

На правах рукописи



Хомяк Анна Игоревна

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОЗДАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НОВЫХ
ЛАБОРАТОРНЫХ ОБРАЗЦОВ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ
БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПШЕНИЦЫ ОЗИМОЙ ОТ
ФУЗАРИОЗНОЙ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ**

4.1.3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Краснодар – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр биологической защиты растений»

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Асатурова Анжела Михайловна

Официальные оппоненты: **Глазунова Наталья Николаевна,**
доктор сельскохозяйственных наук, доцент,
ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», кафедра защиты растений, экологии и химии, профессор

Пахолкова Елена Васильевна,
кандидат биологических наук, ФГБНУ
«Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии», отдел микологии и иммунитета, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»

Защита диссертации состоится «05» мая 2026 года в 10⁰⁰ на заседании диссертационного совета 35.2.019.09 на базе ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина», по адресу: 350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13, главный корпус, аудитория 106.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке университета и на сайтах ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина» – www.kubsau.ru и ВАК – <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2026 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор сельскохозяйственных наук

 Гуторова Оксана Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Среднемировой уровень потерь урожая сельскохозяйственных растений вследствие поражения фитопатогенными микроорганизмами оценивается на сегодняшний день в 12 %. Среди различных патогенов, вызывающих корневые гнили зерновых культур, наиболее распространенными являются грибы р. *Fusarium*. Заражение грибами р. *Fusarium* представляет серьезную угрозу глобальной продовольственной безопасности [Prevalence of wheat associated *Bacillus*...., 2022; Костерина Н. А., 2023]. В России потери урожая пшеницы озимой вследствие поражения корневыми гнилями фузариозной этиологии составляют до 30 % [Ассоциированные с пшеницей микромицеты...., 2022]. Последние 50 лет наиболее распространенным методом борьбы с корневыми гнилями является широкое использование химических фунгицидов. Однако, они оказывают неблагоприятное воздействие на воду, здоровье почвы, качество продукции, а также способствуют развитию устойчивости у патогенов к их действующим веществам и образованию токсичных остатков в продуктах питания и кормах [Samada L. H., Tambunan U. S. F., 2020; Сафроновская Г., 2021; Fenibo E.O., Ijoma G.N., Matambo T., 2022]. Альтернативой химическим пестицидам являются биопрепараты на основе микроорганизмов-антагонистов. Они экологичны, не вызывают резистентности патогенов, их побочные продукты биоразлагаемы. Кроме того, они могут быть более эффективными, чем химические пестициды в долгосрочной перспективе [Status and Prospects of Botanical Biopesticides...., 2022].

В связи с этим, прогресс в производстве и применении биологических средств защиты растений, во многом связан с разработкой высокотехнологичных биопрепаратов с высоким титром микроорганизмов и комплексом метаболитов, активных в отношении широкого спектра патогенов [Mishra J., 2015; Improved shelf life of dried *Beauveria bassiana*..., 2016; Biopesticides and Biofertilizers...., 2019; Якименко М. В., Бегун С. А., Сорокина А. И., 2020].

Степень изученности темы. Исследование патентных документов и научных статей показало, что в настоящее время существует большой набор бактерий-антагонистов, которые могут послужить основой для биопрепаратов. Авторы изобретений и научных статей в своих работах широко освещают результаты исследований по антифунгальной активности биоагентов в отношении различных патогенов, по биологической эффективности и ростстимулирующему эффекту [Asaturova A.M., et al., 2012; Antimicrobial activity of *Bacillus circulans*...., 2014; Биопрепараты на основе бактерий...., 2016; Antifungal activity of lipopeptides...., 2018]. Однако вопросы технологии производства биопрепаратов и требования к их конечным характеристикам не столь проработаны [Microorganisms as biological control..., 2013; The challenges of introducing a new...., 2013; Research and development of biopesticides...., 2019].

Кроме того, многие авторы подчеркивают нестабильность защитного и стимулирующего действия биопрепаратов [Резанова Г. И., 2013; Табакова И. Д., Чухина О. В., 2015; Соболева О. М., 2018; Essiedu J. A., Adepoju F. O., Ivantsova M. N., 2020]. Одной из причин этого является недостаточное изучение биологических особенностей штаммов – продуцентов и отсутствие современных

стандартов и биотехнологий получения биопрепаратов для защиты растений в России.

Цель и задачи исследования.

Цель работы: биологическое обоснование создания и применения новых лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов бактерий рода *Bacillus* для защиты пшеницы озимой от фузариозной корневой гнили.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить влияние штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на рост и развитие растений пшеницы озимой.

2. Определить антифунгальную активность и количество колониеобразующих единиц в ЖК на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в зависимости от условий культивирования. На основании полученных данных разработать оптимизированные питательные среды для культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517.

3. Установить биологическую эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в зависимости от состава питательной среды на искусственном инфекционном фоне заражения *F. graminearum* BZR F-4.

4. Определить биологическую и хозяйственную эффективность применения лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336 g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении корневой гнили фузариозной этиологии пшеницы озимой в условиях мелкоделяночного опыта в центральной зоне Краснодарского края при применении путем предпосевной обработки семян в сочетании с опрыскиванием вегетирующих растений.

5. Оценить влияние коммерческих прилипателей на количество колониеобразующих единиц и антифунгальную активность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517.

Научная новизна. Впервые установлено влияние температуры, кислотности среды, источников питания и времени культивирования на количество колониеобразующих единиц и антифунгальную активность штаммов *B. subtilis* BZR 336 g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6. Определена антифунгальная активность и биологическая эффективность штаммов *B. subtilis* BZR 336 g и *B. subtilis* BZR 517 на растениях пшеницы озимой в зависимости от состава питательной среды на фоне искусственного заражения *F. graminearum* BZR F-4. Установлено положительное влияние на биологическую эффективность и сохраненный урожай при обработке семян и растений пшеницы озимой лабораторными образцами биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336 g и *B. subtilis* BZR 517 на фоне естественного поражения корневой гнилью фузариозной этиологии в условиях центральной зоны Краснодарского края. Получены новые знания о влиянии прилипателей на лабораторные образцы биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336 g и *B. subtilis* BZR 517.

Теоретическая значимость. Получены новые знания о физиолого-биохимических свойствах штаммов бактерий *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 из Биоресурсной коллекции ФГБНУ ФНЦБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» и влияния абиотических факторов на их

рост в процессе периодического культивирования. Выявлена зависимость антифунгальной активности в отношении грибов р. *Fusarium* и ростстимулирующего эффекта на растения пшеницы озимой штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 от условий культивирования.

Практическая значимость. Установлена перспективность использования штаммов бактерий *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 из БРК ФГБНУ ФНЦБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» в качестве основы для разработки новых биопрепаратов для защиты пшеницы озимой от корневых гнилей фузариозной этиологии.

Разработанные ТУ и лабораторные регламенты производства лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов бактерий *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 для защиты пшеницы озимой от корневых гнилей фузариозной этиологии, прошли апробацию в ООО «Биотехагро», что подтверждает возможность их промышленного производства.

Результаты исследований, полученные в рамках диссертационной работы, используются при реализации программ повышения квалификации «Организация производства продукции растениеводства по стандартам органического земледелия» и программы подготовки научных и научно-педагогических кадров в аспирантуре по научной специальности 4.1.3. «Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений» в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр биологической защиты растений», а также рекомендованы к использованию в качестве теоретического и практического материала для научных сотрудников, студентов и аспирантов по направлению подготовки «Агрономия» и «Биология».

Методология и методы исследований. Методологической и теоретической основой диссертационной работы являлись труды отечественных и зарубежных ученых. При выполнении работы использовали общепринятые микробиологические, фитопатологические и статистические методы исследований.

Положения, выносимые на защиту:

1. Новые штаммы *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517, обладающие положительным влиянием на всхожесть растений пшеницы озимой и высокой биологической эффективностью в отношении *F. graminearum* BZR F-4, перспективные для использования в качестве продуцентов биопрепаратов для защиты и сохранения урожайности пшеницы озимой.

2. Влияние условий культивирования на антифунгальную активность в отношении грибов р. *Fusarium* и количество колониеобразующих единиц в ЖК на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

3. Эффективность применения лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 против корневой гнили фузариозной этиологии в условиях полевого мелкоделяночного опыта экспериментальной базы ФГБНУ ФНЦБЗР.

4. Влияние коммерческих прилипателей на антифунгальную активность и титр лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Объективность и достоверность результатов подтверждена экспериментальными данными, полученными в лабораторных и полевых условиях с применением современных методов и их статистической обработкой.

Результаты исследований докладывались на X Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 120-летию И. С. Косенко, г. Краснодар, 26-30 ноября 2016 г; Международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2018, г. Уфа, 13-17 июня 2018 г.; IV Международной научной конференции «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки», г. Ялта, 9-13 сентября 2019; 9-й Международной научно-практической конференции «Защита растений от вредных организмов», г. Краснодар, 17-21 июня 2019 г.; Международной научно-практической конференции с элементами школы молодых ученых «Научные приоритеты адаптивной интенсификации сельскохозяйственного производства», г. Краснодар, пос. Белозерный, 3-5 июля 2019 г; XI Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты», г. Минск, р. Беларусь, 3-6 июня 2019 г; XI Международной научно-практической конференции «Защита растений от вредных организмов», г. Краснодар, 19-23 июня 2023 г.; Международном форуме «Агробиотехнологии: достижения и перспективы развития», г. Москва 28-31 августа 2023 г.; Международной конференции «Innovations in Sustainable Agriculture 4.0 ISAS-2025» г. Ставрополь, 10-11 апреля 2025 г.

Работа выполнена при финансовой поддержке: У.М.Н.И.К. № 6533ГУ/2015 от 08.06.2016, Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере; гранта РФФИ № 13-08-96533 р_юг и администрации Краснодарского края, 2013-2015 гг; гранта Кубанского научного фонда № НИП 20.1/22.9, 2022-2024 гг.

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них шесть – в изданиях, входящих в Перечень ВАК, три – в изданиях, индексируемых в международных базах данных научного цитирования Scopus и Web of Science. Получен патент РФ № 2621356 от 02.06.2017 г., получено свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022622985 от 21.11.2022 г.

Личный вклад соискателя. Автором проведен теоретический анализ научных источников информации по теме исследований, выбор объектов исследований, совместно с научным руководителем разработаны схемы опытов, проведены экспериментальные исследования и их анализ. Проведена статистическая обработка полученных данных и формирование выводов.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 164 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключений, практических рекомендаций, списка литературы, 8 приложений, содержит 19 таблиц, 25 рисунков. Список библиографических источников включает 255 наименования, в том числе 143 из иностранных источников.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю, канд. биол. наук, вед. научному сотруднику лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ФНЦБЗР Асатуровой А. М. за научно-методическое руководство и помощь в выполнении диссертационной работы, а также сотрудникам

лаборатории микробиологической защиты растений за оказанную помощь. За ценные советы и замечания – сотрудникам ФГБНУ ФНЦБЗР: канд. биол. наук Исмаилову В. Я., зам. директора по научной работе ФГБНУ ФНЦБЗР, к.с.-х.н. Томашевич Н.С., рук. отдела интеллектуальной собственности и инновационного развития, канд. с.-х. наук. Ермоленко С. А., менеджеру отдела интеллектуальной собственности и инновационного развития Олейниковой А.А., начальнику отдела аспирантуры Вертий Е. А., ученому секретарю Есауленко Е. А.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Рассмотрен вопрос разработки биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов в отношении возбудителей фузариозной корневой гнили в России и в мире. Проанализированы сведения по влиянию условий культивирования на эффективность штаммов-продуцентов биопрепаратов для защиты от фитопатогенных организмов. Обобщены данные по эффективности применения биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов в подавлении возбудителей болезней зерновых, технических и др. культур.

2. МЕСТО, ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в г. Краснодар на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр биологической защиты растений» (ФГБНУ ФНЦБЗР) в 2012-2023 гг.

Объектами исследования являлись штаммы *Bacillus subtilis* BZR 336 g и *Bacillus subtilis* BZR 517 из Биоресурсной коллекции ФГБНУ ФНЦБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов». Материалами исследования являлись тест-культуры фитопатогенных грибов: моноспорные штаммы *Fusarium graminearum* (Schwabe, 1839) BZR F-4, *F. graminearum* Schwabe BZR F-21 и *F. oxysporum* var. *orthoceras* (App. et Wr., 1955) BZR F-6, семена и растения пшеницы озимой сортов Батько, Калым и Таня селекции Национального центра зерна имени П.П. Лукьяненко. Предметом исследования являлась зависимость антифунгальной активности в отношении грибов р. *Fusarium* и количества колониеобразующих единиц ЖК штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 от условий культивирования; биологическая эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении болезней, вызванных грибами р. *Fusarium*; влияние коммерческих прилипателей на биологическую эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. graminearum* BZR F-4 на растениях пшеницы озимой.

2.1 Определение культурально-морфологических признаков штаммов бактерий-антагонистов

Культурально-морфологические признаки штаммов-продуцентов изучали на мясо-пептонном агаре (МПА) и картофельно-глюкозном агаре (КГА).

Морфологические признаки изучали с использованием микроскопа Axio Scope A1. [Лабораторный практикум. ..., 2004; Практикум по микробиологии. ..., 2005].

2.2 Определение ростстимулирующей активности штаммов бактерий-антагонистов

Бактериальную массу смывали с чашек Петри (ЧП) и разбавляли стерильной дистиллированной водой до объема 50 мл. Полученной суспензией обрабатывали семена пшеницы озимой. Далее осуществляли посев в стаканчики с песком (объемом 0,45 л). В одном варианте по 10 стаканчиков. В каждый стаканчик высевали по 30 семян и с момента появления всходов ежедневно производили учет проростков. Осуществляли измерение длины корня и побега каждого проростка. Массу корней и побегов определяли суммарно для всей повторности.

2.3 Определение оптимальных условий культивирования штаммов бактерий-антагонистов

Лабораторные исследования проводили на базе лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ФНЦБЗР. Жидкую культуру (ЖК) на основе штаммов бактерий получали методом периодического культивирования. Определяли оптимальные условия культивирования штаммов: источники углеродного и азотного питания, температуру, pH среды, сроки культивирования.

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли методом Коха [Практикум по микробиологии, 2005]. Совместимость определяли модифицированным методом диффузии в агар [Маслиенко Л.В., 1999]. Оценку антагонистической активности проводили методом двойных (встречных) культур [Ваксман З. А., 1947; Егоров Н.С., 1957]; антибиотическую активность – модифицированным методом последовательных разведений [Егоров Н.С., 2004; Optimization of laboratory cultivation conditions., 2020].

2.4 Выделение, хроматографический анализ, анализ антифунгальной активности бактериальных метаболитов

Анализ антифунгальной активности метаболитов проводили путем экстракции этилацетатом, восходящей тонкослойной хроматографии на хроматографических пластинах Kieselgel 60 фирмы Merck с УФ индикатором (толщина слоя 2 мм) и биоавтографии [Выделение и характеристика антигрибных метаболитов. ..., 2019].

2.5 Биологическая эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов бактерий-антагонистов на фоне искусственного заражения пшеницы озимой *F. graminearum* BZR F-4 в условиях климатической камеры

Биологическую эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов бактерий-антагонистов определяли на растениях пшеницы озимой сорт Батько на фоне искусственного заражения грибом *F. graminearum* BZR F-4 в условиях климатической камеры Binder KWWF 720 (Германия) (24 °С, 14000 люкс, влажность 65 %). Для приготовления инфекционного порошка чистую культуру *F. graminearum* BZR F-4 выращивали на стерильном зерне в

течение 10 дней. Инокулированное зерно измельчали при помощи лабораторной мельницы ИКА А 11 basic (Германия) до состояния однородного порошка. Песок смешивали с инфекционным порошком в соотношении 60:1 и насыпали в стаканы. Семена обрабатывали ЖК штаммов ручным способом, расход рабочего раствора из расчета 10 л/т. В качестве химического эталона использовали фунгицид Кинто Дуо, КС (тритиконазол 20 г/л + прохлораз 60 г/л), 2,5 л/т, в качестве биологического эталона – биопрепарат Фитоспорин – М, Ж (*B. subtilis*, 26Д), 1,0 л/т. Обработанные семена высевали в стаканы по 30 шт. Учет поражения корневой гнилью и расчёт биологической эффективности осуществляли согласно методическим указаниям по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве [Методические указания..., 2009].

2.6 Эффективность применения лабораторных образцов биопрепаратов на фоне естественного поражения корневой гнилью фузариозной этиологии в условиях полевого мелкоделяночного опыта

Полевые испытания проводили в 2012-2015 гг. на экспериментальной базе ФГБНУ ФНЦБЗР согласно методике полевого опыта [Доспехов, Б. А., 2011]. Среднегодовая температура составляла от +13,2 до +13,9° С, низкие показатели температур были отмечены в декабре-феврале, высокие – в июне и июле. Суммарное количество осадков за год составляло от 175 до 791 мм, количество дней с выпавшими осадками – от 16 до 159. Среднегодовая влажность воздуха составляла от 64,0 до 67,0 %. Средняя температура вегетационного периода от +11,1 до +12,3° С, суммарное количество осадков – 541,1-690,4 мм, влажность воздуха 66,1-67,3 %.

В качестве химического эталона использовали Раксил, КС (тебуконазол 60 г/л), 0,5 л/т, в качестве биологического эталона – Фитоспорин - М, Ж (*B. subtilis* 26 Д), 1,0 л/т. Норма применения лабораторного образца биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 336 г 3,0 л/т, на основе штамма *B. subtilis* BZR 517 – 2,0 л/т [Эффективность инокуляции семян..., 2019]. Посев осуществляли спустя сутки после обработки с помощью механической сеялки СЗ-3,6. Площадь одной делянки составляла 25 м², норма высева – 5 млн. всхожих семян на 1 га, ширина междурядья – 15 см. Предшественник люцерна. В течение вегетации осуществляли две профилактические обработки. В качестве химического эталона использовали Альто Супер, КС (пропиконазол + ципроконазол, 250 + 80 г/л), 0,5 л/га. Норма расхода рабочей жидкости составляла 300 л/га. Учет динамики развития заболеваний вели согласно методическим указаниям по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве [Методические указания..., 2009]. Биологическую эффективность против корневой гнили фузариозной этиологии оценивали в динамике в фазу кущения осенью (Z 20-21) и весной (Z 26-29), в фазу выхода в трубку (Z 32-35), цветения (Z 61-69) и созревания (Z 73-77). Биологическую эффективность рассчитывали по формуле Эббота. Массу 1000 зерен определяли по ГОСТ 12042-80.

2.7 Оценка влияния коммерческих прилипателей на эффективность лабораторных образцов биопрепаратов с целью создания комплексной системы защиты растений от корневых гнилей фузариозной этиологии

Для оценки влияния коммерческих прилипателей были протестированы следующие продукты: Адью, Ж (этоксилат изодецилового спирта), Липосам, Г (композиция биополимеров природного происхождения с прилипающими свойствами), Хайгер, Ж (этоксилат изодецилового спирта), Сильвет Голд, Ж (трисилоксан алкоксилат), Панэм, Ж (ксилаты жирных кислот), Полидон Бонд, Ж (композиция органосилоксоновых ПАВ и алкоксилатов).

Повторность во всех опытах трехкратная. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием многогрангового теста Дункана в среде программы STATISTICA 13.2.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Культурально-морфологические признаки и идентификация штаммов бактерий-антагонистов

Клетки палочковидные с закругленными концами, одиночные или соединены попарно, клетки подвижны. Размеры клеток у штамма *B. subtilis* BZR 336g 0,46-0,75 x 1,42-1,92 мкм, у штамма *B. subtilis* BZR 517 – 0,49-0,76 x 2,07-3,30 мкм. Имеются споры. Окраска по Граму положительная. В результате секвенирования фрагментов участков вариантов гена 16S РНК исследуемые штаммы отнесены к виду *B. subtilis*.

3.2 Ростстимулирующая активность штаммов бактерий-антагонистов

Влияние на рост и развитие пшеницы озимой проводили в динамике. Применение штамма *B. subtilis* BZR 336g способствовало увеличению длины побега до 15,5 %, длины корня до 26,7 %, массы побега до 6,2 %, массы корня до 48,8 %, а применение штамма *B. subtilis* BZR 517 способствовало увеличению длины побега до 14,8 %, длины корня до 37,3 %, массы побега до 18,6 %, массы корня до 23,8 % по сравнению с контролем без обработки. Установлено, что обработка семян пшеницы озимой суспензией штаммов оказывает большее влияние на развитие корней, чем побегов. Таким образом, установлена способность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 оказывать ростстимулирующее действие в отношении растений пшеницы озимой.

3.3 Оптимизация условий культивирования штаммов бактерий-антагонистов и разработка состава питательной среды для получения лабораторных образцов биопрепаратов на их основе

Определены следующие условия культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517: источники углеродного питания, источники азотного питания, температура, кислотность среды, время культивирования (таблица 1). Наибольшее количество клеток в ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g отмечалось на среде, где в качестве источника углерода была использована меласса: $(4,0 \pm 0,14) \times 10^7$ КОЕ/мл. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 среда с добавлением мелассы также была наиболее оптимальной для роста, титр ЖК составил $(1,3 \pm 0,09) \times 10^7$ КОЕ/мл.

Таблица 1 – Влияние источников питания и условий культивирования на рост штаммов бактерий-антагонистов (периодическое культивирование), ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013 г.

Вариант	Титр ЖК, КОЕ/мл	
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g	<i>B. subtilis</i> BZR 517
источник углеродного питания		
глюкоза	$(1,4 \pm 0,08) \times 10^6$ ^a	$(1,5 \pm 0,07) \times 10^6$ ^a
сахароза	$(2,7 \pm 0,13) \times 10^6$ ^b	$(2,7 \pm 0,07) \times 10^5$ ^b
меласса	$(4,0 \pm 0,14) \times 10^7$ ^c	$(1,3 \pm 0,09) \times 10^7$ ^c
глицерин	$(1,8 \pm 0,6) \times 10^6$ ^a	$(8,7 \pm 0,4) \times 10^5$ ^a
источник азотного питания		
пептон	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^7$ ^a	$(1,1 \pm 0,08) \times 10^8$ ^c
NaNO ₃	$(6,7 \pm 0,1) \times 10^6$ ^b	$(4,4 \pm 0,26) \times 10^6$ ^a
дрожжевой экстракт	$(1,5 \pm 0,28) \times 10^7$ ^a	$(8,3 \pm 0,14) \times 10^7$ ^b
кукурузный экстракт	$(7,1 \pm 0,4) \times 10^7$ ^a	$(1,1 \pm 0,05) \times 10^8$ ^c
температура, °С		
20,0	$(1,7 \pm 0,07) \times 10^9$ ^a	$(6,6 \pm 0,3) \times 10^6$ ^b
25,0	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^9$ ^a	$(2,1 \pm 0,09) \times 10^8$ ^a
30,0	$(1,6 \pm 0,03) \times 10^8$ ^b	$(8,9 \pm 0,4) \times 10^8$ ^c
35,0	$(5,7 \pm 0,07) \times 10^8$ ^c	$(1,8 \pm 0,26) \times 10^8$ ^a
рН		
3,0	$(3,5 \pm 0,4) \times 10^8$ ^b	$(5,8 \pm 0,1) \times 10^7$ ^b
6,0	$(7,3 \pm 0,4) \times 10^8$ ^a	$(9,8 \pm 0,2) \times 10^8$ ^a
8,0	$(2,7 \pm 0,07) \times 10^9$ ^c	$(9,9 \pm 0,2) \times 10^8$ ^a
10,0	$(7,1 \pm 0,09) \times 10^8$ ^a	$(6,9 \pm 0,2) \times 10^8$ ^c
Примечание: между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов по каждому условию нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности		

Высокий титр ЖК в варианте со штаммом *B. subtilis* BZR 336g был отмечен на питательной среде, где в качестве источника азота использовались пептон, дрожжевой и кукурузный экстракты: $(1,8 \pm 0,1) \times 10^7$, $(1,5 \pm 0,28) \times 10^7$ и $(7,1 \pm 0,4) \times 10^7$ КОЕ/мл соответственно. При наработке ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 517 максимальный титр был отмечен на средах с пептоном и кукурузным экстрактом: $(1,1 \pm 0,08) \times 10^8$ и $(1,1 \pm 0,05) \times 10^8$ КОЕ/мл соответственно.

Установлено, что для штамма *B. subtilis* BZR 336g оптимальной является температура культивирования 20,0 и 25,0 °С: $(1,7 \pm 0,07) \times 10^9$ и $(1,6 \pm 0,2) \times 10^9$ КОЕ/мл соответственно. Высокий титр ЖК штамма *B. subtilis* BZR 517 отмечен при температуре 30,0 °С: $(8,9 \pm 0,4) \times 10^8$ КОЕ/мл.

Отмечено, что титр клеток, равный $(2,7 \pm 0,07) \times 10^9$ КОЕ/мл, в сочетании с антифунгальной активностью на уровне 23,2 % отмечен при рН 8,0 для штамма *B. subtilis* BZR 336g. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 высокие значения титра $(9,8 \pm 0,2) \times 10^8$ и $(9,9 \pm 0,2) \times 10^8$ КОЕ/мл в сочетании с максимальной антифунгальной активностью (47,5 % и 41,8 % соответственно) отмечены при рН 6,0 и 8,0.

Установлено влияние условий культивирования на антибиотическую активность штаммов (таблица 2). Для обоих штаммов максимальное ингибирование *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 отмечено на среде с добавлением мелассы: 9,8 % для штамма *B. subtilis* BZR 336g и 8,8 % для штамма *B. subtilis* BZR 517. Существенное ингибирование *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 отмечено на среде с добавлением

дрожжевого и кукурузного экстрактов для штамма *B. subtilis* BZR 336g (7,2 и 8,8 % соответственно) и пептона для штамма *B. subtilis* BZR 517 (19,1 %). Интенсивное накопление антифунгальных веществ в среде зафиксировано при 20,0 и 25,0° С для штамма *B. subtilis* BZR 336g (33,3 % и 32,1 % соответственно) и при 25,0 и 30,0° С для штамма *B. subtilis* BZR 517 (24,4 % и 25,9 % соответственно). Для штамма *B. subtilis* BZR 336g при повышении температуры культивирования накопление антифунгальных метаболитов снижалось в 2-3 раза. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 отмечена обратная закономерность: понижение температуры приводило к существенному снижению антибиотической активности (до 8,7 %).

Таблица 2 – Антибиотическая активность штаммов бактерий-антагонистов в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от источников питания и условий культивирования (периодическое культивирование), ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013 г.

Вариант	Ингибирование патогена, %, сут.							
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g				<i>B. subtilis</i> BZR 517			
	1	2	3	4	1	2	3	4
источник углеродного питания								
глюкоза	5,1 ^{bc}	5,0 ^{ab}	6,6 ^a	8,0 ^a	3,3 ^a	5,1 ^{ab}	7,1 ^b	4,5 ^c
сахароза	8,7 ^{ab}	4,1 ^a	4,0 ^b	6,7 ^b	7,2 ^b	6,4 ^a	6,4 ^c	8,0 ^a
меласса	9,8 ^a	6,9 ^b	7,6 ^a	7,6 ^a	8,7 ^b	7,1 ^c	8,8 ^a	6,6 ^{ab}
глицерин	4,7 ^c	2,6 ^c	4,3 ^b	5,5 ^b	4,0 ^a	3,3 ^b	4,8 ^d	6,5 ^b
источник азотного питания								
пептон	3,0 ^a	6,9 ^a	3,2 ^a	2,5 ^a	17,4 ^c	19,1 ^b	19,0 ^c	18,4 ^c
NaNO ₃	2,6 ^a	6,9 ^a	5,1 ^b	2,6 ^a	5,7 ^a	8,8 ^a	4,2 ^a	1,3 ^a
дрожжевой экстракт	7,2 ^b	6,6 ^a	5,4 ^b	3,3 ^a	11,4 ^b	8,8 ^a	10,0 ^b	8,4 ^b
кукурузный экстракт	8,3 ^b	8,8 ^a	5,7 ^b	1,4 ^a	5,3 ^a	6,9 ^a	6,7 ^a	2,8 ^a
температура, °С								
20,0	25,2 ^b	32,0 ^b	33,3 ^b	32,7 ^b	8,7 ^b	10,1 ^a	8,9 ^b	8,9 ^b
25,0	24,8 ^d	29,7 ^b	31,4 ^b	32,1 ^b	18,5 ^a	24,4 ^b	24,0 ^a	23,8 ^a
30,0	11,0 ^a	13,3 ^a	11,9 ^a	10,3 ^a	18,1 ^a	25,2 ^b	25,0 ^a	25,9 ^a
35,0	11,8 ^a	10,8 ^a	7,6 ^a	8,3 ^a	17,7 ^a	17,3 ^a	17,2 ^{ab}	18,8 ^{ab}
рН								
3,0	0,4 ^a	0 ^b	0 ^a	0 ^a	1,1 ^a	0 ^a	1,5 ^c	0 ^a
6,0	2,9 ^a	1,9 ^c	4,9 ^b	0,3 ^a	33,7 ^d	40,1 ^d	47,5 ^b	41,9 ^d
8,0	23,2 ^b	17,1 ^a	22,6 ^d	22,4 ^c	26,7 ^c	33,1 ^c	41,8 ^{ab}	34,1 ^c
10,0	19,2 ^b	16,1 ^a	19,8 ^c	16,2 ^b	20,7 ^b	23,3 ^b	28,8 ^a	20,2 ^b
Примечание: между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов по каждому условию нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности								

Установлено, что максимальное накопление метаболитов, оказывающих выраженный фунгицидный эффект, происходило при рН 8,0 и 10,0 для штамма *B. subtilis* BZR 336g и рН 6,0; 8,0 и 10,0 для штамма *B. subtilis* BZR 517.

Максимальный титр был зафиксирован в период от 16-и до 36-и часов для штамма *B. subtilis* BZR 336g и от 16-и до 24-х часов для штамма *B. subtilis* BZR 517 и составил $(2,4 \pm 0,24) \times 10^9$ КОЕ/мл у штамма *B. subtilis* BZR 336g и $(1,4 \pm 0,01) \times 10^9$ КОЕ/мл у штамма *B. subtilis* BZR 517 (рисунок 1). Интенсивное накопление

антифунгальных веществ в среде начиналось с 16-ти часов культивирования штаммов. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 к 72-м часам инкубации наблюдалось существенное снижение антагонистической активности (таблица 3).

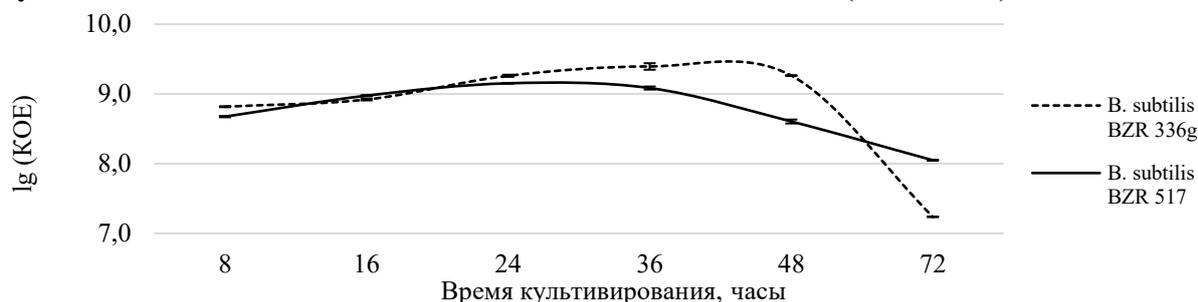


Рисунок 1 – Динамика роста штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 (периодическое культивирование)

Антибиотические вещества штамма *B. subtilis* BZR 336g вызывали более существенные морфологические изменения патогенного микромицета по сравнению с соединениями, продуцируемыми штаммом *B. subtilis* BZR 517.

Таблица 3 – Антибиотическая активность штаммов бактерий-антагонистов в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от времени культивирования (периодическое культивирование), ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013 г.

Время культивирования, ч	Ингибирование патогена, %, сутки							
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g				<i>B. subtilis</i> BZR 517			
	1	2	3	4	1	2	3	4
8	8,6 ^a	9,7 ^d	10,7 ^c	10,4 ^c	15,4 ^{bd}	10,6 ^{ab}	13,1 ^a	12,0 ^c
16	19,9 ^d	17,8 ^c	17,8 ^{ab}	18,8 ^b	8,9 ^{ac}	21,3 ^c	20,1 ^b	20,7 ^f
24	12,0 ^{ab}	12,8 ^a	14,9 ^{ad}	15,9 ^a	12,1 ^{ab}	13,5 ^b	16,6 ^d	17,0 ^e
36	16,4 ^{cd}	15,5 ^{abc}	18,6 ^d	15,4 ^a	18,7 ^d	18,5 ^c	20,4 ^b	15,2 ^d
48	15,1 ^{bc}	16,7 ^{bc}	17,3 ^{ab}	15,8 ^a	12,4 ^{ab}	8,7 ^a	10,9 ^a	10,0 ^b
72	12,2 ^{ab}	14,2 ^{ab}	12,7 ^{cd}	17,2 ^{ab}	7,3 ^c	3,2 ^d	4,1 ^c	3,6 ^a

Примечание: между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности

На основании исследований по подбору оптимальных условий культивирования была разработана оригинальная оптимизированная питательная среда (ОПС). В ее состав вошли: хлористый калий, магний серноокислый, калий фосфорнокислый, кукурузный экстракт, кальций углекислый, железо серноокислое, меласса.

Установлено, что количество КОЕ ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g на ОПС составило $(2,4 \pm 0,2) \times 10^9$ КОЕ/мл, *B. subtilis* BZR 517 – $(4,1 \pm 0,2) \times 10^8$ КОЕ/мл. Исследования антифунгальной активности штаммов в зависимости от состава питательной среды представлены в таблице 4.

Для штамма *B. subtilis* 336g максимальная антифунгальная активность отмечена на ОПС, тогда как на питательных средах КБ и КГА она была значительно ниже. Так, на ОПС антифунгальная активность составила от 76,0 до 90,0 %, на других средах – от 46,1 до 64,0%. Степень ингибирования *F.*

graminearum BZR F-4 под действием штамма *B. subtilis* 517 к десятым суткам увеличивалась на всех питательных средах, однако существенной разницы в случае штамма *B. subtilis* 336g, выявлено не было, антифунгальная активность на всех средах колебалась в диапазоне от 46,8 до 64,0 %.

Таблица 4 – Рост и антифунгальная активность штаммов бактерий-антагонистов в отношении *F. graminearum* BZR F-4 на различных питательных средах (периодическое культивирование), ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013 г.

Питательная среда	Титр ЖК, КОЕ/мл	Ингибирование мицелия патогена, %			
		инкубация, сутки			
		5	10	15	20
<i>B. subtilis</i> 336g					
КГА	$(1,1 \pm 0,03) \times 10^8$ ^b	60,1 ^c	64,0 ^b	59,2 ^b	53,5 ^b
КБ	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^6$ ^a	46,1 ^b	61,2 ^b	61,1 ^b	61,1 ^b
ОПС	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^9$ ^c	90,0 ^d	83,6 ^c	78,2 ^c	75,9 ^c
<i>B. subtilis</i> 517					
КГА	$(2,4 \pm 0,3) \times 10^6$ ^a	55,8 ^b	62,6 ^b	57,8 ^b	54,0 ^c
КБ	$(3,3 \pm 0,2) \times 10^6$ ^a	46,8 ^b	63,6 ^b	64,0 ^b	63,5 ^c
ОПС	$(4,1 \pm 0,2) \times 10^8$ ^b	51,8 ^b	61,1 ^b	59,1 ^b	49,8 ^b
Примечание: между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности					

Установлено, что состав питательной среды существенно влияет на накопление антифунгальных метаболитов. Продуцирование липопептида итурин отмечено у обоих штаммов, при этом для штамма *B. subtilis* BZR 517 оно было наиболее выражено на средах КГА и ОПС, в то время как для штамма *B. subtilis* BZR 336g только на ОПС. Синтез фенгицина штаммами *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 отмечен на среде КГА и ОПС. Синтез сурфактина отмечен только у штамма *B. subtilis* BZR 336g на среде КГА.

Таким образом установлено, что состав питательной среды значительно влияет на КОЕ и антифунгальную активность исследуемых штаммов в отношении *F. graminearum* BZR F-4.

3.4 Биологическая эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов бактерий-антагонистов на фоне искусственного заражения пшеницы озимой *F. graminearum* BZR F-4 в условиях климатической камеры в зависимости от состава питательной среды

Результаты исследования биологической эффективности лабораторных образцов на основе штаммов в отношении *F. graminearum* BZR F-4 представлены в таблице 5. Отмечено, что всхожесть в вариантах с применением ОПС была выше, чем в вариантах с применением стандартных сред и биологических эталонов: если применение эталонов обеспечило всхожесть растений на уровне 65,5-77,7 %, то при применении ЖК на основе ОПС всхожесть семян пшеницы озимой составила от 81,1 до 97,7 % при всхожести в контроле с инфекцией 58,8%. Установлено, что максимальный защитный эффект в вариантах опыта с применением ЖК на основе исследуемых штаммов был достоверно выше, чем в

биологическом эталоне и на уровне химического эталона. Так, применение ЖК на основе смеси штаммов с нормой применения 1,0 и 1,0 л/т обеспечивало достоверную биологическую эффективность до 41,1 % в то время как применение эталонов обеспечивало защитный эффект на уровне 28,9-38,9%.

Таблица 5 – Биологическая эффективность лабораторных образцов на основе штаммов бактерий-антагонистов, полученных с применением различных питательных сред, на фоне искусственного заражения растений пшеницы озимой грибом *F. graminearum* BZR F-4, климатическая камера, сорт Батько, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2014 г.

Вариант, норма применения, л/т	Всхожесть, %	БЭ, %*
Контроль без инфекции	97,6 ^b	
Контроль с инфекцией (обработка водой)	58,8 ^{ab}	68,4/ 100,0**
Кинто Дуо, КС, химический эталон, 2,5	77,7 ^{ab}	38,9 ^{bc}
Фитоспорин-М, Ж, биологический эталон, 2,0	65,5 ^{ab}	28,9 ^{ab}
Кинга Б		
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0	73,3 ^{ab}	26,9 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 517, 2,0	86,6 ^{ab}	37,1 ^{bc}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517 2,0	77,7 ^{ab}	30,1 ^b
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 2,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517 1,0	72,2 ^{ab}	21,5 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 1,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517 1,0	52,2 ^a	41,1 ^c
Картофельно-глюкозная среда		
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0	56,6 ^{ab}	31,3 ^{bc}
<i>B. subtilis</i> BZR 517, 2,0	87,7 ^{ab}	35,4 ^{bc}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517 2,0	82,2 ^{ab}	27,9 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 2,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517 1,0	75,5 ^{ab}	25,4 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 1,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517 1,0	90,0 ^{ab}	36,4 ^{bc}
ОПС		
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0	81,1 ^{ab}	24,7 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 517, 2,0	87,7 ^{ab}	37,0 ^{bc}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517 2,0	87,7 ^{ab}	25,4 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 2,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517 1,0	97,7 ^b	37,0 ^{bc}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 1,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517 1,0	94,4 ^b	35,1 ^{bc}
* - биологическую эффективность определяли по развитию болезни		
** - развитие (R, %) / распространенность (P, %) фузариозной корневой гнили		
-между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95 %-м уровне вероятности		

Обработка семян ЖК на основе монокультур штаммов и смеси ЖК штаммов на различных питательных средах показали статистически достоверное увеличение биометрических параметров проростков пшеницы озимой на фоне искусственного заражения *F. graminearum* BZR F-4. Отмечено, что для вариантов с применением ОПС характерно более интенсивное увеличение роста и развития надземных частей растений, более дружные и выровненные всходы.

Таким образом, установлено, что наработка лабораторных образцов биопрепаратов на ОПС обеспечивает высокую биологическую эффективность в отношении *F. graminearum* BZR F-4 на фоне искусственного заражения в сочетании с ростстимулирующим эффектом, что объясняется высоким содержанием антифунгальных метаболитов по сравнению со стандартными средами. На основании полученных данных по подбору оптимальных условий и

разработке ОПС были разработаны ТУ и лабораторные регламенты производства биопрепарата.

3.5 Разработка технических условий и лабораторных регламентов производства биопрепаратов на основе штаммов бактерий-антагонистов

В результате исследования условий культивирования и оптимизации питательной среды для культивирования штаммов-продуцентов биопрепаратов предложена схема получения комплексного биопрепаратов на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g и на основе штамма *B. subtilis* BZR 517, обладающего антифунгальной и ростстимулирующей активностью, послужившая основой для разработки научно-технической документации на биопрепарат, включающей ТУ и лабораторный регламент его производства. Детально проработаны и оформлены ТУ и лабораторные регламенты на каждый комплексный бактериальный биопрепарат.

3.6 Эффективность применения лабораторных образцов биопрепаратов на фоне естественного поражения корневой гнилью фузариозной этиологии в условиях полевого мелкоделяночного опыта

При испытании лабораторных образцов биопрепаратов в условиях полевого мелкоделяночного опыта обработку семян осуществляли перед посевом, вегетирующих растений – в фазу выхода в трубку (Z 32-35) и в фазу колошения (Z 50-59) (рисунок 2).

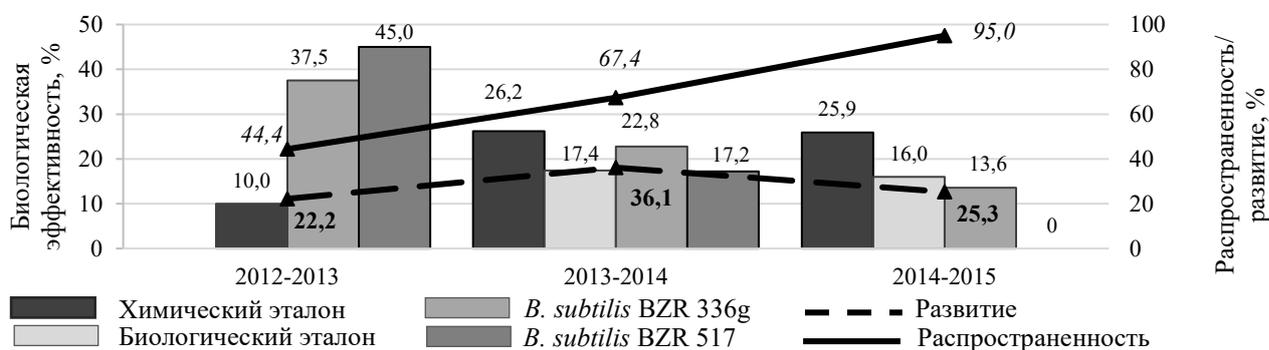


Рисунок 2 – Биологическая эффективность лабораторных образцов биопрепаратов против фузариозных корневых гнилей пшеницы озимой в условиях полевого мелкоделяночного опыта, сорт Калым, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2012-2015 гг.

2013 г. был теплым, с умеренным количеством осадков. Вследствие этого биологическая эффективность в вариантах с применением ЖК исследуемых штаммов составила от 37,5 до 45,0 %, что достоверно отличается от варианта с применением химического эталона – 10 %, при нулевой эффективности биологического эталона, на фоне развития в контроле фузариозной корневой гнили на уровне 22,2 %, распространенности – 44,4%. 2014 г. был умеренно дождливым с температурой воздуха близкой к норме, что способствовало развитию и распространенности фузариозной корневой гнили в контроле на уровне 36,1 и 67,4% соответственно г. Биологическая эффективность в вариантах

с применением микробных агентов колебалась от 17,2 до 22,8 % при биологической эффективности в варианте с применением химического эталона – 26,2 %, биологического – 17,4 %. Но следует обратить внимание, что достоверных различий установлено не было. Осень 2014 г. была холодной и дождливой, весна 2015 была ранней, холодной и с большим количеством осадков. Как следствие, развитие в контроле фузариозной корневой гнили составило 25,3 %, распространенность – 95,0 %. Биологическая эффективность в варианте с применением лабораторного образца на основе штамма *B. subtilis* 336g составила 13,6 %, биологического эталона – 16,0 %, химического эталона – 25,9 %. При этом, в варианте с применением лабораторного образца на основе штамма *B. subtilis* BZR 517 защитный эффект не отмечен

В ходе исследований отмечено достоверное увеличение массы 1000 зерен при применении лабораторных образцов на основе исследуемых штаммов, за исключением 2015 г., что, предположительно, связано с поздним посевом (таблица 6).

Таблица 6 – Хозяйственная эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на растениях пшеницы озимой в условиях полевого мелкоделяночного опыта, сорт Калым, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2012-2015 гг.

Вариант, норма применения, л/т	2012-2013 г.			2013-2014 г.			2014-2015 г.		
	Урожайность, т/га	Сохраненный урожай, т/га	Масса 1000 зерен, г	Урожайность, т/га	Сохраненный урожай, т/га	Масса 1000 зерен, г	Урожайность, т/га	Сохраненный урожай, т/га	Масса 1000 зерен, г
Контроль (обработка водой)	4,0 ^b	–	36,4 ^a	6,9 ^a	–	37,8 ^a	7,7 ^a	–	36,3 ^a
Химический эталон – Раксил, КС, 0,5	6,9 ^c	2,9	38,8 ^c	7,0 ^a	0,1	38,5 ^{ab}	8,3 ^b	0,6	36,3 ^a
Биологический эталон – Фитоспорин-М, Ж, 1,0	–	–	–	7,4 ^c	0,5	36,3 ^c	7,5 ^a	0	34,2 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0	7,9 ^a	3,9	37,9 ^{bc}	7,2 ^b	0,3	38,5 ^{ab}	7,9 ^{ab}	0,1	35,9 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 517, 2,0	7,9 ^a	3,9	36,5 ^{ab}	7,6 ^d	0,7	39,9 ^b	7,5 ^a	0	34,0 ^a

- во всех вариантах опыта предусмотрена предпосевная обработка семян в сочетании с обработкой по вегетации
- между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95 %-м уровне вероятности

Установлено, что в 2013 г. при применении лабораторных образцов биопрепаратов достоверный сохраненный урожай составил 3,9 т/га, у химического эталона – 2,9 т/га, при отсутствии сохраненного урожая у биологического эталона. В 2014 г. сохраненный урожай в вариантах с лабораторными образцами биопрепаратов составил 0,3-0,7 т/га, у химического эталона – 0,1 т/га, у биологического эталона – 0,5 т/га. В 2015 г. сохраненный урожай отмечен только в варианте с химическим эталоном – 0,6 т/га, тогда как достоверно сохраненного урожая в вариантах с лабораторными образцами биопрепаратов и биологическим эталоном не было, что, вероятно, обусловлено снижением биологической эффективности за счет позднего посева и неблагоприятными условиями для приживаемости штаммов.

Таким образом, обработка лабораторными образцами биопрепаратов при благоприятных погодных условиях способна обеспечивать биологическую эффективность в отношении корневых гнилей фузариозной этиологии на уровне 37,5-45,0 %, а также сохраненный урожай пшеницы озимой – до 3,9 т/га.

3.7 Оценка влияния коммерческих прилипателей на эффективность лабораторных образцов биопрепаратов с целью создания комплексной системы защиты растений от корневых гнилей фузариозной этиологии

Оценивали совместимость ЖК на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 совместно с прилипателями. В ходе исследований совместимости установлено, что прилипатель Панэм ингибировал рост штаммов и, как следствие, не был включен в дальнейшие исследования. Влияние прилипателя на титр ЖК исследуемых штаммов представлен на рисунке 3. Отмечено, что для штамма *B. subtilis* BZR 336g в варианте без добавления прилипателей титр отмечен на уровне $1,2 \times 10^8$ КОЕ/мл, в то время как применение прилипателя Сильвет Голд обеспечивало титр на уровне $2,1 \times 10^8$ КОЕ/мл. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 отмечена способность прилипателей Полидон Бонд и Липосам снижать количество колониеобразующих единиц с $2,7 \times 10^8$ до $2,0-2,1 \times 10^8$ КОЕ/мл.

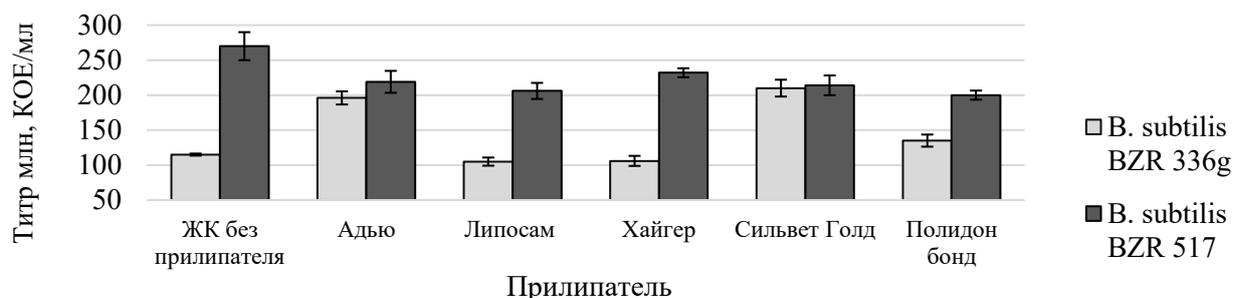


Рисунок 3 – Влияние прилипателей на КОЕ в одном мл лабораторного образца биопрепарата

Прилипатели способны снижать антифунгальную активность лабораторных образцов биопрепаратов (таблица 7). Так, для штамма *B. subtilis* BZR 336g в сочетании с прилипателями Липосам и Полидон Бонд отмечено снижение антифунгальной активности до уровня 47,0 % и 31,0 % соответственно. К десятым суткам инкубирования в варианте с применением прилипателя Полидон Бонд отмечено полное отсутствие антифунгальной активности. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 также отмечено снижение антифунгальной активности при применении прилипателя Полидон Бонд. Также отмечено статистически достоверное снижение антифунгальной активности при добавлении прилипателя Сильвет Голд с 57,4 до 40,7 %. В ходе исследований в вариантах с применением прилипателей были отмечены морфологические изменения мицелия: лизированный мицелий, «рваный» контур мицелия, нарастание мицелия на крышку ЧП и интенсивное образование желтого пигмента, что является реакцией мицелия *F. graminearum* на стресс

Таблица 7 – Антифунгальная активность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. graminearum* BZR F-4 в зависимости от прилипателя, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2023 г.

Вариант, норма применения, мл/т	Антифунгальная активность, %			
	инкубация, сутки			
	5	10	15	20
ЖК <i>B. subtilis</i> BZR 336g + прилипатель				
Адыо, Ж, 3	76,3 ^b	40,0 ^c	11,5 ^g	0,0 ^b
Липосам, Г, 6	47,0 ^c	42,8 ^c	29,8 ^f	20,1 ^d
Хайгер, Ж, 4,5	82,1 ^a	79,5 ^a	73,0 ^a	61,3 ^a
Сильвет Голд, Ж, 3	76,5 ^b	74,8 ^b	67,7 ^d	61,0 ^a
Полидон Бонд, Ж, 4,5	31,0 ^d	0,6 ^d	0,0 ^b	0,0 ^b
ЖК без прилипателя	79,3 ^{ab}	78,5 ^a	73,0 ^a	61,5 ^a
ЖК <i>B. subtilis</i> BZR 517 + прилипатель				
Адыо, Ж, 3	74,0 ^a	73,8 ^a	66,5 ^a	60,1 ^a
Липосам, Г, 6	72,5 ^a	76,3 ^a	70,4 ^a	62,9 ^a
Хайгер, Ж, 4,5	72,8 ^a	75,1 ^a	68,7 ^a	61,3 ^a
Сильвет Голд, Ж, 3	57,4 ^c	55,9 ^c	48,1 ^c	40,7 ^c
Полидон Бонд, Ж, 4,5	36,7 ^b	22,0 ^b	0 ^b	0 ^b
ЖК без прилипателя	75,9 ^a	64,6 ^a	58,5 ^a	50,3 ^a
Примечание: между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов для каждого штамма нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности				
Статистическая значимость рассчитана косвенно по росту мицелия <i>F. graminearum</i> BZR F-4				

Оценка применения лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 совместно с прилипателями была осуществлена на фоне искусственного заражения *F. graminearum* BZR F-21 в условиях климатической камеры (таблица 8). Применение лабораторного образца биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 517 в сочетании с прилипателем Хайгер обеспечило максимальный статистически достоверный защитный эффект на уровне 60,9 %. Применение прилипателя Сильвет Голд совместно с лабораторным образцом на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g обеспечило биологическую эффективность, статистически не отличающуюся от лабораторного образца штамма без прилипателя (13,5%). Отсутствие защитного действия у лабораторного образца на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g отмечено в вариантах с применением в качестве прилипателей Адыо, Липосам и Полидон Бонд, у лабораторного образца на основе штамма *B. subtilis* BZR 517 – с Сильвет Голд и Полидон Бонд. Были оценены биометрические показатели растений пшеницы озимой, обработанных ЖК на основе исследуемых штаммов совместно с прилипателями. Применение прилипателей Липосам и Полидон Бонд в сочетании с лабораторным образцом биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g обеспечивало статистически достоверную прибавку длины побега от 35,9 до 36,8 % по сравнению с лабораторным образцом без прилипателя.

Таблица 8 – Биологическая эффективность лабораторных образцов биопрепаратов в составе с различными прилипателями на фоне искусственного заражения растений пшеницы озимой грибом *F. graminearum* BZR F-21, климатическая камера, сорт Таня, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2023 г.

Вариант, норма применения, мл/т	Всхожесть, %	Биологическая эффективность, %*
ЖК <i>B. subtilis</i> BZR 336g + прилипатель		
Контроль без инфекции	100 ^c	-
Контроль с инфекцией**	62,0 ^a	58,9/100
Адьо, Ж, 3	51,7 ^{ab}	0 ^a
Липосам, Г, 6	43,3 ^b	0 ^a
Хайгер, Ж, 4,5	53,3 ^{ab}	15,2 ^b
Сильвет Голд, Ж, 3	48,3 ^{ab}	13,5 ^b
Полидон Бонд, Ж 4,5	53,3 ^{ab}	0 ^a
ЖК без прилипателя	63,0 ^a	15,3 ^b
ЖК <i>B. subtilis</i> BZR 517 + прилипатель		
Контроль без инфекции	84,4 ^a	-
Контроль с инфекцией	82,2 ^a	26,7/97
Адьо, Ж, 3	86,7 ^a	12,6 ^a
Липосам, Г, 6	98,9 ^a	17,7 ^a
Хайгер, Ж, 4,5	90,0 ^a	60,9 ^c
Сильвет Голд, Ж, 3	84,4 ^a	0 ^{ab}
Полидон Бонд, Ж4,5	88,9 ^a	0 ^b
ЖК без прилипателя	91,1 ^a	19,4 ^a
Примечание:		
* - биологическую эффективность определяли по развитию болезни		
** - развитие (R, %) / распространенность (P, %) фузариозной корневой гнили		
между вариантами для каждого штамма, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности		

Таким образом, для совместного применения с лабораторным образцом на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g отобраны прилипатели Сильвет Голд и Хайгер, для штамма *B. subtilis* BZR 517 – Хайгер и Адью.

ЗАКЛЮЧЕНИЯ

1. Установлена способность штаммов *B. subtilis* BZR 336 g и *B. subtilis* BZR 517 стимулировать рост растений пшеницы озимой. Применение штаммов способствовало увеличению длины побега на 2,4-15,5 %, длины корня на 11,5-37,3 %, массы побега на 5,5-18,6 %, массы корня на 7,7-48,8 % по сравнению с контролем.

2. Выявлено, что максимальное количество колониеобразующих единиц в сочетании с высокой антифунгальной активностью в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 для обоих штаммов зафиксировано на среде с мелассой в качестве источника углерода, пептоном и кукурузным экстрактом в качестве источника азота. Оптимальная температура культивирования для штамма *B. subtilis* BZR 336g – 20,0 и 25,0°C, штамма *B. subtilis* BZR 517 – 30,0°C. Оптимум pH для штамма *B. subtilis* BZR 336g составил 8,0, для штамма *B. subtilis* BZR 517 – 6,0 и 8,0. Выявлено оптимальное время культивирования: для *B. subtilis* BZR 336g 36-48 ч, для *B. subtilis* BZR 517– 24-36 ч. На основании

полученных данных разработаны ОПС для получения лабораторных образцов биопрепаратов, разработаны ТУ и лабораторные регламенты производства лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов бактерий *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517.

3. Определена биологическая эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в зависимости от состава питательной среды на фоне искусственного заражения *F. graminearum* BZR F-4 (развитие болезни в контроле 68,4%): для штамма *B. subtilis* BZR 336g – 24,7%, для штамма *B. subtilis* BZR 517 – 37,0% при эффективности химического эталона 38,7%, биологического эталона – 28,9%.

4. Установлено, что предпосевная обработка семян и опрыскивание вегетирующих растений пшеницы озимой лабораторными образцами биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в условиях центральной зоны Краснодарского края обеспечили биологическую эффективность против корневой гнили фузариозной этиологии от 37,5 до 45,0 % на фоне развития болезни 22,2 %, распространенности – 44,4 %, величина сохраненного урожая составила до 3,9 т/га.

5. Выявлены прилипатели, которые не оказывают негативного влияния на антифунгальную активность и количество колониеобразующих единиц лабораторных образцов биопрепаратов для совместного применения: Сильвет Голд и Хайгер для *B. subtilis* BZR 336g, Хайгер и Адыю для *B. subtilis* BZR 517.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При создании новых отечественных биопрепаратов научно-исследовательскими учреждениями и коммерческими организациями для контроля фузариозной корневой гнили рекомендовать штаммы *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 из БРК ФГБНУ ФНЦБЗР. При оценке биологической эффективности штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 из БРК ФГБНУ ФНЦБЗР на растениях пшеницы озимой в отношении фузариозной корневой гнили рекомендуется применять их путем предпосевной обработки семян в сочетании с опрыскиванием вегетирующих растений в фазу выхода в трубку и в фазу колошения.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки Российской Федерации:

1. Штаммы бактерий из Биоресурсной коллекции ФГБНУ ФНЦБЗР, обладающие ростстимулирующей активностью в отношении растений озимой пшеницы / А.М. Асатулова, Н.С. Томашевич, В.М. Дубяга, Н.А. Жевнова, М.Д. Павлова, **А.И. Хомяк** // Достижения науки и техники АПК. – 2023. – Т. 37. – № 5. – С. 21-27 (4.1.3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений).

2. Подбор прилипателей для совместного применения с лабораторным образцом биопрепарата в сельском хозяйстве / **А. И. Хомяк**, Н. А. Жевнова, В.В. Аллахвердян, А.М Асатулова // Достижения науки и техники АПК. – 2023.

– Т. 37. – № 8. – С.53-58 (4.1.3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений).

3. **Хомяк, А.И.** Изучение антифунгальной активности штаммов *Bacillus subtilis* в процессе периодического культивирования / **А. И. Хомяк**, А. М. Асатунова, Т. М. Сидорова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2020. – Т. 16. – № 2. – С. 55-60.

4. **Хомяк, А. И.** Влияние состава питательной среды на рост и антифунгальную активность бактерий р. *Bacillus* – основы экспериментальных образцов биофунгицидов для экологизированной системы защиты растений / **А. И. Хомяк**, Н. А. Жевнова, А. М. Асатунова // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. – 2021. – Т. 35. – С. 61-73. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.35.61>

5. **Хомяк, А.И.** Составы биопестицидов для защиты сельскохозяйственных культур – современное состояние и перспективы (Обзор) / **А.И. Хомяк**, А.М. Асатунова // Юг России: экология, развитие. – 2024. – Т.19. – № 3. – С. 83-96. – DOI: 10.18470/1992-1098-2024-3-8

6. Эффективность применения новых биопрепаратов на основе штаммов бактерий *Bacillus subtilis* против фузариоза озимой пшеницы на фоне искусственного заражения / А. М. Асатунова, Н. А. Жевнова, **А. И. Хомяк**, Н. С. Томашевич, М. Д. Павлова, В. М. Дубяга, А. Е. Козицын, Т. М. // Наука Кубани. – 2016. – № 1. – С. 9-14.

Работы, опубликованные в изданиях, индексируемых в международных базах данных научного цитирования Scopus и Web of Science:

1. Выделение и характеристика антигрибных метаболитов штаммов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus subtilis* BZR 517 модифицированным методом биоавтографии / Т. М. Сидорова, А. М. Асатунова, **А. И. Хомяк**, Н. С. Томашевич // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т. 54, № 1. – С. 178-185. – DOI 10.15389/agrobiology.2019.1.178rus.

2. Optimization of laboratory cultivation conditions for the synthesis of antifungal metabolites by *Bacillus subtilis* strain / Т. М. Sidorova, А. М. Asaturova, **А. I. Homyak**, N. A. Zhevnova, M. V. Shternshis, N.S. Tomashevich // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2020. – Vol. 27. – № 7. – P. 1879-1885. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.05.002> (Q2)

3. Evaluation of *Bacillus velezensis* Biocontrol Potential against *Fusarium* Fungi on Winter Wheat strain / А. М. Asaturova, N. A. Zhevnova, N. S. Tomashevich Т. М. Sidorova, **А. I. Homyak**, V. M. Dubyaga, V. D. Nadykta, A. P. Zharikov, Yu. I. Kostyukevich, B. S. Tupertsev // Agronomy. – 2022. – №2. – 1956. <https://doi.org/10.3390/agronomy12081956> (Q1)

Свидетельства о государственной регистрации патентов и баз данных

1. Патент № 2621356 С1 Российская Федерация, МПК А01N 63/00 (2006.01) С12N 1/20 (2006.01). Биофунгицид для защиты сельскохозяйственных культур от болезней и повышения урожайности : № 2015151901 : заявлено 03.12.2015; опубликовано 02.06.2017 / А. М. Асатунова, Н. С. Томашевич, Н. А. Жевнова, **А. И. Хомяк**, В. М. Дубяга, М. Д. Павлова, А. Е. Козицын, Т. М. Сидорова; патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное

учреждение «Федеральный научный центр биологической защиты растений». – Текст: электронный. – URL:https://www.elibrary.ru/download/elibrary_38265315_13097817.pdf.

2. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022622985 Российская Федерация. Бактерии-антагонисты фитопатогенов из Биоресурсной коллекции «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» ФГБНУ ФНЦБЗР : №. 2022622612 : заявлено 24.10.2022 ; опубликовано 21.11.2022 / А. М. Асатулова, Н. А. Жевнова, В. М. Дубяга, Н. С. Томашевич, М. Д. Павлова, **А. И. Хомяк**, А. Е. Козицын, Н. М. Сидоров, М. М. Астахов; правообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологической защиты растений». – Текст:электронный. URL: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_49975395_52810647.PDF.

Публикации в других научных изданиях

1. **Хомяк, А. И.** Влияние прилипателей на свойства штамма *B. subtilis* BZR 336g – основы нового биофунгицида / А. И. Хомяк, Н. А. Жевнова, А. М. Асатулова // Защита растений от вредных организмов: Материалы XI международной научно-практической конференции, Краснодар, 19–23 июня 2023 г. – Т. 11. – Краснодар, 2023. – С. 413-414.

2. **Хомяк, А. И.** Оптимизация условий культивирования штаммов бактерий рода *Bacillus* – основы биофунгицидов для защиты сельскохозяйственных культур / А. И. Хомяк, А. М. Асатулова, Т. М. Сидорова // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки: Материалы IV международной научно-практической конференции, Ялта, 09–13 сентября 2019 г., 2019. – С. 291-292. <https://doi.org/10.33952/09.09.2019.145>.

3. **Хомяк, А. И.** Условия культивирования бактерий-антагонистов *Bacillus subtilis* – основы биопрепаратов для защиты растений / А. И. Хомяк, А. М. Асатулова // Материалы международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», 13-17 июня 2018 г., Уфа / отв. ред. И.А. Тихонович. – Уфа, 2018. – ISBN 978-5-6041302-1-6. – С. 244.

4. **Хомяк, А. И.** Оптимизация параметров выращивания новых бактерий рода *Bacillus* с целью разработки технологии производства биофунгицидов для защиты сельскохозяйственных культур / А. И. Хомяк, А. М. Асатулова, Т. М. Сидорова // Защита растений от вредных организмов : Материалы IX международной научно-практической конференции, Краснодар, 17–21 июня 2019 года. – Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, 2019. – С. 295-297.

5. **Хомяк, А. И.** Новые биофунгициды на основе штаммов бактерий р. *Bacillus* для экологизированной защиты озимой пшеницы и технология их производства / А. И. Хомяк, А. М. Асатулова // Научное обеспечение агропромышленного комплекса : Сборник статей по материалам X Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 120-летию И. С. Косенко, Краснодар, 26–30 ноября 2016 года / Отв. за вып. А. Г. Кощаев. – Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, 2017. – С. 1848-1849.

Хомяк Анна Игоревна

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОЗДАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НОВЫХ
ЛАБОРАТОРНЫХ ОБРАЗЦОВ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ
БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПШЕНИЦЫ ОЗИМОЙ ОТ
ФУЗАРИОЗНОЙ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать ____ . _____ 2026 г. Формат 60×84 1/16

Усл. печ. л. – 1,0. Тираж 100. Заказ № _____

Типография Кубанского государственного аграрного университета.
350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13