существенным фактором риска, способным оказать негативное влияние на здоровье человека, животных и экологической системе в целом. Наряду с этим, выявлена резистентность патогенных микроорганизмов к используемым химическим средствам защиты. В настоящий момент мировое сообщество столкнулось не только с проблемой увеличения вредоносности уже известных патогенов, но и появлением новых опасных видов, зачастую из числа карантинных объектов.

В связи с этим, основная тенденция развития сельскохозяйственной отрасли, как в мире, так и в России, заключается в поиске новых эффективных методов ведения сельского хозяйства, обеспечивающих защиту растений от фитопатогенов, охрану окружающей среды и безопасность получаемой продукции. Одним из способов решения вышеперечисленных проблем может стать использование микробиологических средств защиты растений на основе полезных микроорганизмов и их метаболитов. Данные средства выгодно отличаются от химических: безопасны для человека и животных, обладают высокой эффективностью и избирательностью действия в отношении широкого спектра известных фитопатогенов, характеризуются отсутствием к ним резистентности патогенных организмов, коротким сроком ожидания отклика, высокой экологической безопасностью.

Тем не менее, несмотря на все преимущества биологических методов защиты сельскохозяйственных растений, отказ от современных фунгицидов невозможен, поскольку их применение обеспечивает высокоэффективный контроль развития болезней. Одним из актуальных способов снижения ксенобиотической нагрузки на агробиоценозы может стать сочетание химических средств защиты с методами биоконтроля.

Применяемые биопрепараты должны удовлетворять как минимум двум условиям. Во-первых, эффективно подавлять рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов. А во-вторых, не оказывать негативного воздействия на растения, насекомых, животных и человека. В связи с чем, актуальным становится как поиск штамма, на основе которого будет получен препарат с противогрибным действием, так и разработка современной и конкурентной технологии его получения.

Степень разработанности темы исследований. Анализ доступных патентных документов и данных литературы показал, что к настоящему времени известны бактериальные и грибные штаммы, продуцирующие разнообразные по структуре биологически активные вещества, обладающие антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным микроорганизмам. На данный

момент на территории Российской Федерации зарегистрированы биопрепараты, как правило, на основе бактерий родов *Bacillus* (БФТИМ КС-2; Баксис, Ж; Аллирин-Б; Бактофит, СП и др.) и *Pseudomonas* (Псевдобактерин – 2, Ж; Гуапсин плюс, Ж; Ризоплан, Ж; Биокомпозит-Про, Ж и др.). Ассортимент биофунгицидов, в которых действующим началом является биомасса непатогенных грибов, не столь разнообразен и представлен препаратами на основе штаммов, принадлежащих к роду *Trichoderma* (Глиокладин, СП; Стренифаг, СП; Трихоплант, СК и др.).

Перспективными для разработки биопрепаратов для защиты растений являются некоторые представители рода *Penicillium*, вторичные метаболиты которых обладают широким диапазоном действия против возбудителей заболеваний сельскохозяйственных растений.

Так, известен штамм гриба *P. vermiculatum*, депонированный в коллекции чистых культур Всероссийского института защиты растений, и разработанный препарат Вермикулен на его основе. Недостатком этого препарата на основе живых микроорганизмов является малый срок хранения и чувствительность к условиям окружающей среды.

Таким образом, по-прежнему остаются открытыми вопросы разработки технологии производства эффективных биопрепаратов, в том числе на основе грибных штаммов.

Цель и задачи исследования. Цель работы: разработать эффективную технологию получения сухой биомассы гриба *Penicillium chrysogenum* и оценить ее противогрибной эффект по отношению к выбранным тест-культурам.

Задачи:

1. Методами селекции получить штамм *P. chrysogenum*, обладающий высокой антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным тест-культурам.

2. Подобрать оптимальный состав питательной среды для получения биомассы *P. chrysogenum*.

3. Определить оптимальные технологические параметры ферментации, способствующие максимальному выходу биомассы *P. chrysogenum* в ферментационной установке объемом 15 л.

4. Провести апробацию результатов исследования в ферментационной установке объемом 100 л в режиме контроля параметров рН и рО₂ и осуществить масштабирование процесса культивирования в 1000 л ферментере.

5. Разработать эффективную технологическую схему получения сухой биомассы *P. chrysogenum*.

6. Изучить противогрибное действие сухой биомассы *P. chrysogenum* отдельно и в комбинации её с фунгицидами на тест-культурах.

Научная новизна. Определены оптимальные условия культивирования, обеспечивающие выход биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D с высокой противогрибной активностью. Определены параметры культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационных установках объемом 15 л. На основании полученных результатов проведена апробация процесса

культивирования в ферментере объемом 100 л и масштабирование процесса культивирования в ферментационной установке объемом 1000л.

Разработана оптимальная технологическая схема получения сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D.

Впервые продемонстрирована возможность комбинированного применения химических фунгицидов с сухой биомассой *P. chrysogenum*. Полученный в итоге данного сочетания синергетический или аддитивный эффект позволил без потери эффективности уменьшить рабочие концентрации химических фунгицидов до таких значений, при которых они неэффективны при использовании в качестве монопрепарата.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о физиологических свойствах *P. chrysogenum*, влиянии элементов питания и условий культивирования штамма на его рост и активность по отношению к растительным фитопатогенам. Установленный аддитивный эффект комбинированного применения сухой грибной биомассы и коммерчески используемых фунгицидов имеет большое практическое значение, поскольку научно обосновывает перспективу снижения эффективных дозировок химических средств контроля, необходимых для борьбы с фитопатогенными микроорганизмами. Это поможет, во-первых, смягчить воздействие пестицидов на окружающую среду. А во-вторых, отсутствие механизмов развития резистентности у фитопатогенных микроорганизмов к биопрепаратам открывает перспективу успешного контроля за развитием заболеваемости сельскохозяйственных растений без увеличения дозировок фунгицидов.

Разработана техническая документация на проведение процесса культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационной установке объемом 1000 л.

Таким образом, результаты, полученные в процессе реализации данной работы, являются научным обоснованием для появления на рынке нового высокоэффективного и экологически безопасного противогрибного препарата для контроля за поражением сельскохозяйственных культур фитопатогенными микроорганизмами.

Методология и методы исследования. В основе теории и методологии диссертационной работы лежат труды российских и зарубежных ученых, направленные на изучение биотехнологических способов получения грибных штаммов, обладающих высокой противогрибной активностью, а также биологических способов контроля болезней сельскохозяйственных растений.

В работе были использованы общепринятые и модифицированные методы промышленной биотехнологии, аналитической химии и фитопатологии. Все определения были выполнены с использованием современных методов анализа и на современном оборудовании, позволяющем получать результаты с высокой достоверностью.

Положения, выносимые на защиту:

- Установлено влияние источника азота и количества вносимого углерода на накопление биомассы и выход мевастатина у *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D;
- Определены параметры культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационных установках объемом 15 л;
- Проведена апробация процесса культивирования *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментере объемом 100 литров в режиме параметров контроля pH и pO₂.
- Проведено масштабирование процесса культивирования штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационной установке объемом 1000 л.
- Установлено противогрибное действие сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D по отношению к тест-культурам (*F. oxysporum*, *A. solani*, *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*);
- Показан аддитивный фунгицидный эффект при применении комбинации сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D и химических фунгицидов – азоксистробина, пропиконазола, тебуконазола и комбинации пикоксистробина и ципроконазола (Аканто Плюс).

Степень достоверности и апробация работы. Диссертационная работа выполнена на современном оборудовании с использованием современных общепринятых и адаптированных для данной работы методик.

Публикации результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 2 – в международных изданиях Scopus и Web of Science.

Также результаты диссертационного исследования были доложены и обсуждены на следующих конференциях: Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 160-летию В.А. Михельсона (Москва, 2020); Всероссийская с международным участием научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 155-летию со дня рождения Н.Н. Худякова (Москва, 2021); IX Международная научная студенческая конференция «Студенческая наука как ресурс инновационного потенциала развития- 2021» (Воронеж, 2021); Всероссийская конференция молодых исследователей «АГРАРНАЯ НАУКА – 2022» (Москва, 2022); Всероссийский круглый стол «Фундаментальные и прикладные аспекты микробиологии», посвященный 150- летию со дня рождения В.С. Буткевича-2022» (Москва, 2022); X Международная научная студенческая конференция «Студенческая наука как ресурс инновационного потенциала развития - 2022» (Воронеж, 2022); International youth forum «Russia-Africa: nuclear education-potential for successful development» (2023).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в анализе и сборе информации для литературного обзора, проведении лабораторных опытов, проведении ферментаций в лабораторных и опытно-промышленных установках. Разработка программы исследований и выбор необходимых для её осуществления методов, а также систематизация, анализ полученных результатов, формулирование основных выводов и подготовка

публикаций по теме исследований выполнены при участии научного руководителя.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность за содействие и поддержку в процессе выполнения и оформления работы: своему научному руководителю, к. б.н Джавахия В.В.; своему научному руководителю в аспирантуре, д.б.н, проф. Смирнову А.Н., за неоценимую помощь и научное руководство; сотрудникам группы биотехнологии физиологически активных веществ Института Биоинженерии Федерального исследовательского центра “Биотехнологии” РАН (Глаголевой Е.В., н.с., к.б.н Ядерец В.В., н.с., к.б.н Карповой Н.В.), за содействие в подготовке диссертационной работы, а также за все предоставленные возможности и конструктивные замечания.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав, обсуждения результатов, заключения, содержит 24 таблицы, 30 рисунков. Список библиографических источников включает 138 наименований, в том числе 104 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **ВВЕДЕНИИ** приведена актуальность выбранной темы исследования, сформулированы цель и соответствующие задачи, приведены основные направления реализации поставленных задач, продемонстрирована научная новизна, обоснована теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

ГЛАВА 1 Обзор литературы.

В данной главе рассмотрены основные вопросы разработки препаратов на основе антагонистических микроорганизмов в мире и России. Проанализированы и обобщены доступные данные литературы по эффективности применения биопрепаратов для регулирования заболеваемости сельскохозяйственных культур. Обобщены данные по изучению противогрибного эффекта комбинированного применения химических и биологических средств защиты.

ГЛАВА 2 Материалы и методы.

Исследования проведены в группе биотехнологии физиологически активных веществ Института Биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН.

Объектом исследования являлся штамм *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D, обладающий высокой фунгицидной активностью по отношению к широкому спектру патогенных грибов. Штамм был получен в результате ненаправленного УФ-мутагенеза и последующей селекции из коллекционного штамма *P. chrysogenum* ВКПМ F-1310.

Для изучения противогрибного эффекта полученной сухой биомассы *P. chrysogenum* из Центра коллективного пользования «Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов и сортов-идентификаторов патогенных штаммов микроорганизмов Федерального государственного бюджетного

научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» (ЦКП ГКФМ ФГБНУ ВНИИФ) были получены штаммы *Fusarium oxysporum* МР-14-6, *Alternaria solani* 10053, *Botrytis cinerea* 1000007. Штамм *Sclerotinia sclerotiorum* был выделен в группе биотехнологии физиологически активных веществ ФИЦ Биотехнологии РАН из образцов моркови (сорт «Олимпо», Россия). Штамм идентифицировали в лаборатории молекулярной диагностики (ЦКП) ФИЦ Биотехнологии РАН.

Для изучения противогрибной активности получали биомассу *P. chrysogenum* методом глубинного культивирования сначала в колбах Эрленмейера, затем для этих целей использовали ферментационные установки объемом 15 и 100 л. Полученную биомассу отделяли от культуральной жидкости (КЖ) и лиофильно сушили. Масштабирование процесса культивирования проводили в ферментационной установке объемом 1000 л.

Анализ влияния белков *P. chrysogenum* на метаболическую активность фитопатогенных грибов проводился в плоскодонных 96-луночных планшетах. Тест-культурами были выбраны *B. cinerea*, *F. oxysporum*.

Для оценки противогрибного эффекта сухой биомассы *P. chrysogenum* как в комбинации с фунгицидами, так и отдельно, использовали метод радиального роста.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в трех повторностях с помощью программы «STATISTICA 6.0» (StatSoft, Inc.). На диаграммах приведены значения среднего арифметического и стандартной ошибки. Уровень достоверности отличий между контролем и обработками ($p < 0,05$) определяли, используя t-тест для независимых переменных.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Получение штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D, обладающего повышенной противогрибной активностью

Для увеличения противогрибной активности исходного штамма *P. chrysogenum* ВКПМ F-1310 была проведена серия работ с применением УФ мутагенеза и последующим отбором изолированных колоний. Оптимальное время воздействия определяли путем подсчета выживаемости и появления клеток с измененными морфо - физиологическими признаками в единицу времени. Установлено, что оптимальное время воздействия составляет 20 мин. Максимальное количество колоний с измененной морфологией составило 28%. Выживаемость облученных клеток не превышала 2–2.5%.

После УФ-облучения клетки высевали на питательную среду в чашки Петри и культивировали в течение 10–14 дней. Затем отбирали 7–10 колоний, отличающихся от контрольных по цвету и форме. Отобранные моноколонии тестировали на антагонистическую активность по отношению к тест-культурам *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *A. solani*. Колонию с максимальной противогрибной активностью подвергали новому этапу мутагенеза и селекции. В результате серии последовательных мутагенезов *P. chrysogenum* ВКПМ F-1310 был получен новый штамм с войлочными колониями с неровным краем светлого

серо-зеленого цвета. Полученному штамму был присвоен лабораторный индекс *P. chrysogenum* F-24–28. Для нового штамма была определена значительная противогрибной активность (рисунок 1) по отношению к выбранным тест-культурам.

ПЦР анализ образца полученного штамма с использованием 18S РНК показал, что нуклеотидная последовательность на 100% совпадает с аналогичной последовательностью типовых штаммов *P. chrysogenum* CBS 306.48, *Talaromyces leycettanus* CBS 398.68, *Penicillium commune* CBS 343.51 на всем протяжении, поддающемся достоверной расшифровке, а вызванные мутации не затрагивают ген 18SPHK. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D.

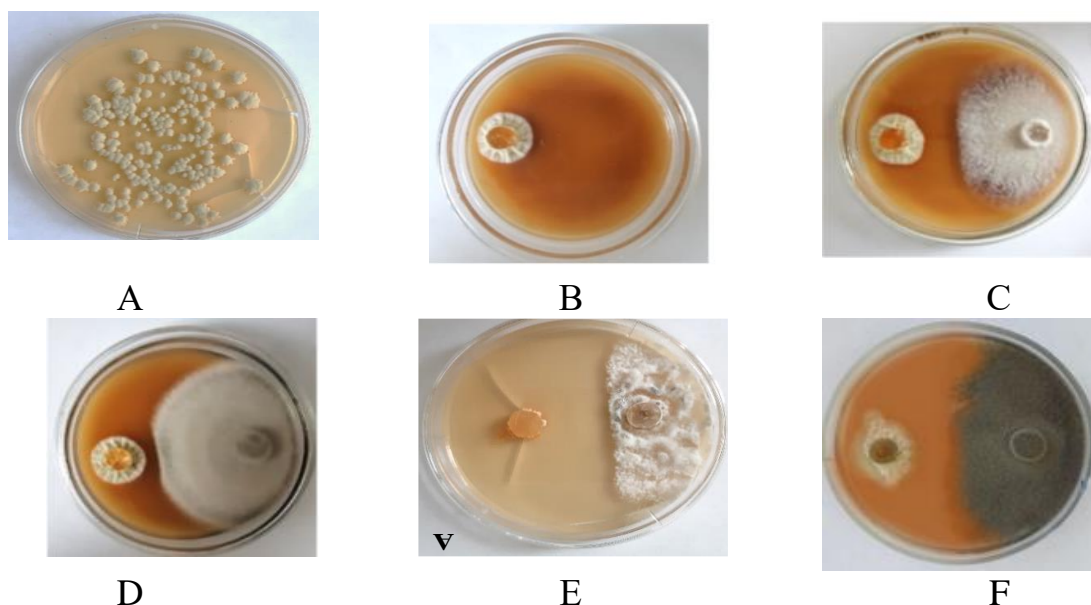


Рисунок 1. Штамм *P. chrysogenum* F-24–28 (А)

В, С, D, Е - антагонистическая активности штамма *P. chrysogenum* F-24–28 (В) по отношению к *F. oxysporum* (С), *A. solani* (D), *S. sclerotiorum* (Е), *B. cinerea* (F)

3.2 Определение вторичных метаболитов в биомассе *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

3.2.1 Идентификация мевастатина

Обзор данных литературы показал, что ряд вторичных метаболитов грибов рода *Penicillium*, в частности, статинов, обладает высокой противогрибной и противовирусной активностью. Способность статинов эффективно ингибировать рост и развития фитопатогенных микроорганизмов известна. Поскольку способность к синтезу статинов также может быть свойственна в том числе и штаммам *P. chrysogenum*, представлялось интересным определить наличие веществ данной группы соединений в биомассе *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D. С этой целью штамм выращивали в жидкой среде в колбах Эрленмейера. Полученную биомассу инактивировали при 80 °С, отделяли от КЖ и сушили на лиофильной сушке.

Сравнительный качественный ВЭЖХ анализ экстракта сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D (БМРс) со стандартным образцом подтвердил наличие мевастатина в анализируемом образце (рисунок 2).

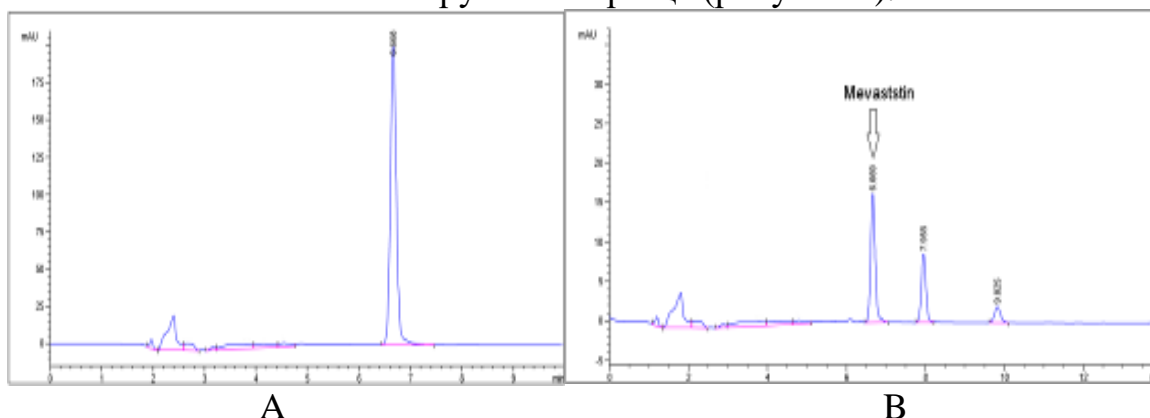


Рисунок 2. ВЭЖХ анализ: А-стандартный образец мевастатина, В – экстракт из БМРс

3.2.2 Результаты электрофореза белковых фракций, выделенных из биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

Для выделения и очистки белков и пептидов из биомассы *P. chrysogenum* использовали методы, модифицированные для данной исследовательской работы. Эффективность очистки проверяли методом SDS-ПААГ электрофореза (рисунок 3).

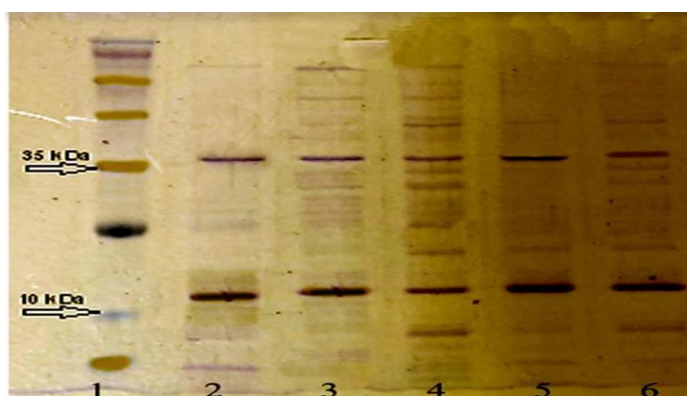


Рисунок 3. Электрофореграмма образцов очищенных белков из биомассы изолятов *P. chrysogenum*

В результате SDS-ПААГ электрофореза *P. chrysogenum* обнаружено, что каждый образец достоверно характеризуется определённым широким набором белков и пептидов.

3.2.3 Изучение влияния белков, выделенных из биомассы *P. chrysogenum* F-4876D на метаболическую активность гриба *B. cinerea* и *F. oxysporum*

Для изучения активности выделенных белковых фракций на метаболическую активность патогенных грибов были выбраны следующие фитопатогены – *F. oxysporum* и *B. cinerea*. Результат представлен на рисунке 4.

Согласно полученным данным, наблюдалось дозозависимое уменьшение степени прорастания спор (метаболическая активность). Установлено, что

концентрации белковой фракции, равные 0.625 мг/мл и 0.3125 мг/мл, оказались наиболее эффективными по отношению к выбранным фитопатогенным микроорганизмам. Степень прорастания спор *B. cinerea* составила 22 и 37,8%, для *F. oxysporum* – 18,3 и 29% соответственно для 0.625 и 0.3125 мг/мл.

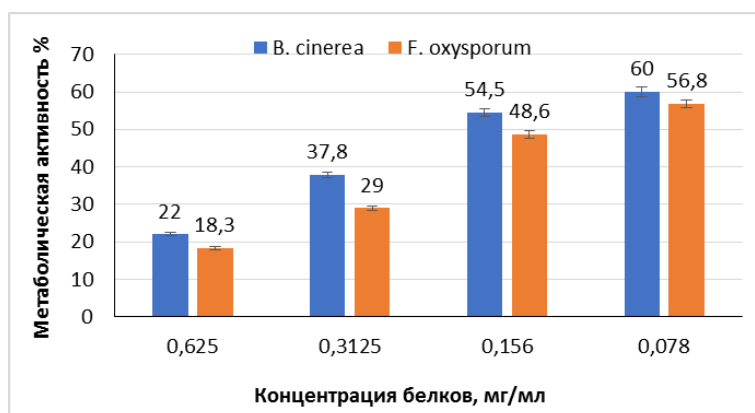


Рисунок 4. Динамика изменения метаболической активности *B. cinerea* и *F. oxysporum* при инкубации в присутствии белков *P. chrysogenum*

3.3 Оптимизация состава питательной среды

3.3.1 Изучение влияния источника углерода на биосинтез мевастатина и накопление биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

Исходная среда, используемая в начале исследования, в качестве источника углерода содержала 200 г/л сахарозы. В процессе реализации диссертационной работы представлялось интересным изучить изменение уровня биосинтеза мевастатина и накопление биомассы *P. chrysogenum* при замене сахарозы в базовой среде на мальтозу, глюкозу и мелассу. Также предложен вариант приготовления питательной среды для культивирования *P. chrysogenum* на пищевом сахаре как наиболее дешевом и доступном сырье. Эксперименты проводились в конических колбах объемом 50 мл, содержащих 10 мл питательной среды, по 3 колбы на каждый вариант в трех повторностях. Культивирование штамма вели в течение 4 суток. Результаты представлены на рисунке 5А.

Как следует из полученных данных, замена сахарозы на глюкозу и мальтозу привела, во-первых, к уменьшению на 34% количества сырой биомассы *P. chrysogenum* в КЖ. Во-вторых, уровень биосинтеза мевастатина был снижен на 42,1% и 31,6% для вариантов с мальтозой и глюкозой соответственно. При замене сахарозы на мелассу сокращение содержания сырой биомассы не было столь значительным и не превышало 8–10%. Более заметным было снижение концентрации мевастатина в КЖ– на 15,8%. Замена сахарозы на пищевой сахар не привела к каким-либо изменениям продуктивности *P. chrysogenum* по биомассе и мевастатину. В связи с чем все остальные процессы по оптимизации состава питательной среды и разработке технологии получения сухой биомассы вели на пищевом сахаре.

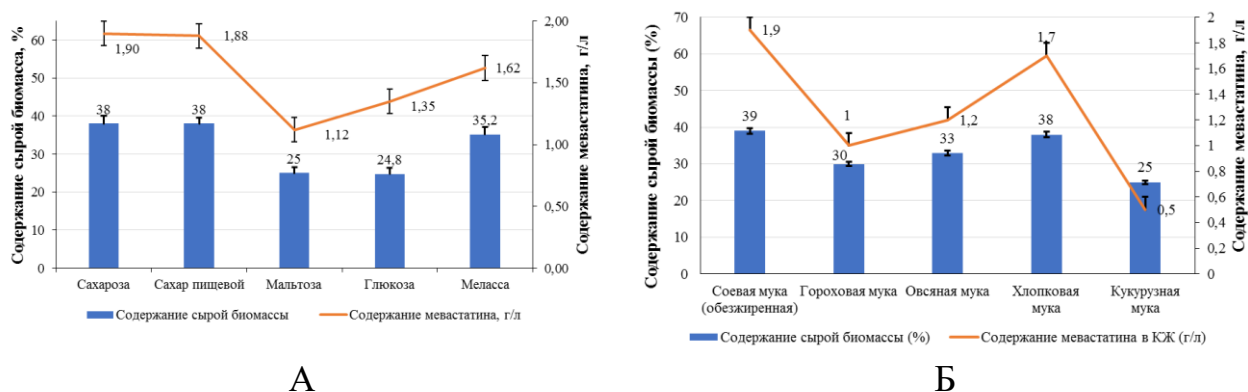


Рисунок 5. Влияние источников углерода в количестве 200 г/л (А) и азота (Б) на биосинтез мевастатина и накопление сырой биомассы

3.3.2 Влияние источников органического азота на биосинтез мевастатина и накопление биомассы в культуральной жидкости *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

В качестве источника азота исходная среда содержала соевую обезжиренную муку в количестве 30 г/л. В связи с этим, представлялось интересным изучить влияние на биосинтез мевастатина и накопление биомассы *P. chrysogenum* таких видов муки, как гороховая, овсяная, кукурузная и хлопковая. В ходе эксперимента оценивали такие показатели, как количество сырой биомассы (%) и мевастатина (г/л) в КЖ. Результаты представлены на рисунке 5Б.

Из полученных данных следует, что максимальная концентрация мевастатина в КЖ наблюдается при культивировании штамма *P. chrysogenum* в контрольных условиях на среде, содержащей обезжиренную соевую муку в концентрации 30 г/л. Продуктивность штамма составила $1,9 \pm 0,1$ г/л мевастатина на 1 л культуральной жидкости и $39 \pm 2\%$ сырой биомассы. Замена соевой муки на кукурузную привела к сокращению содержания сырой биомассы на 36% и в 3,8 раза был снижен уровень биосинтеза мевастатина. В варианте с гороховой мукой наблюдали практически 2-х кратное сокращение концентрации мевастатина в культуральной жидкости.

Стоит также подчеркнуть, что близкие результаты были получены при использовании хлопковой муки в роли источника азота, при условии, что концентрация мевастатина в культуральной жидкости была меньше на 10%, чем при использовании соевой муки, и на 2,5% меньше содержание биомассы.

Однако, несмотря на полученные результаты, использование хлопковой муки в качестве источника азота считается экономически нецелесообразным, поскольку это дорогостоящий материал. В связи с этим, в последующих опытах мы предпочли использовать соевую муку в качестве источника азота.

3.3.3 Изучение влияния дополнительных источников азота на рост *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D и биосинтез мевастатина

В качестве дополнительного источника азота в базовой среде использовался гидролизат казеина (триптон). Для определения оптимального

состава питательной среды были протестированы такие компоненты, как дрожжевой экстракт, мясной пептон, соевый пептон и сухое обезжиренное молоко (СОМ). Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Влияние различных источников дополнительного азота на рост и продуктивность штамма *P. chrysogenum* на 4 сутки культивирования

Компоненты среды	Концентрация (г/л)	Содержание сырой биомассы (%)	Содержание мевастатина в КЖ (г/л)
Гидролизат казеина (контроль)	10	40±2	1,95±0,1
Дрожжевой экстракт	10	30±2	0,8±0,1
Мясной пептон	10	38,5±2	1,75±0,1
Соевый пептон	10	32±2	1,6±0,1
СОМ	10	37±2	1,89±0,1

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что максимальная концентрация мевастатина в культуральной жидкости наблюдается при культивировании штамма *P. chrysogenum* на контрольной среде, содержащей гидролизат казеина в концентрации 10 г/л. В этом варианте продуктивность штамма по мевастатину составила $1,95 \pm 0,1$ г/л, сырой биомассы - 40 ± 2 %. Замена гидролизата казеина на более доступное СОМ привело к практически одинаковому накоплению мевастатина в КЖ за аналогичный период культивирования штамма при относительно одинаковом уровне накопления биомассы.

Основываясь на предыдущих результатах и учитывая, что оба источника способствуют достижению одного и того же результата, мы выбрали СОМ в качестве дополнительного источника азота, поскольку оно считается дешевым материалом по сравнению с гидролизатом казеина.

3.3.4 Изучение влияния минеральных солей на накопление мевастатина и биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

Такие микроэлементы, такие как S, Ca, P, Mg и K являются обязательными элементами для нормального функционирования микробных клеток, обеспечивая нормальное функционирование ферментных систем. Кроме того, микроэлементы регулируют проницаемость клеточных мембран, участвуют в переносе энергии и активируют работу различных ферментов.

Контрольная (или исходная) питательная среда содержала NaNO_3 (2.0 г/л) и $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (1 г/л). В процессе оптимизации состава среды была проведена работа, цель которой заключалась в определении изменения уровня биосинтеза мевастатина и накопления биомассы *P. chrysogenum* в культуральной жидкости при замене NaNO_3 на KNO_3 или NH_4NO_3 . Также было проведено исследование по изучению влияния на продуктивность *P. chrysogenum* и биосинтез мевастатина дополнительного внесения в контрольную среду карбоната кальция. Состав сред представлен в таблице 2.

Таблица 2- Влияние дополнительных источников макроэлементов на рост *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D и процесс биосинтеза мевастатина

№	Состав среды, г/л	Содержание сырой биомассы (%)	Содержание мевастатина в КЖ (г/л)
Среда 1	Сахар 200.0, соевая мука 30.0, СОМ 10.0, NaNO₃ 2.0 г/л и MgSO ₄ × 7H ₂ O 1.0.	38±2	1,9±0.1
Среда 2	Сахар 200.0, соевая мука 30.0, СОМ 10.0, KNO₃ 2.0 г/л и MgSO ₄ × 7H ₂ O 1.0.	35±2	1,6±0,1
Среда 3	Сахар 200.0, соевая мука 30.0, СОМ 10.0, NH₄NO₃ 2.0 г/л и MgSO ₄ × 7H ₂ O 1.0.	30±2	1.0±0.1
Среда 4	Сахар 200.0, соевая мука 30.0, СОМ 10.0, NaNO ₃ 2.0 г/л и MgSO ₄ × 7H ₂ O 1.0, CaCO₃ – 1.0	28±2	0,9±0,1

Как следует из полученных данных, максимальная продуктивность *P. chrysogenum* по мевастатину наблюдалась в контрольном варианте, содержащем нитрат натрия и сульфат магния, что подчеркивает необходимость присутствия данных макроэлементов для нормального роста и развития штамма и биосинтеза мевастатина. Добавление же в среду карбоната кальция ингибировало процесс накопления в культуральной жидкости мевастатина и накопления биомассы.

3.4 Оптимизация концентрации сахара в питательной среде для культивирования штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

Для оптимизации и удешевления процесса культивирования *P. chrysogenum* была проведена серия работ по изучению влияния на накопление биомассы и биосинтез мевастатина уменьшения концентрации вносимого в питательную среду сахара. Поскольку помимо мевастатина, *P. chrysogenum* способен синтезировать другие метаболиты, определяющие его противогрибное действие, то представлялось интересным также провести оценку противогрибной активности методом радиального роста получаемой сухой биомассы (1 г/л). Тест-культурой был выбран *F. oxysporum*. Результаты подавления роста *F. oxysporum* оценивали на 7 сутки эксперимента.

Состав исходной питательной среды для культивирования *P. chrysogenum* (г/л): сахар – 200.0, соевая мука – 30.0, СОМ – 10.0, NaNO₃ – 2.0, MgSO₄ – 1.0.

Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Целевые показатели штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в различных вариантах ферментативной среды

Вариант	Количество сахара, г/л	pH	Содержание сырой биомассы, %	Концентрация мевастатина г/л	Противогрибная активность, %
1	200	5,10	32,46 ±2	1,6 ±0.1	56,2
2	100	5,27	31,16 ±2	1,5 ±0.1	52,4
3	75	5,90	27,95 ±2	1,3 ±0.1	50,7
4	50	5,98	26,7 ±2	1,1 ±0.1	48,5

Из представленных данных в таблице 3 следует, что при уменьшении в 4 раза содержания сахара в питательной среде происходит снижение концентрации мевастатина в культуральной жидкости на 31,25%.

С уменьшением концентрации мевастатина наблюдается понижение противогрибной активности полученной биомассы на 26,7%. Для дальнейшей экспериментальной работы количество вносимого сахара составило 100 г/л, поскольку двухкратное сокращение данного компонента среды не оказало существенного влияния на содержание мевастатина в культуральной жидкости и фунгицидную активность сухой биомассы против возбудителя фузариоза. Таким образом, подобран состав оптимизированной ферментационной среды (г/л): сахар – 100.0, соевая мука – 30.0, сухое обезжиренное молоко – 10.0, NaNO_3 – 2.0, MgSO_4 - 1.

3.5 Культивирование штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационной установке объемом 15 литров

3.5.1 Культивирование штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D при нерегулируемом режиме ферментации в биореакторе объемом 15 литров.

Получение посевного материала осуществляли в две генерации, используя питательную среду, состав которой представлен в пункте 3.4. Для засева колб 1-ой генерации использовали свежие агаровые среды с культурой, прошедшие микробиологический контроль.

Маточную колбу объемом 100 мл, содержащую 20 мл питательной среды, засекали взвесью спор (концентрация 10^6 КОЕ/мл) или кусочком (1 x 1 см) агаризованной культуры. Колбы помещали на качалку (эксцентриситет 5 см) и наращивали посевной материал в течение 48 ч при 24°C. По истечении указанного срока культура продуцента должна иметь вид равномерной густой взвеси светло-серого цвета с грибным запахом.

Посевной материал 1 генерации равномерно (по 10-20 об. %) распределяют в 10 рабочих колб объемом по 500 мл, содержащие по 100 мл питательной среды. Колбы с культурой 2-ой генерации помещали на качалочную установку и вели культивирование в аналогичных условиях. Через 48 ч роста рабочие колбы с соблюдением правил асептики объединяли в одну. Из общего содержимого колбы отбирали пробу для микробиологического контроля. Культура должна быть однородной и представлять собой в основном ветвящиеся гифы и отдельные колонии. Полученным посевным материалом засекали биореактор объемом 15 л.

В процессе выращивания культуры наблюдалось повышение рН среды с 6.1 до 7.6. Содержание сырой биомассы на 65 ч ферментации достигло 30%, затем ее количество сокращалось. Количество мевастатина в КЖ к концу периода культивирования составляло $1,3 \pm 0,10$ г/л (рисунок 6).

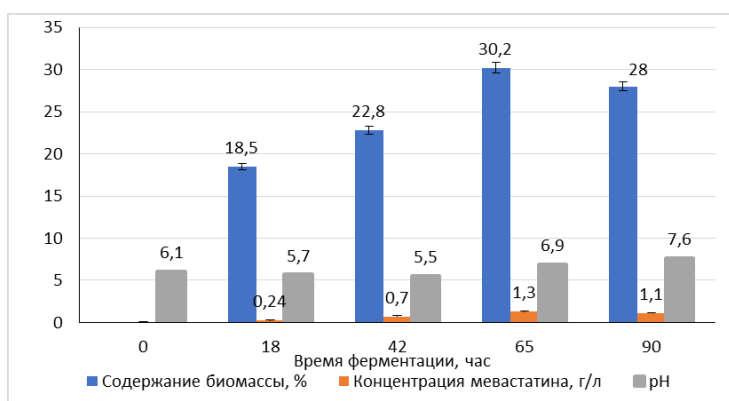


Рисунок 6. Культивирование штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в нерегулируемом режиме ферментации

3.5.2 Культивирование штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в биореакторе в режиме регулирования водородного показателя

Культивирование проводили в 15-литровом ферментере, состав среды описан в п.3.4. Посевной материал готовили согласно условиям пункта 3.5.1. Водородный показатель среды поддерживали путем подачи 10% р-ра HCl при помощи перистальтического насоса в автоматическом режиме.

Контрольной являлась ферментация, проводимая в режиме регистрации основных технологических и биохимических параметров без регуляции значения pH. Результаты представлены на рисунке 7А. Как следует из полученных данных, лучшие результаты были достигнуты при уровне водородного показателя культуральной жидкости 6.9. В связи с чем, в последующих экспериментах водородный показатель в процессе ферментации в культуральной жидкости поддерживали на уровне 6.8–7.0.

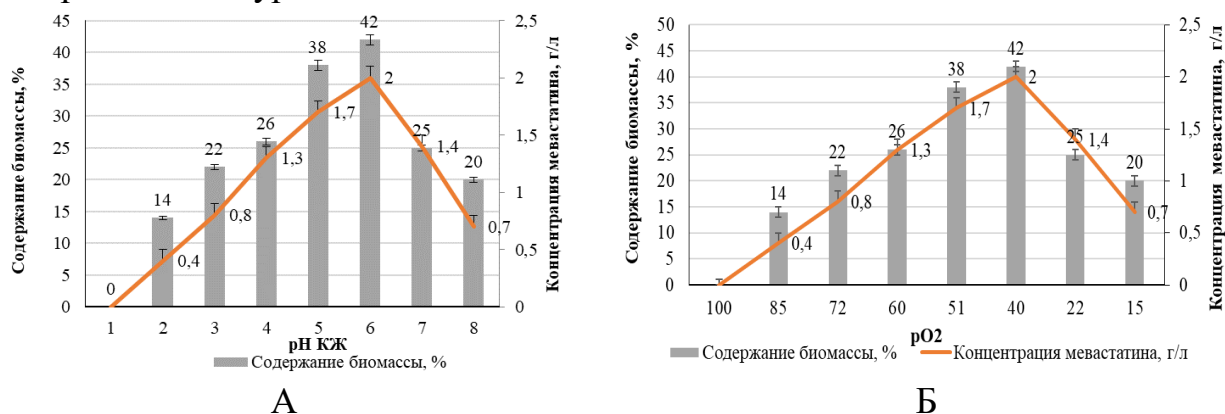


Рисунок 7. Накопление биомассы и мевастатина в КЖ штамма *P. chrysogenum* на 96 ч культивирования: А - при различных уровнях водородного показателя; Б – при различных уровнях растворенного кислорода (pO₂)

3.5.3 Культивирование штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D на ферментационной среде в условиях регулирования водородного показателя в культуральной жидкости контроля и концентрации растворенного кислорода

В процессе выращивания микроорганизмов в биореакторах, важным параметром, оказывающим влияние на биосинтез целевого вещества, является концентрация растворенного кислорода. В связи с чем, проведена серия экспериментов по оценке влияния заданных концентрации растворенного кислорода на накопление биомассы и продуктивность штамма при условии автоматического контроля уровня кислотности 6.8-7.0. Культивирование вели в биореакторе объемом 15 л, состав среды представлен в п.3.4. Процедура подготовки посевного материала описана в разделе 3.5.1. pO_2 в ростовой среде изменяли путем регуляции числа оборотов перемешивающего устройства. В результате было установлено (см. рисунок 7Б), что максимальная продуктивность по мевастатину и наибольший прирост биомассы отмечены при значении pO_2 в пределах 30%–50% и составили $2 \pm 0,1$ г/л и 40% ($\pm 2\%$) соответственно.

3.6 Апробация культивирования штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационной установке объемом 100 л в режиме контроля параметров pH и pO_2

Посевной материал для засева биореактора объемом 100 л вели получали в аппарате объемом 15 л и в условиях, представленных в пункте 3.5. Для контроля стерильности ферментационного процесса, оценки стадии роста мицелия, количества сырой биомассы и определения содержания редуцирующих сахаров, через 18–24 часа от начала процесса отбирали пробу культуральной жидкости. Продолжительность процесса культивирования определяли по анализу сырого веса мицелия и путем микроскопического контроля (рисунок 8).

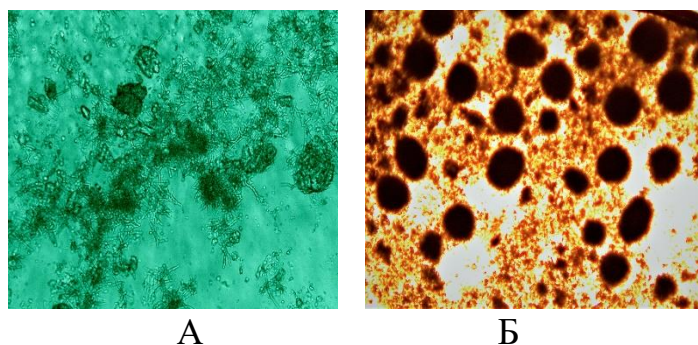


Рисунок 8. Микроскопическая характеристика *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D (А) - посевной материал при увеличении 40X; (Б) - рост в биореакторе при увеличении 10X)

Полученный посевной материал должен удовлетворять следующим условиям:

1. Внешний вид культуры: равномерная взвесь мицелия сероватого цвета, занимающая не менее 80% объема пробыв пробирке.
2. Микроскопическая характеристика: отдельные и соединенные колонии.
3. Чистота культуры: посторонняя микрофлора отсутствует.

Полученный посевной материал по посевной линии передавали для засева рабочего ферментера объемом 100 л.

Питательную среду и ее стерилизацию вели непосредственно в аппарате. Коэффициентом загрузки не более 0.7. Из ферментера до посева отбирали пробу среды для контроля по микробиологическим и биохимическим показателям. Выращивание штамма-продуцента проводили в условиях, представленных в таблице 4.

Таблица 4 - Основные параметры культивирования штамма *P. chrysogenum* в 100 л ферментере

Наименование параметра	Значение показателей
Температура	24°C
Расход воздуха	35-70 л/мин
Водородный показатель среды	Накопление биомассы сопровождается самопроизвольным снижением рН до 5,0–5.2 и дальнейшим подъемом на стадии биосинтеза до 6.5–7.5. При необходимости проводят корректирование рН 20% NaOH или 10% HCl
Обороты перемешивающего устройства	Обороты перемешивающего устройства в течение процесса увеличивают до 100–450 об/мин для поддержания необходимого уровня растворенного кислорода; концентрация растворенного кислорода поддерживается на уровне 50% от насыщения до окончания процесса.
Время культивирования	72–96 часов
Контроль процесса культивирования	Через сутки после посева отбирают пробу для микробиологического и биохимического контроля процесса. Далее отбор проб проводят не реже 1 раза в сутки.

Параметры культуральной жидкости в конце процесса:

- отсутствие посторонней микрофлоры;
- микробиологическая характеристика: культура полиморфна, в основном состоит из уплотненных колоний с выраженной базофилией и отрывков слабо базофильных гиф.

3.7 Масштабирование процесса культивирования штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в ферментационной установке объемом 1000 л

Масштабирование процесса культивирования штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D проводили в ферментере объемом 1000 л на оптимизированной ферментационной среде (п. 3.4.). Параметры ферментации (уровень рН и pO_2) определены на предыдущих этапах исследования.

Для приготовления посевного материала использовали колбы и ферментеры объемом 15 л и 100 л. Посевная доза составляла 10% от рабочего

объема ферментационной среды (аналогично п. 3.6). Процесс культивирования в колбах, ферментерах объемом 15 и 100 л описан в разделе 3.6.

Полученный посевной материал из ферментера объемом 100 л передавали в ферментер объемом 1000 л через стерильную посевную линию.

В результате масштабирования процесса культивирования *P. chrysogenum* наибольшая концентрация мевастатина, равная $2 \pm 0,10$ г/л, была достигнута на 92 – 96 ч, содержание биомассы соответствовало $40 \pm 1\%$. По другим параметрам (рН, рО₂) процесс культивирования в 1000-литровом биореакторе был аналогичен процессу культивирования в 100-литровом биореакторе.

3.8 Получение сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D

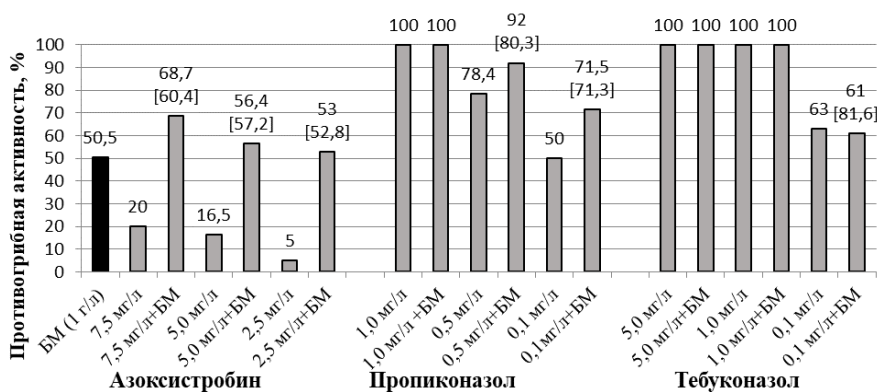
Через 94 – 96 ч роста грибную биомассу инактивировали путем нагрева до 80°C в течение 30 мин непосредственно в ферментационном аппарате. После этого, биомассу переносили в приемник, отделяли от культуральной жидкости путем центрифугирования и лиофильно сушили. Полученную сухую биомассу (БМРс) использовали далее для оценки ее противогрибной активности. Характеристика полученной биомассы представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Основные характеристики БМРс

Наименование параметра	Значение показателей
Внешний вид	Однородный порошок светло-желтого цвета со специфическим запахом
Содержание влаги	не более 5%.
Содержание сырого протеина	не менее 40%
Содержание мевастатина	Не менее 5 г/кг

3.9 Определение противогрибного эффекта БМРс в комбинации с химическими фунгицидами

Для изучения эффекта совместного применения коммерческих фунгицидов и БМ *P. chrysogenum* использовали метод радиального роста. Результаты исследования противогрибной активности комбинации БМРс и выбранных химических фунгицидов по отношению к тест-культурам представлены на рисунке 9.



А

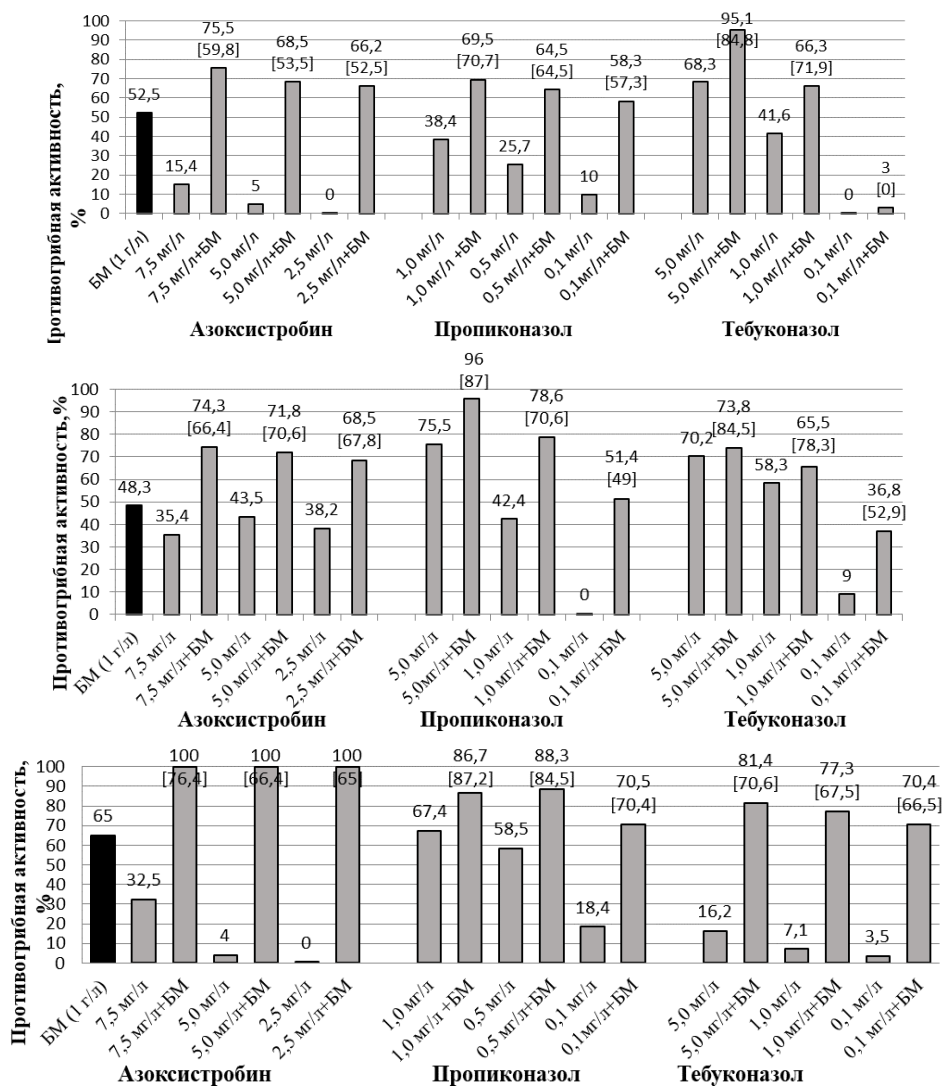


Рисунок 9. Противогрибной эффект биомассы *P. chrysogenum* (7 сутки эксперимента) в комбинации с фунгицидами (азоксистробин, пропиконазол) по отношению к *F. oxysporum* (А), *B. cinerea* (В), *A. solani* (С) и *S. sclerotiorum* (D). Здесь и далее цифры над диаграммами, обозначают экспериментальное значение противогрибной активности (E_R , $p \leq 0,05$), цифры, стоящие в квадратных скобках, соответствуют величине E_E ($p \leq 0,05$), рассчитанной по формуле Richer et al. (1987)

Результаты исследования эффективности комбинации и препарата Аканто Плюс, состоящего из комбинации пикоксистробина и ципроконазола, представлены на рисунках 10 и 11. Концентрацию, которую использовали в эксперименте, рассчитывали с учетом суммарного содержания действующих веществ в препарате.

В процессе исследования было определено, что выбранные тест-культуры обладают неодинаковой чувствительностью как к сухой биомассе *P. chrysogenum*, так и использованным фунгицидам. На 7 сутки эксперимента противогрибное действие сухой биомассы, внесенной в ростовую среду в количестве 1 г/л, находилось в пределах 48,3 – 65%. В процессе исследования также был установлен факт, что для тех вариантов доз фунгицидов, где наблюдалось минимальное ингибирование роста и развитие фитопатогена, при их применении

совместно с сухой биомассой происходило значительное подавление развития микроорганизма.

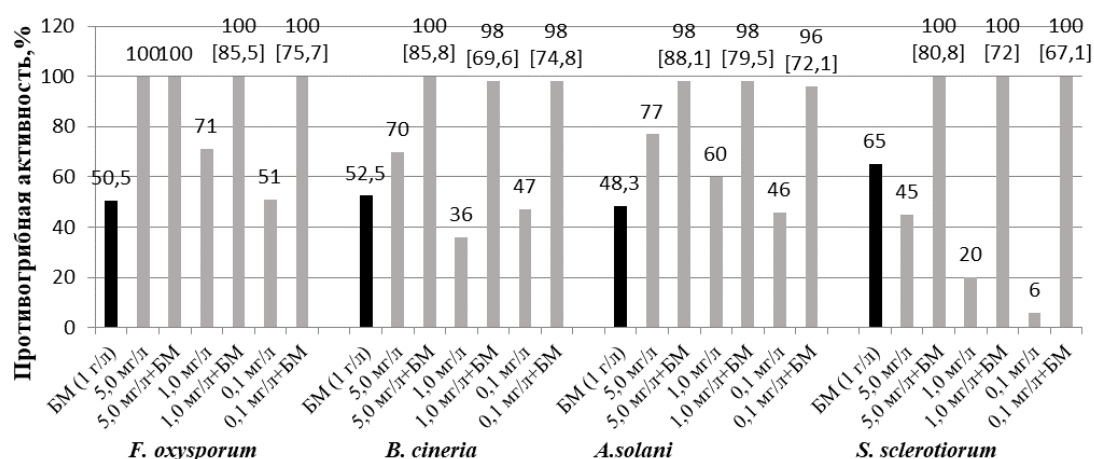


Рисунок 10. Противогрибной эффект биомассы *P. chrysogenum* (7 сутки эксперимента) в комбинации с двухкомпонентным коммерческим препаратом Аканто Плюс по отношению к *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *A. solani* и *S. sclerotiorum*.

Максимальный противогрибной эффект был продемонстрирован при применении двухкомпонентного коммерческого препарата в комбинации с биомассой *P. chrysogenum* во всем диапазоне исследуемых концентраций препарата в отношении всех тест -культур. Противогрибная активность составила 96-100% (Рис.10).

Таким образом, анализируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что в процессе экспериментальной работы при совместном применении фунгицидов и биомассы гриба установлен аддитивный, те равный или незначительно превышающий теоретически рассчитанный (E_E) противогрибной эффект ($E_R = E_E$).

Полученные данные свидетельствуют о высоком потенциале использования комбинации сухой биомассы и фунгицидов для контроля за заболеваемостью сельскохозяйственных культур при низких концентрациях химических препаратов.

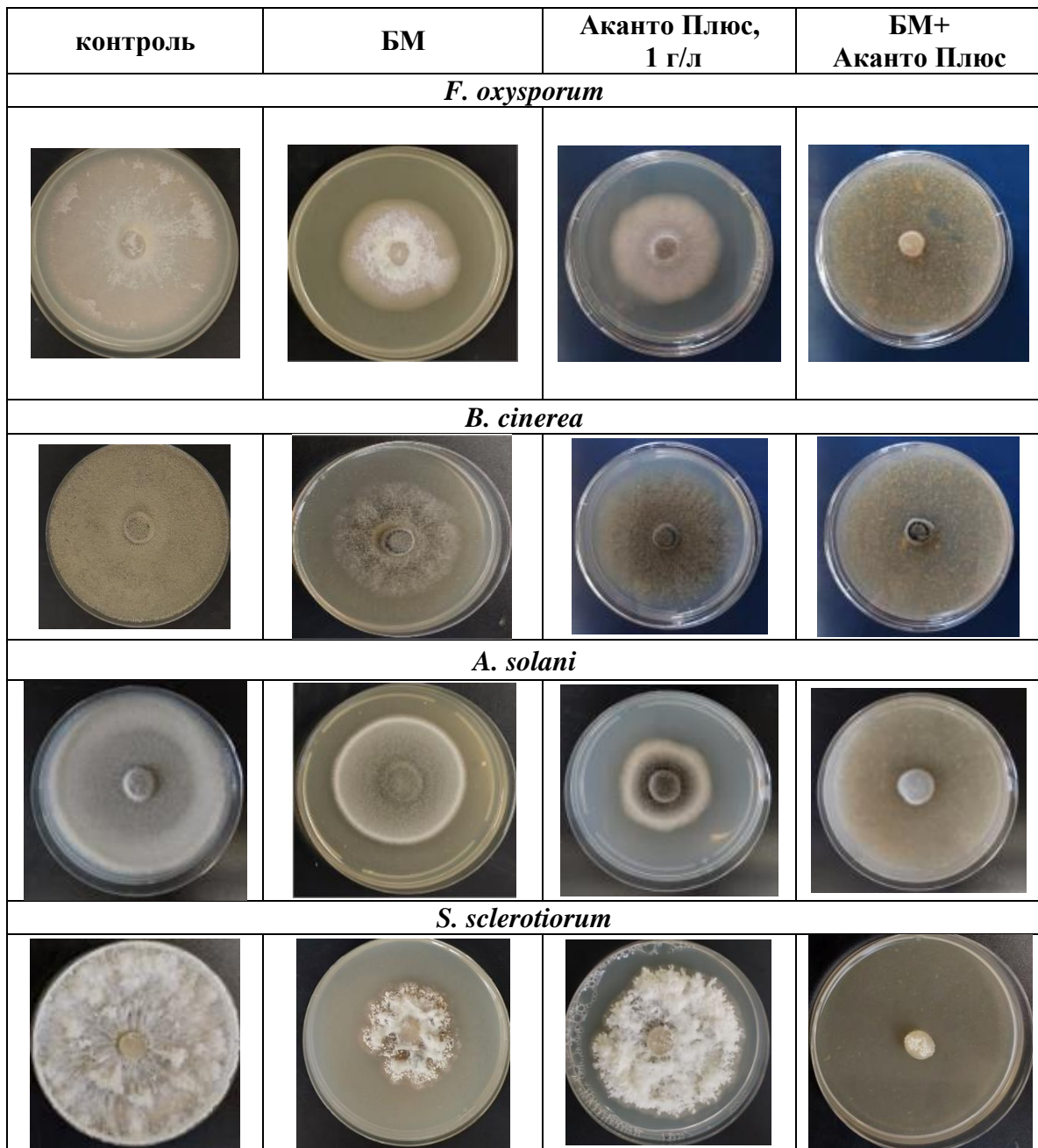


Рисунок 11. Противогрибная активность Аканто Плюс, биомассы *P. chrysogenum* и их комбинации в отношении тест-культур, 7 сутки инкубирования

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание промышленной технологии получения биологически активных соединений, в первую очередь, предполагает разработку высокопродуктивных и стабильных штаммов-продуцентов. А во-вторую, с целью увеличения объемов производимого продукта, проводят масштабирование технологии от лабораторных условий до производственных масштабов. При этом, необходимо обязательное соблюдение условия сохранения продуктивности штамма-продуцента и поддержание заданного качества целевого продукта (Schmidt F.R., 2005). Представленные в диссертационной работе результаты исследования позволяют заключить, что в итоге многоступенчатой селекции и применения УФ-

мутагенеза получен новый штамм *P. chrysogenum*, синтезирующий биологически активные вещества, в том числе мевастатин, в повышенных концентрациях, по сравнению с исходным коллекционным штаммом. Следовательно, повышается эффективность его применения для борьбы с грибковыми патогенами растений.

В результате проведенного исследования были получены следующие результаты:

1. Получен штамм *P. chrysogenum*, обладающий повышенной противогрибной активностью. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) под номером F-4876D и запатентован.

2. Разработан состав питательной среды, который способствует получению значительного выхода биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D обладающего противогрибковой активностью. В частности:

- подобран источник углерода (сахар – 100г/л),
- подобраны источники азота (сухое обезжиренное молоко-10г/л).

3. Определены оптимальные условия и параметры для культивирования штамма в ферментационных установках:

- Определен оптимальный уровень кислотности среды (6,8-7,0), способствующий интенсивному накоплению биомассы продукта и высокому уровню биосинтеза мевастатина.

- Определено оптимальное значение pO_2 в среде (30-50%).

4. Проведен процесс масштабирования культивирования штамма *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D в биореакторе объемом 1000 л, что подтверждает возможность применения разработанной технологии получения биомассы и биосинтеза мевастатина в промышленном масштабе.

5. Установлено противогрибное действие сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D по отношению к тест-культурам (*F. oxysporum*, *A. solani*, *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*). На 7 сутки эксперимента противогрибное действие сухой биомассы, внесенной в ростовую среду в количестве 1 г/л, находилось в пределах 48,3 – 65%.

6. Показан аддитивный фунгицидный эффект при применении комбинации сухой биомассы *P. chrysogenum* ВКМ F-4876D и химических фунгицидов – азоксистробина, пропиконазола, тебуконазола и Аканто Плюс.

Культивирование *P. chrysogenum* в режиме регистрации основных параметров было выполнено в ферментационной установке объемом 15 л. Была показана зависимость накопления грибной биомассы и мевастатина от уровня pH среды и степень ее насыщения кислородом. Подобранные условия ферментации *P. chrysogenum* в 15 л ферментационной установке (значение pH, pO_2) позволили далее провести масштабирование процесса и выполнить культивирование штамма в биореакторах, объем которых соответствовал 100 л и 1000 л. Также была подготовлена соответствующая техническая документация, необходимая для успешного проведения процесса ферментации *P. chrysogenum*.

Полученные данные отражают высокий потенциал разработки эффективного и экологически безопасного биопрепарата, который может быть использован в интегрированных системах защиты растений от фитопатогенов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи, опубликованные в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных:

1. **Hatem, Amjad.** Inhibition of the growth and development of potato early blight pathogen (*Alternaria solani*) by combining *Penicillium chrysogenum* VKM F-4876D with some Strobilurin-, Triazole-, and Phenylpyrrole-based fungicides / **Amjad Hatem**, N. Karpova, V. Yaderets, E. Glagoleva, K. Petrova, A. Shibaeva, A. Ovchinnikov, V. Dzhavakhiya // Agriculture. – 2022. – Т. 12. – №. 9. – С. 1488. <https://www.mdpi.com/2077-0472/12/9/1488>.doi: 10.3390/agriculture12091488.

2. **Hatem, Amjad.** Inhibition of the Growth of *Botrytis cinerea* by *Penicillium chrysogenum* VKM F-4876D Combined with Fludioxonil-, Difenconazole-, or Tebuconazole-Based Fungicides/ **Amjad Hatem**, V. Yaderets, N. Karpova, E. Glagoleva, A. Ovchinnikov, K. Petrova, A. Shibaeva, V. Dzhavakhiya // Agronomy. – 2023. – Т. 13. – №. 10. – С. 2602. DOI:[10.3390/agronomy13102602/](https://doi.org/10.3390/agronomy13102602).

Работы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях:

3. **Hatem, Amjad.** Problems of waste management in Russia from the perspective of industrial microbiology / **Amjad Hatem**, I.P. Gotovtseva // Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 160-летию В.А. Михельсона: сб.см.- Москва: РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева, 2020.- С. 448-452.

4. **Хатем, Амжад.** Характер взаимоотношений между *Trametes hirsuta* и *Bacillus subtilis*/ **Амжад Хатем**//Материалы Всероссийской с международным участием научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 155-летию со дня рождения Н.Н. Худякова. сб.см.- Москва: РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева, 2021.- С. 432-434.

5. **Хатем, Амжад.** Характер взаимоотношений между *Trametes hirsuta* и *Bacillus amyloliquefaciens* /**Амжад Хатем**// Студенческая наука как ресурс инновационного потенциала развития. сб.см.- Воронеж: Воронежский государственный университет,2021. - С. 117-119.

6. **Хатем, Амжад.** Подбор источника азота для культивирования штамма *Penicillium chrysogenum* VKM F-4876D в ферментационной установке с целью увеличения синтеза вторичных метаболитов – перспективных агентов для создания на их основе биофунгицидов /**Амжад Хатем**// Студенческая наука как ресурс инновационного потенциала развития. сб.см.- Воронеж: Воронежский государственный университет, 2022 – 214 с.

7. **Хатем, Амжад.** Получение сухой биомассы *Penicillium chrysogenum* VKM f-4876 d и изучение ее противогрибного действия по отношению к возбудителям фузариоза/ **Амжад Хатем**, Н. В. Карпова, В. В. Джавахия// АГРАРНАЯ НАУКА-2022 : сб.см.- Москва: РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева, 2022.-С. 1599-1602.

8. **Хатем, Амжад.** Оптимизация питательной среды для выращивания штамма *penicillium chrysogenum* VKM F-4876D /**Амжад Хатем**// Всероссийский круглый стол «Фундаментальные и прикладные аспекты микробиологии», посвященный 150-летию со дня рождения В.С. Буткевича: сб.см.- Москва: РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева, 2022.

9. **Хатем, Амжад.** Оценка противогрибной активности биомассы штамма *Penicillium chrysogenum* VKM F-4876 D по отношению к возбудителям альтернариоза / **Амжад Хатем**, А. Н. Смирнов, В. В. Джавахия и др. // Достижения науки и техники АПК. 2023. Т. 37. №. С. doi: 10.53859/02352451_2023_37_0_0.

10. **Hatem, Amjad.** Obtaining biomass of *Penicillium chrysogenum* strain VKM F-4876 D by biotechnological means and studying its effect on pathogens of agricultural plants /**Amjad Hatem**// International youth forum «Russia-Africa: nuclear education-potential for successful development» 2023.