



Хомяк Анна Игоревна

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОЗДАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НОВЫХ
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 – 2025

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

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

Официальные оппоненты: **Торопова Елена Юрьевна**,
доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет», кафедра защиты растений, профессор

Насонов Андрей Иванович,
кандидат биологических наук, ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия», лаборатория биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов, заведующий

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

Защита состоится «01» апреля 2025 года в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета 35.2.019.06 при 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 «_____» _____ 2025 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор сельскохозяйственных
наук

 Гуторова Оксана Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Среднемировой уровень потерь урожая вследствие поражения сельскохозяйственных растений фитопатогенными микроорганизмами оценивается на сегодняшний день в 12 %. Среди различных патогенов, вызывающих корневые гнили зерновых культур, наиболее распространенными являются грибы р. *Fusarium*. Их заражение представляет серьезную угрозу глобальной продовольственной безопасности (Пикушова, Шадрина, Горьковенко и др., 2008; Mulk, Wahab, Yasmin et al., 2022). В России потери урожая пшеницы озимой вследствие поражения корневыми гнилями фузариозной этиологии составляют до 30 % (Ганнибал, Гагкаева, Гомжина и др., 2022). Последние 50 лет наиболее распространенным методом борьбы корневыми гнилями является широкое использование химических пестицидов. Однако они оказывают неблагоприятное воздействие на качество воды, здоровье почвы, качество продукции, а также способствуют развитию устойчивости у вредителей и образованию токсичных остатков в продуктах питания и кормах (Samada, Tambunan, 2020; Сафроновская, 2021; Fenibo, Ijoma, Matambo, 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 (Acheuk et al., 2022).

Необходимо учитывать, что действующим началом биопрепаратов являются живые клетки микроорганизмов. В связи с этим, прогресс в производстве и применении биологических средств защиты растений, во многом связан с разработкой высокотехнологичных биопрепаратов с высоким титром и комплексом метаболитов, активных в отношении широкого спектра патогенов (Mascarin, Jackson, Behle, 2016; Mishra, Dutta, Arora, 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, Dubyaga, Tomashevich et al., 2012; Abada, El-Hendawy, Osman, 2014; Штерншис, Беляев, Цветкова, 2016; Toral, Rodríguez, Véjar et al., 2018). Однако вопросы технологии производства биопрепаратов и требования к их конечным характеристикам не столь проработаны (Köhl, Postma, Nicot et al., 2011; Trejo, Serrano-Carreón, Patiño et al., 2013; Wachowska, Kucharska, Jędryczka et al., 2013; Ndolo et al., 2019). Если за рубежом появляется все большее число публикаций, касающихся разработки новых микробиологических препаратов для защиты растений, то в современной российской научной литературе таких публикаций крайне мало (Бурова, 2012; Леонтьева, Кузина, Логинов, 2013; Холод, 2014; Четвериков, Асабина, Логинов, 2016).

Многие авторы подчеркивают узкий спектр действия биопрепаратов и нестабильность защитного и стимулирующего действия (Митина, Резвякова, 2012;

Резанова, 2013; Табакова, Чухина, 2015; Соболева, 2018; Essiedu, Adepoju, Ivantsova, 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 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 оптимизированную питательную среду для культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517.

3. Установить биологическую эффективность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении грибов р. *Fusarium* в зависимости от состава питательной среды для культивирования бактерий.

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 центральной зоны 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 при различных условиях культивирования.

Практическая значимость.

Разработанные ТУ и лабораторные регламенты производства биопрепаратов на основе штаммов бактерий *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 из БРК ФГБНУ ФНЦБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» для защиты пшеницы озимой от болезней, вызванных фузариозными корневыми гнилями, прошли апробацию в ООО «Биотехагро», что подтверждает возможность их промышленного производства.

Высокая биологическая эффективность в отношении фузариозных корневых гнилей в сочетании с сохраненным урожаем до 3,9 т/га позволяет рекомендовать биопрепараты на основе штаммов бактерий *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 для применения в растениеводстве после процедуры государственной регистрации, а также для производства в промышленных условиях.

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 «Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений» в ФГБНУ ФНЦБЗР, а также будут рекомендованы к использованию в качестве теоретического и практического материала для научных сотрудников, студентов и аспирантов по направлению подготовки «Агрономия» и «Биология».

Положения, выносимые на защиту:

1. Положительное влияние созданных на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 лабораторных образцов биопрепаратов на всхожесть растений пшеницы озимой и высокая биологическая эффективность в отношении *F. graminearum* BZR F-4 на фоне искусственного заражения в условиях климатической камеры.

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

3. Положительное защитное действие лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении фузариозной корневой гнили пшеницы озимой в условиях центральной зоны Краснодарского края при применении путем предпосевной обработки семян в сочетании с опрыскиванием вегетирующих растений.

Методология и методы исследований. При выполнении работы использовали общепринятые и модифицированные микробиологические и фитопатологические методы исследований.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Научное обеспечение АПК», г. Краснодар, 26-28 ноября 2013 г.; VIII Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем», г. Краснодар, 16-18 сентября 2014 г.; VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», г. Москва, 17-20 марта 2015 г.; Научно-образовательной конференции молодых ученых «Инновационные биотехнологии в развитии АПК», г. Краснодар, 25-28 мая 2015 г.; Международном саммите молодых ученых «Современные решения в развитии сельскохозяйственной науки и производства, г. Краснодар, 26-30 июля 2016 г.; IX Международной научно-практической конференции "Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем" 20-22 сентября 2016 г., г. Краснодар; X Всероссийской конференции молодых ученых «Научное обеспечение АПК», посвященной 120-летию И.С. Косенко, г. Краснодар, 29-30 ноября 2016 г.; 8-й Международной конференции «Агротехнический метод защиты растений», г. Краснодар 19-22 июня, 2017; Международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2018, г. Уфа, 13-17 июня 2018 г.; Международной научно-практической конференции с элементами школы молодых ученых "Приоритетные направления научного обеспечения агропромышленного комплекса России и стран СНГ", п. Белозерный, 21-24 августа 2018г.; XI Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты», г. Минск, р. Беларусь, 3-6 июня 2019 г.; IV Международной научной конференции «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки» г. Ялта, 9-13 сентября 2019; XI международной научно-практической конференция «Защита растений от вредных организмов» г., Краснодар, 19-23 июня 2023 г; Международном форуме «Агробiotехнологии: достижения и перспективы развития» г. Москва, 28-31 августа 2023 г.

Публикации результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них четыре – в изданиях, входящих в Перечень ВАК, две – в изданиях, находящихся в базах данных Web of Science и SCOPUS. Получен патент РФ № 2621356 от 02.06.2017 г., оформлена одна база данных.

Личный вклад соискателя. Автором проведен теоретический анализ литературных источников 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 176 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключений, практических рекомендаций, списка литературы, 7 приложений, содержит 19 таблиц, 26 рисунков.

Список библиографических источников включает 253 наименования, в том числе 152 из иностранных источников.

Благодарности.

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, к.б.н., директору, в.н.с. 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 – д.б.н., член-кор. РАН, г.н.с. лаборатории иммунитета растений к болезням Волковой Г.В., к.б.н., в.н.с. лаборатории химической коммуникации и массового разведения насекомых В.Я. Исмаилову, рук. отдела интеллектуальной собственности и инновационного развития, к.с.-х.н. Ермоленко С.А., начальнику отдела аспирантуры Вертий Е.А., ученому секретарю Есауленко Е.А.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Рассмотрена проблема 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.

Глава II. 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 (патент № 2553518) и *Bacillus subtilis* BZR 517 (патент № 2552146) из Биоресурсной коллекции ФГБНУ ФНЦБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов».

Материалами исследования являлись тест-культуры фитопатогенных грибов: моноспоровые штаммы *Fusarium graminearum* Schwabe BZR F-4, *F. graminearum* Schwabe BZR F-21 и *F. oxysporum* var. *orthoceras* App. et Wr. 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; 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; биологической эффективности лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении болезней, вызванных грибами р. *Fusarium*.

Полевые исследования проводили в 2012-2015 гг. на растениях пшеницы озимой сорт Калым. Почвенный покров характеризуется черноземом выщелоченным мицелярно-карбонатным (черноземы глубокие выщелоченные), реакция слабокислая (рН 5,5-6,5). Рыхлые почвообразующие породы – глинистые и тяжелосуглинистые (Национальный атлас..., 2015). Гумус в пахотном слое почвы составляет 3,0-4,5 %, постепенно уменьшающийся с глубиной. Содержание общего азота – 0,2 %, подвижного фосфора – 18,2 мг/100 г почвы, обменного калия – 30,6 мг/100 г (Слюсарев, 2018).

Среднегодовая температура составляла от +13,2 до +13,9°С, максимально низкие показатели температур были отмечены в декабре-феврале, максимально 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 %.

Полевые испытания проводили на экспериментальной базе ФГБНУ ФНЦБЗР согласно методике полевого опыта (Доспехов, 2011). 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. Посев осуществляли спустя сутки после обработки с помощью механической сеялки СЗ-3,6. Площадь одной делянки составляла 100 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 (Долженко и др., 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 Аббота. Массу 1000 зерен определяли по ГОСТ 12042-80.

Лабораторные исследования проводили на базе лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ФНЦБЗР с использованием материально-технической базы УНУ «Технологическая линия для получения микробиологических средств защиты растений нового поколения». Жидкую культуру (ЖК) на основе штаммов получали методом периодического культивирования. Определяли оптимальные условия культивирования штаммов: источники углеродного и азотного питания, температуру, рН среды, сроки культивирования. 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 органосилоксановых ПАВ и алкоксилатов).

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли методом Коха (Практикум по микробиологии, 2005). Совместимость определяли модифицированным методом диффузии в агар (Ваксман, 1947). Определение антагонистической активности проводили методом двойных (встречных) культур (Егоров, 2004); антибиотическую активность – модифицированным методом последовательных разведений (Егоров, 2004; Sidorova et al., 2020). Анализ антифунгальной активности метаболитов проводили путем экстракции этилацетатом, восходящей тонкослойной хроматографии и биоавтографии (Сидорова и др., 2019).

Биологическую эффективность ЖК на основе исследуемых штаммов 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 (трифеназол 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 (Долженко и др., 2009).

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

Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ростстимулирующая активность штаммов бактерий-антагонистов

Установлено влияние исследуемых штаммов на рост и развитие растений пшеницы озимой сорт Батько в динамике в течение 10 суток в лабораторных условиях. 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 штаммами 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.

Оптимизация условий культивирования штаммов бактерий-антагонистов для увеличения количества колониеобразующих единиц и антифунгальной активности

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).

Таблица 1 – Влияние условий на рост штаммов бактерий-антагонистов в процессе периодического культивирования

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, °C		
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
pH		
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		

В результате проведенных исследований 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. В вариантах с добавлением глюкозы, сахарозы и глицерина титр ЖК оказался на один порядок ниже. 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.

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 23,19 % отмечен при pH 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 pH 6,0 и 8,0.

Установлено влияние условий культивирования на антибиотическую активность штаммов (таблица 2).

Таблица 2 – Антибиотическая активность штаммов бактерий-антагонистов в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от условий в процессе периодического культивирования

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}
pH								
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								

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 на протяжении всего периода инкубации 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 %). В вариантах с добавлением пептона и кукурузного экстракта не был сформирован воздушный мицелий, что свидетельствует о накоплении в ЖК фунгистатических соединений.

Сравнительное изучение антибиотической активности ЖК исследуемых штаммов показало, что 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 %).

Следует отметить, что в вариантах с добавлением бактериального супернатанта (при культивировании в условиях температуры 20,0 и 25,0° С для штамма *B. subtilis* BZR 336g, при 25,0 и 30,0° С для штамма *B. subtilis* BZR 517) наблюдался четко очерченный край колонии мицелия патогена, рост тонкого паутинистого мицелия и изменение его окраски, что свидетельствует об активном подавлении роста мицелия патогена. 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).

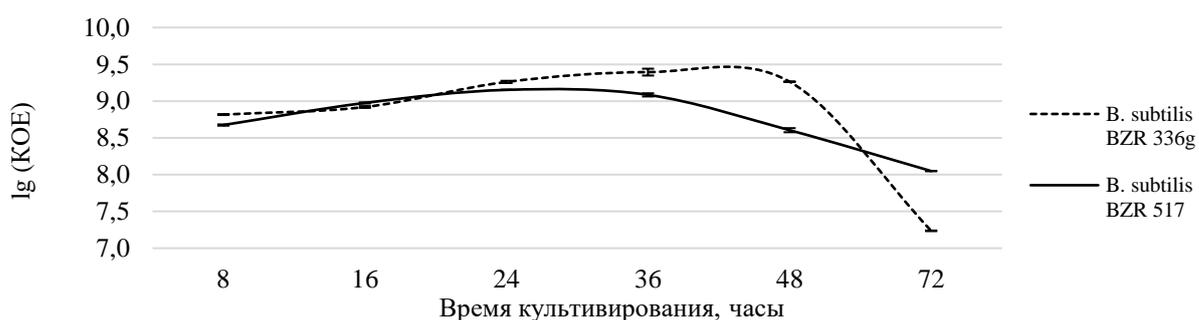


Рисунок 1 – Динамика роста штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в процессе периодического культивирования

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 2).

Таблица 3 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от времени культивирования в процессе периодического культивирования

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

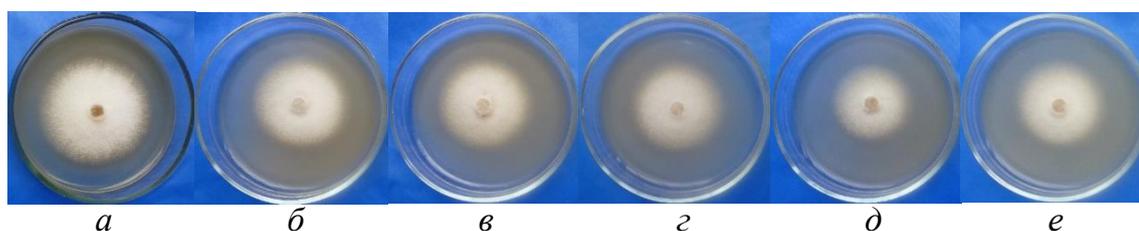


Рисунок 2 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 336g в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 при периодическом культивировании в зависимости от времени (ориг.)

a – контроль; *б* – 8 часов; *в* – 16 часов; *г* – 24 часа; *д* – 36 часов; *е* – 48 часов

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

Таким образом, определены оптимальные источники углеродного и азотного питания, оптимальная температура и кислотность среды, а также сроки культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517.

Разработка состава питательной среды культивирования штаммов бактерий-антагонистов для получения лабораторных образцов биопрепаратов

На основании исследований по подбору оптимальных условий культивирования была разработана оригинальная оптимизированная питательная среда (ОПС). В ее состав вошли: хлористый калий, магниевый сернистый, калий фосфорнокислый, кукурузный экстракт, кальций углекислый, железо сернокислое, 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 на рисунке 3 и в таблице 4. Для штамма 336g максимальная антифунгальная активность отмечена на ОПС, тогда как на

питательных средах КБ и картофельно-глюкозный агар (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%.

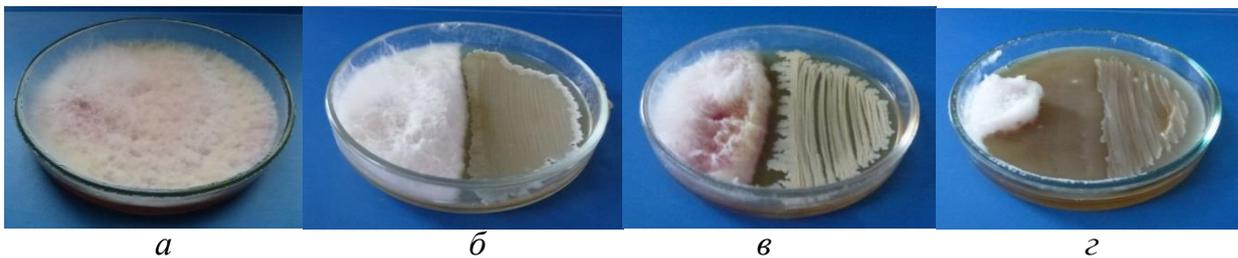


Рисунок 3 – Антифунгальная активность штамма *B. subtilis* BZR 336g в отношении *F. graminearum* BZR F-4 на различных питательных средах а – контроль; б – КБ; в – КГА; з – ОПС (ориг.)

Таблица 4 – Рост и антифунгальная активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. graminearum* BZR F-4 на различных питательных средах в процессе периодического культивирования

Питательная среда	Титр ЖК, КОЕ/мл	Ингибирование мицелия патогена, %			
		Инкубация, сутки			
		5	10	15	20
<i>B. subtilis</i> 336g					
КГА	$(1,1 \pm 0,03) \times 10^{8b}$	60,1 ^c	64,0 ^b	59,2 ^b	53,5 ^b
КБ	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^{6a}$	46,1 ^b	61,2 ^b	61,1 ^b	61,1 ^b
ОПС	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^{9c}$	90,0 ^d	83,6 ^c	78,2 ^c	75,9 ^c
<i>B. subtilis</i> 517					
КГА	$(2,4 \pm 0,3) \times 10^{6a}$	55,8 ^b	62,6 ^b	57,8 ^b	54,0 ^c
КБ	$(3,3 \pm 0,2) \times 10^{6a}$	46,8 ^b	63,6 ^b	64,0 ^b	63,5 ^c
ОПС	$(4,1 \pm 0,2) \times 10^{8b}$	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					

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 %.

Хроматографический анализ показал, что в зависимости от состава питательной среды при культивировании штаммов образуется большое количество соединений, различающиеся как по хроматографической подвижности, так и свечению в ультрафиолетовом свете (рисунок 4). 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.

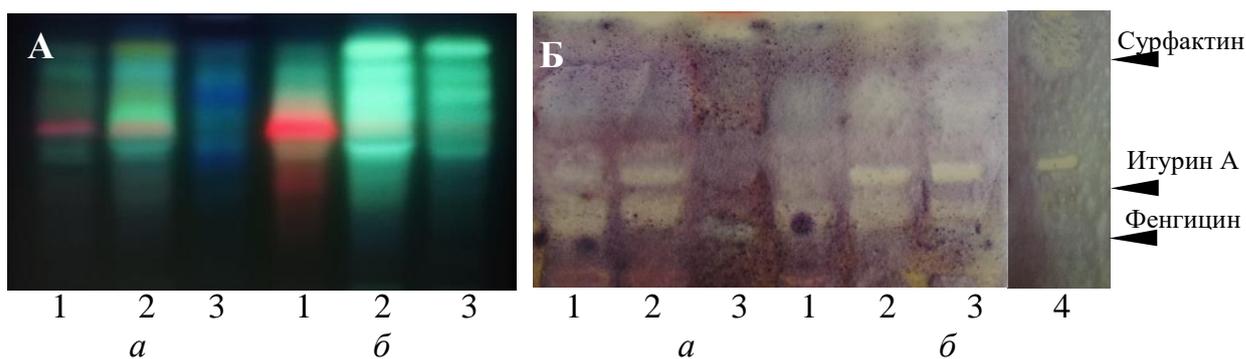


Рисунок 4 – Хроматограммы (А) и биоавтограммы (Б) супернатанта штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в зависимости от питательной среды на силикагелевом носителе (этилацетат-этанол-вода 40:15:15) в УФ 366 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

1 – КГА; 2 – ОПС; 3 – КБ; 4 – стандартный раствор липопептидов
a – штамм *B. subtilis* BZR 336g; *б* – штамм *B. subtilis* BZR 517

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

Биологическая эффективность 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 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 %. 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 ЖК на основе штаммов бактерий, 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: увеличение длины побега от 17,0 до 25,4 % на среде КГС, от 15,2 до 22,3 % – КВ; от 15,9 до 30,2 % – ОПС; длины корня от 23,8 до 37,3 % на среде КГС; от 28,3 до 39,6 % – КВ; от 19,5 до 22,6 % – ОПС; массы побега до 16,9 % на среде КГС; массы корня до 47,3 % на среде КВ. 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

оптимизированной питательной среды были разработаны ТУ и лабораторные регламенты производства биопрепарата.

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 5).

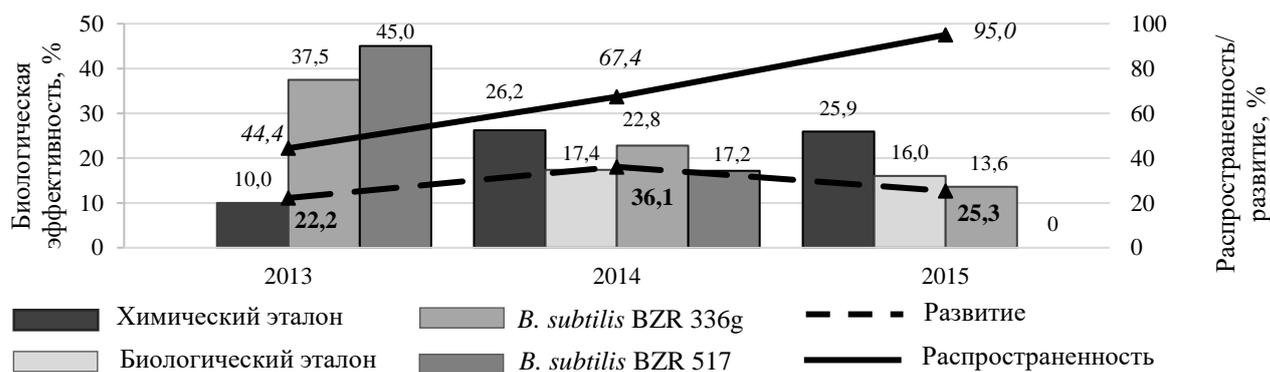


Рисунок 5 – Биологическая эффективность лабораторных образцов биопрепаратов против фузариозных корневых гнилей пшеницы озимой в условиях полевого мелкоделяночного опыта, сорт Калым, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013-2015 гг.

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 %, распространённости – 44,4%. 2014 г. был умеренно дождливым с температурой воздуха близкой к норме, что способствовало развитию и распространённости 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 %, распространённость – 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 биопрепаратов, 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 мелкоделаяночного опыта, сорт Калым, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013-2015 гг.

Вариант, норма применения, л/т	2013 г.			2014 г.			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 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, 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.

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

В ходе исследований совместимости установлено, что Панэм ингибировал рост штаммов и, как следствие, не был включен в дальнейшие исследования. На рисунке 6 представлены данные по влиянию прилипателей на титр ЖК исследуемых штаммов. 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 6).

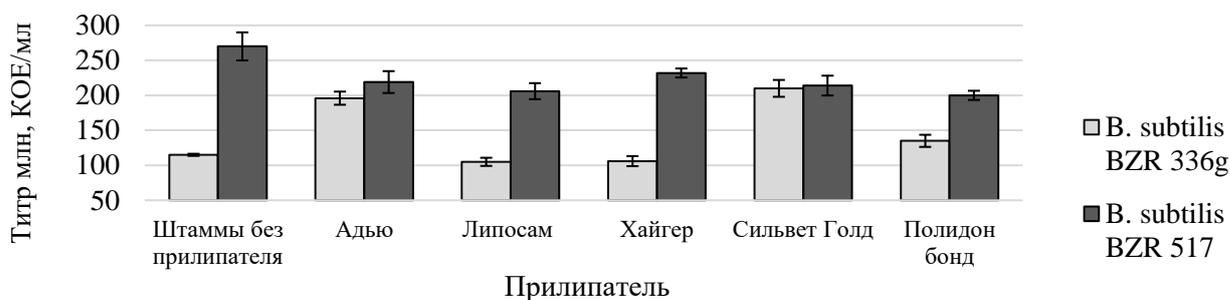


Рисунок 6 – Влияние прилипателей на КОЕ в одном мл лабораторного образца биопрепарата

Результаты исследований влияния прилипателей на антифунгальную активность лабораторных образцов биопрепаратов на основе исследуемых штаммов представлены в таблице 7.

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

Вариант, норма применения, мл/т	Антифунгальная активность, %			
	инкубация, сутки			
	5	10	15	20
<i>B. subtilis</i> BZR 336g				
Адьо, 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
<i>B. subtilis</i> BZR 336g без прилипателя	79,3 ^{ab}	78,5 ^a	73,0 ^a	61,5 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 517				
Адьо, 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
<i>B. subtilis</i> BZR 517 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				

Прилипатели способны снижать антифунгальную активность лабораторных образцов биопрепаратов. 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 %.

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).

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, %*
<i>B. subtilis</i> BZR 336g		
Контроль без инфекции	100 ^c	-
Контроль с инфекцией**	62,0 ^a	58,9/100
Адю, 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
<i>B. subtilis</i> BZR 336g без прилипателя	63,0 ^a	15,3 ^b
<i>B. subtilis</i> BZR 517		
Контроль без инфекции	84,4 ^a	-
Контроль с инфекцией	82,2 ^a	26,7/97
Адю, 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
<i>B. subtilis</i> BZR 517 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		

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 Адю, Липосам и Полидон Бонд, у

лабораторного образца на основе штамма *B. subtilis* BZR 517 – с Сильвет Голд и Полидон Бонд.

Применение прилипателей Липосам и Полидон Бонд в сочетании с лабораторным образцом биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g обеспечивало прибавку длины побега от 35,9 до 36,8 % по сравнению с лабораторным образцом без прилипателя. Для показателей длины корня, массы побегов и корней у обоих штаммов статистически значимых различий между лабораторными образцами и вариантами с применением прилипателей отмечено не было.

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 Адыю.

Заключение

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.

Максимальное КОЕ 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 штамма *B. subtilis* BZR 336g – 20,0 и 25,0°C, штамма *B. subtilis* BZR 517 – 30,0°C. Оптимум pH для культивирования штаммов бактерий: для штамма *B. subtilis* BZR 336g – 8,0, для штамма *B. subtilis* BZR 517 – 6,0 и 8,0. Выявлено оптимальное время культивирования для штамма *B. subtilis* BZR 336g 36-48 ч, для штамма *B. subtilis* BZR 517– 24-36 ч. На основании полученных данных разработаны оптимизированные питательные среды для получения лабораторных образцов биопрепаратов, разработаны ТУ и лабораторные регламенты производства биопрепаратов на основе штаммов бактерий *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517.

Применение ОПС в сравнении со стандартными средами для культивирования штаммов бактерий, обеспечило получение ЖК с титром не менее 1×10^9 КОЕ/мл, высокой антифунгальной активностью (от 49,7 до 90,0 % в отношении *F. graminearum* BZR F-4) и биологической эффективностью в отношении корневых гнилей фузариозной этиологии от 24,7 до 37,0 % на фоне искусственного заражения.

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 обеспечивает 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.

Отобраны прилипатели, которые не оказывают негативного влияния на антифунгальную активность и КОЕ лабораторных образцов биопрепаратов, для

совместного применения: Сильвет Голд и Хайгер для *B. subtilis* BZR 336g, Хайгер и Адьо для *B. subtilis* BZR 517.

Практические рекомендации

Проведенные исследования позволяют рекомендовать штаммы *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 для использования научно-исследовательскими учреждениями и коммерческими организациями для создания новых отечественных биопрепаратов для защиты пшеницы озимой от фузариозной корневой гнили путем их применения для предпосевной обработки семян в сочетании с опрыскиванием вегетирующих растений в фазу выхода в трубку и в фазу колошения.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России

1. Штаммы бактерий-антагонистов, обладающие ростстимулирующей активностью в отношении растений озимой пшеницы / А.М. Асатунова, Томашевич Н.С., Дубяга В.М., [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2023. – Т. 37. – № 5. – С. 21-27. doi: 10.53859/02352451_2023_37_5_21

2. Подбор прилипателей для совместного применения с лабораторным образцом биопрепарата в сельском хозяйстве / **Хомяк А.И.**, Жевнова Н.А., Аллахвердян В.В., [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2023. – Т. 37. – № 8. – С.53-58. doi: 10.53859/02352451_2023__

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.

Публикации в изданиях, входящих в БД Scopus, WoS

5. Optimization of laboratory cultivation conditions for the synthesis of antifungal metabolites by *Bacillus subtilis* strain / Sidorova T.M., Asaturova A.M., **Номыак А.И.**, [et al.] // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2020. – Vol. 27. – № 7. – P. 1879-1885. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.05.002>

6. Evaluation of *Bacillus velezensis* Biocontrol Potential against *Fusarium* Fungi on Winter Wheat strain / А.М. Асатунова, N.A. Zhevnova, N.S. Tomashevich, [et al.] // Agronomy. – 2022. – №2. – 1956. <https://doi.org/10.3390/agronomy12081956>

Публикации в других научных изданиях

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

8. **Хомяк А. И.** Оптимизация условий культивирования штаммов бактерий рода *Bacillus* - основы биофунгицидов для защиты сельскохозяйственных культур / А. И. Хомяк, А. М. Асатунова, 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. DOI 10.33952/09.09.2019.145.

9. **Хомяк А. И.** Условия культивирования бактерий-антагонистов *Bacillus subtilis* - основы биопрепаратов для защиты растений / А. И. Хомяк, А. М. Асатунова // Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего: Материалы Международной научной конференции, Уфа, 13–17 июня 2018 года. – Уфа: Электронное издание. Постоянный адрес размещения <http://plamic.ru/sbornik/>, 2018. – С. 244.

Интеллектуальная собственность

Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022622985 Российская Федерация. Бактерии-антагонисты фитопатогенов из Биоресурсной коллекции «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» ФГБНУ ФНЦБЗР. от 21.11.2022. / А. М. Асатунова, Н. А. Жевнова, В. М. Дубяга, [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологической защиты растений». – EDN LNERIM.

Биофунгицид для защиты сельскохозяйственных культур от болезней и повышения урожайности: пат. 2621356 Рос. Федерация: МПК А01N 63/00 С12N 1/20 / А.М. Асатунова, Н.С. Томашевич, Н.А. Жевнова, **А.И. Хомяк** [и др.]. заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологической защиты растений». – № 2015151901/13; заявл. 03.12.2015; опубл. 02.06.2017, бюл. № 16. – 13 с.

Хомяк Анна Игоревна

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОЗДАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ
НОВЫХ 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 ____ . ____ . 2025 г. Формат 60x84 ¹/₁₆
Усл. печ. л. – 1,0. Тираж 100. Заказ № _____
Типография ИП Тасалов А.В. Переплетная мастерская
350044, г. Краснодар, ул. Северная, 81