

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ
РАСТЕНИЙ»

На правах рукописи



Хомяк Анна Игоревна

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

4.1.3. Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель

канд. биол. наук

Асатурова Анжела Михайловна

Краснодар – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Биопрепараты для защиты растений на основе бактерий-антагонистов в России и в мире.....	14
1.2 Эффективность применения биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов в защите растений.....	20
1.3 Условия культивирования штаммов-продуцентов биопрепаратов.....	24
1.4 Динамика роста штаммов-продуцентов биопрепаратов.....	35
1.5 Оптимизация условий культивирования и разработка технологии получения биопрепаратов.....	38
1.6 Добавки, обеспечивающие увеличение эффективности применения биопрепаратов в сельском хозяйстве.....	41
2. МЕСТО, УСЛОВИЯ, ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ	46
2.1 Определение культурально-морфологических признаков штаммов бактерий-антагонистов	46
2.2 Определение ростстимулирующей активности штаммов бактерий-антагонистов в динамике.....	47
2.3 Определение оптимальных условий культивирования штаммов бактерий-антагонистов	48
2.4 Выделение, хроматографический анализ и анализ антифунгальной активности бактериальных метаболитов.....	51
2.5 Биологическая эффективность штаммов бактерий-антагонистов на фоне искусственного заражения пшеницы озимой <i>F. graminearum</i> BZR F-4 в условиях климатической камеры.....	53

2.6 Эффективность применения лабораторных образцов биопрепаратов на фоне естественного поражения корневой гнилью фузариозной этиологии в условиях полевого мелкоделяночного опыта.....	55
2.7 Оценка влияния коммерческих прилипателей на эффективность лабораторных образцов биопрепаратов с целью создания комплексной системы защиты растений от корневых гнилей фузариозной этиологии	58
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	62
3.1 Культурально-морфологические признаки и идентификация штаммов бактерий-антагонистов	62
3.2 Ростстимулирующая активность штаммов бактерий-антагонистов в динамике	64
3.3 Оптимизация условий культивирования штаммов бактерий-антагонистов для увеличения количества колониобразующих единиц и антагонистической активности.....	66
3.4 Разработка состава питательной среды культивирования штаммов бактерий-антагонистов для получения лабораторных образцов биопрепаратов.....	91
3.5 Биологическая эффективность штаммов бактерий-антагонистов на фоне искусственного заражения пшеницы озимой <i>F. graminearum</i> BZR F-4 в условиях климатической камеры в зависимости от состава питательной среды.....	98
3.6 Разработка технических условий и лабораторных регламентов производства биопрепаратов.....	103
3.7 Эффективность применения лабораторных образцов биопрепаратов на фоне естественного поражения корневой гнилью фузариозной этиологии в условиях полевого мелкоделяночного опыта	107

3.8 Оценка совместимости лабораторных образцов биопрепаратов и прилипателей с целью создания комплексной системы защиты растений от корневых гнилей фузариозной этиологии	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	120
ВЫВОДЫ.....	127
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	129
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	162

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ЖК – жидкая культура

КБ – среда Кинга Б

КГА – картофельно-глюкозный агар

КГС – картофельно-глюкозная среда

КОЕ – колониеобразующая единица

л/т, га – литр на тонну, на гектар

ЛР – лабораторный регламент

МПА – мясо-пептонный агар

ОПС – оптимизированная питательная среда

ТУ – технические условия

ЧП – чашка Петри

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

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).

Микробные биопрепараты занимают 5% доли мирового рынка пестицидов. Полному внедрению биопрепаратов препятствует нехватка продуктов для удовлетворения потребностей сельхозтоваропроизводителей (Liu, Cao, Yan et al., 2021; Мезюха, Гайзатулин, Яценко, 2022).

Необходимо учитывать, что действующим началом биопрепаратов являются живые клетки микроорганизмов. В связи с этим существует ряд

особенностей (Максимов, Максимова, Сарварова и др., 2018; Essiedu, Aderoju, Ivantsova, 2020; Tripathi, Divyanshu, Kumar, 2020; Потапенко, Рзаева, 2023):

- ограниченный срок хранения;
- негативное воздействие влаги и солнечного света;
- потеря активности штаммов-продуцентов биопрепаратов;
- непродолжительный срок действия;
- загрязнение посторонней микробиотой.

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).

Таким образом, выбор оптимальной рецептурной формы зависит от физиолого-биохимических и экологических особенностей штамма-продуцента, трофических потребностей и устойчивости культуры микроорганизма по отношению к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды (Abbey, Abbey, Leke-Aladekoba, et al., 2019; Якименко, Бегун, Сорокина, 2020).

Создание эффективных биологических средств защиты растений предполагает разработку лабораторного регламента производства биопрепаратов ТУ, а также тестирование и производственные испытания полученных лабораторных образцов препаратов.

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, Jędruczka 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, Aderoju, 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 «Агрохимия, 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.

Степень достоверности и апробация работы

Объективность и достоверность результатов подтверждена экспериментальными данными, полученными в лабораторных и опытно-полевых условиях с применением современных методов и их статистической обработкой.

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 «Агробиотехнологии: достижения и перспективы развития» г. Москва, 28-31 августа 2023 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; Межгосударственной целевой программы "Инновационные биотехнологии" ЕврАзЭС и Министерства образования, науки и

молодежной полититки Краснодарского края (государственный контракт № 16.M04.11.0026 от 15.07.2011, 2011-2013 гг.; государственный контракт № 14.M04.12.0012 от 27.07.2014, 2014-2015 гг.), гранта Кубанского научного фонда № НИП 20.1/22.9, 2022-2024 гг.

По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них две – в изданиях, входящих в Перечень ВАК, три – в изданиях, находящихся в базах данных Web of Science и SCOPUS. Получен патент РФ № 2621356 от 02.06.2017 г.

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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биопрепараты для защиты растений на основе бактерий-антагонистов в России и в мире

Из аэробных спорообразующих бактерий в качестве основы биопрепаратов против болезней растений наиболее распространен род *Bacillus* (Кузьмина, Архипова, Актуганов и др., 2018; Козлова, Шпатова, Штерншис, 2021; Ortiz, Sansinenea, 2022). А бактерии вида *Bacillus subtilis* являются наиболее продуктивными и перспективными представителями рода *Bacillus* в микробиологической промышленности (Асатурова, Дубяга, Томашевич, и др., 2012; Власова, Данилец, Передериева и др., 2019; Twizeyimana, Hartman, 2019; Djaenuddin, Muis, 2020; Уромова, Козлов, 2020; Ayer, Strickland, Choi et al., 2021; Гиченкова, Лаптина, 2023).

Бактериальные фунгициды на основе штаммов рода *Bacillus* обладают рядом положительных свойств:

- высокая антифунгальная активность (Vejan, Abdullah, Khadiran, 2016; Астапчук, Якуба, Насонов, 2021; Малкова, Иркитова, Дудник и др., 2021; Salazar, Ortiz, Keswani, 2023);

- быстрый антагонистический эффект (Dhiraj, Shiv, Aanand et al., 2014; Villa-Rodríguez, Parra-Cota, Castro-Longoria et al., 2019);

- способность бацилл к колонизации различных частей растения и образование биопленок в ризосфере и на листовой поверхности (Павлюшин, Новикова, Бойкова, 2020; Penha, Vandenberghe, Faulds et al., 2020; Arnaouteli, Vamford, Stanley-Wall et al., 2021; Sagar, A., Yadav, S. S., Sayyed et al., 2022);

- отсутствие устойчивости у патогенов к бациллам и продуцируемым ими соединениям (Маслова, Грошева, 2020; Jørgensen, Folke, Henriksson et al., 2020);

- возможность использования на различных стадиях развития растений, для обработки семян и почвы (Высоцкая, Крекотень, 2015);

- совместимость с химическими препаратами (Ji, Li, Meng et al., 2019; Наумов 2021; Santos, Rodrigues, Nogueira et al., 2021).

Ориентир на здоровый образ жизни, заботу о своем здоровье, акцент на здоровое питание мотивировали население многих стран перейти на потребление экопродуктов. Анализируя состояние мирового рынка органических продуктов, можно отметить устойчивую тенденцию его роста. Так на сегодняшний день общий объем данного рынка составил более 72 млрд долл. США. Около 90 % всего объема международных продаж приходится на Европу и Северную Америку. В десятку стран – крупнейших рынков органических продуктов входят США, Германия, Франция, Китай, Канада, Великобритания, Италия, Швейцария, Австрия, Швеция (Sharma, Singhvi, 2018; Willer, Lernoud, 2019).

Динамичное развитие индустрии органики способствует переориентации бизнеса на производство востребованной экологически безопасной продукции, и как следствие, на развитие ассортимента биологических средств защиты растений (Thomson, Vijan, 2016).

В настоящее время биопестициды составляют 2 % средств защиты растений, используемых в мире. Однако наблюдается тенденция к увеличению производства биологических средств защиты растений. В последние годы производство химических пестицидов уменьшается на 2 % в год, в то время как производство биопестицидов ежегодно увеличивается на 20 %. Мировое производство биопестицидов составляет в среднем 3000 тонн в год, а использование биопестицидов каждый год стабильно увеличивается на 10%. По данным BCC Research к 2017 году рынок биологических пестицидов превысит 3,7 млрд. долларов в год со среднегодовым темпом роста в 12 % (Kumar, Singh, 2015; Mishra, Tewari, Singh, et al., 2015).

Компании по производству биопестицидов существуют в США, Швейцарии, Японии, Индии, Китае, Швеции, Бельгии, Нидерландах, Англии, Италии, Германии, Канаде, Финляндии. Наибольшее число самых крупных компаний находится в США. Общими особенностями всех этих компаний является государственная поддержка их деятельности, целевые заказы министерства сельского хозяйства США на производство определенных видов биопестицидов, тесная международная кооперация в разработке и испытании биологических средств защиты растений. Активно работают крупнейшие компании: Valent Bioscience (США), Certis (США), Koppert Biological Systems (Нидерланды), Pasteuria Bioscience (США), Isagro (Италия), Terra Nostra Technology (Канада), Syngenta, Bayer, BASF, Dow, Monsanto и DuPont. В последние годы наблюдается процесс объединения компаний в ассоциации с целью уменьшения производственных затрат и повышения конкурентоспособности. Они жестко делят рынки продаж биопрепаратов. Компании ведут активную работу по селекции перспективных видов и штаммов на повышение их пестицидной активности (Leahy, Mendelsohn, Kough, 2014; Kumar, Singh, 2015; Pelaez V., Mizukawa, 2017).

Кроме того, исследованием свойств штаммов-продуцентов и разработкой биопрепаратов активно занимаются научно-исследовательские институты Европы: Plant Protection Institute (Словакия), Swedish University of Agricultural Sciences (Швеция), Plant pathology research institute (Италия), The New Zealand Institute for Plant & Food Research Limited (Новая Зеландия), Institute of Biology Leiden (Нидерланды); Азии: King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (Тайланд), Northwest A&F University, College of Life Sciences, Tianjin University of Science and Technology, (Китай), Северной и латинской Америки: National Center for Agricultural Utilization Research (США), Universidad Nacional de Colombia (Колумбия), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (Бразилия), Centro de Investigación de Ciencias Biológicas, (Мексика); Африки: Arid lands research institute (Египет). С

каждым годом смягчается налогообложение организаций, осуществляющих научные исследования, увеличиваются объемы финансирования (Saha, Thosar, Kabade et al., 2023).

В настоящее время в мире разработаны биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus*: Avogreen (*B. subtilis*), Ballad (*B. pumilus*), Bio safe (*B. subtilis*), Biosubtilin (*B. subtilis*), Botrybel (*B. velezensis*), Cease (*B. subtilis*), Companion (*B. subtilis*), Kodiak (*B. subtilis*), Ecoshot (*B. subtilis*), EcoGuard TM (*B. licheniformis*), FZB24WG (*B. subtilis*), Rhizo Plus (*B. subtilis*), HiStick (*B. subtilis*), RhizoVital42 (*B. amyloliquefaciens*), Subtilex (*B. subtilis*), Pro-Mix (*B. subtilis*), Rhapsody (*B. subtilis*), Serenade (*B. subtilis*), Sonata (*B. pumilus*), Sublic (*Bacillus* sp.), Yield Shield (*B. pumilus*) (США, Канада, Китай, Индия и т.д.) Но, следует отметить, что они адаптированы к условиям, отличающимся от российских. Кроме того, некоторые препараты, такие как Bio safe, производятся только для применения на территории страны-изготовителя (ed. by Stoytcheva, 2011; Hubbard, Hynes, Erlandson, 2014).

Российское сельское хозяйство обладает мощным потенциалом для производства экологического сельскохозяйственного сырья, и одним из перспективных направлений развития сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности РФ является продвижение экологического сельхозсырья и экологических продуктов питания, прежде всего, для внутреннего потребления, а также на зарубежные рынки. В России рынок экологически безопасной продукции еще только формируется (Ефремов, 2015). Одна из основных причин такого отставания от Запада – отсутствие на российском рынке широкого ассортимента биологических средств защиты растений (Терентьев, Ковалёва, 2018; Ванюшина, 2019).

Исследование патентных документов и научных статей показало, что в настоящее время существует большой набор бактерий-антагонистов, которые могут послужить основой для биопрепаратов. Заявители патентов и авторы 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 (Trejo, Serrano-Carreón, Patiño et al., 2013; Wachowska, Kucharska, Jędruczka et al., 2013). 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).

При этом российский рынок биологических средств защиты растений обладает значительным потенциалом развития, свидетельством чего является сравнение его объема с рынками других стран. По состоянию на начало 2023 года российский рынок в 5,5 раз меньше рынка ЕС и в 10,5 раз меньше рынка США.

В 2022 году в структуре российского рынка биологических средств защиты растений преобладали препараты фунгицидного действия, на долю которых приходилось свыше 50 % от общего объема рынка в стоимостном выражении. Это определено следующими факторами: ценовая конкурентоспособность препаратов; удовлетворительные показатели эффективности в сравнении с химическими средствами; спектр активности включает ряд проблемных инфекций, например, корневые гнили, в борьбе с которыми распространенные химические средства не позволяют добиться желаемого результата; более широкий спектр действия (Анализ рынка биопрепаратов для защиты растений и инокулянтов в 2022-2023 гг, 2023).

Сегодня производством биологических средств защиты растений занимаются как частные предприятия, так и станции защиты растений,

которые в большинстве своем являются государственными компаниями и имеют минимальные мощности (Российский рынок биологических средств защиты растений, 2014).

В России основными производителями биологических средств защиты растений являются ПО «Сиббиофарм», НВП «БашИнком», ЗАО «Агробиотехнология», ООО «Бионовтика». Они ведут научную работу и поиск подходящих штаммов, занимаются культивированием бактерий, упаковкой и продажей продукции, активно вовлечены в маркетинг и работы по продвижению (Коноваленко, 2018). Отдельной категорией производителей биологических средств защиты растений являются специализированные (аграрные, биохимические) НИИ, которые, как правило, занимаются выбором и районированием подходящих штаммов микроорганизмов, размножением чистых культур и изготовлением конечной продукции (типовой объем 50-200 тонн). Так, Бактофит разработан в ГНЦ ВНИИ прикладной микробиологии, Гамаир и Алирин Б – ВИЗР, Бисолбисан – ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (Рубанов, Фомин, 2018).

В 2022 году на территории Российской Федерации были разрешены для применения следующие микробиологические препараты на основе *B. subtilis*: Бактерра, Баксис, Алирин Б, Бисолбицид, Бактофит, Гамаир, Витаплан, Бисолбисан (Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, 2022). Такой небольшой ассортимент связан, в том числе и с слабо проработанными современными стандартами получения биопестицидов (Минина, Захарова, Уразбахтина и др., 2009; Леонтьева, Кузина, Логинов, 2013).

Таким образом, одним из актуальных направлений сельскохозяйственной биотехнологии на сегодняшний день является поиск оптимальных условий для культивирования штаммов-продуцентов биопрепаратов: подбор новых субстратов и источников питания, усовершенствование способов культивирования, изучение жизнеспособности

и биологической активности микроорганизмов при различных условиях культивирования.

1.2 Эффективность применения биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов в защите растений

В настоящее время в сельском хозяйстве замещение химических пестицидов биопрепаратами происходит не столь быстрыми темпами, как можно было бы ожидать. Одна из причин этого – недооценка положительных качеств биопрепаратов. Кроме того, производителям растениеводческой продукции импонирует скорость и более широкий спектр действия химикатов. С этой точки зрения следует искать подходы к усилению роли микробных агентов биоконтроля в управлении здоровьем растений. Резервом такого подхода являются исследования биологической эффективности биопрепаратов (Штерншис, Беляев, Цветкова и др., 2016).

Один из таких препаратов – Витаплан, СП зарегистрирован для применения в России на многих культурах. Его действующее начало – живые клетки и споры *B. subtilis*, штамм ВКМ В-2604Д и штамм ВКМ В-2605Д.

Сотрудниками Нижне-Волжского НИИСХ установлено, что длина корешков у озимой пшеницы в вариантах с применением Витаплана увеличивалась на 8,3 %, количество корешков – на 3,0 % по сравнению с контролем. Показатель массы 1 растения также выше на 12,5 %. Урожайность по сравнению с контролем увеличивалась на 0,3 т/га. (Резанова, 2013).

При применении Витаплана в качестве протравителя семян яровой пшеницы количество здоровых семян увеличилось с 36 до 50 %. Распространение и средняя интенсивность поражения корневыми гнилями на стадии созревания составили 48,4 и 1,4 % соответственно (в контроле 65,4 и 1,6 %) (Разина, Дятлова, 2015).

Проведены исследования эффективности Витаплана в защите ярового ячменя на северо-западе Нечерноземья. Установлено, что развитие гельминтоспориоза в посевном материале снижалось на 37,5–53,8 %, корневых гнилей – 10,3 – 18,2 %, мучнистой росы – 12,5 %. (Рогожникова, Шпанев, 2016).

Витаплан снижал распространенность парши на груше: его биологическая эффективность (62,2-75,9 %) была сравнима с таковой у препарата Скор (54,7-82,2 %) (Белошапкина, 2016).

Опрыскивание льна-долгунца в фазе «елочки» Витапланом и дополнительное его применение в период быстрого роста льна на 96,6 % защитило растения от бактериоза, на 100 % – от пасмо (Захарова, Кудрявцев, 2015).

Препарат Бактофит содержит живые клетки бактерий *B. subtilis*, штамм ИПМ-215. В исследованиях, проведенных всероссийским НИИ фитопатологии на озимой пшенице, отмечено, что Бактофит обеспечивал биологическую эффективность против корневых гнилей – 37-51 %, снежной плесени – 35-41 %, бурой ржавчины – 43-64 %, септориоза листьев – 19-23 % (Санин, Назарова, Неклеса и др., 2012).

Применение Бактофита на кукурузе способствовало снижению фузариоза до 3,5 %, а распространению гельминтоспориоза на 7,6-37,6 % ниже контроля (Гатагонова, 2019).

Обработка Бактофитом растений картофеля обеспечила биологическую эффективность в отношении фитофтороза картофеля на уровне 61% и способствовала получению 37% дополнительного урожая (Черников, 2023).

Другим биофунгицидом на основе спорообразующих бацилл является препарат Алирин-Б, содержащий бактерии *B. subtilis* штамм В-10 ВИЗР. Так, Алирин-Б подавлял развитие грибов р. *Penicillium*, *Alternaria* и *Fusarium* на поверхности листьев перца в 5 раз. В грунте после обработки Алирином-Б число КОЕ грибных патогенов на 1 см³ снизилось в 3 раза (Маслова, Грошева,

2020).

Обработка Алирином-Б растений земляники садовой обеспечила биологическую эффективность против пятнистостей до 91,4 %, против серой гнили до 45,0 % (Холод, 2014).

В исследованиях 2019 года установлено, что применение Алирина-Б обеспечило биологическую эффективность против парши яблони – 95,6–98,5 %, мучнистой росы – 95,8–95,4 % (Новикова, 2019). На растениях груши Алирин-Б снизил распространение *Entomosporium maculatum* в два раза по сравнению с контролем (Танделова, 2019).

Фитоспорин-М – это живая споровая бактериальная культура *B. subtilis* 26D, которая подавляет продуктами своей жизнедеятельности размножение многих грибных и бактериальных болезней растений, обладает свойством повышения иммунитета и стимуляции роста у растений.

Обнаружено положительное влияние Фитоспорина-М на формирование индуцированной устойчивости у растений. Так, обработка Фитоспорином-М снижала активность гидролаз в листьях и повышала активность их ингибиторов, что говорит об индуцировании у растений защитной реакции против патогенов (Пусенкова, Ильясова, Максимов и др., 2015).

Эффективность Фитоспорина-М против серой гнили на землянике садовой составила 62–63 %, дополнительный урожай составил 2,5 т/га за счет увеличения размера ягод (Табакова, Чухина, 2015).

Исследования, проведенные в 2011-2012 гг., показали, что предпосевная обработка Фитоспорином-М семян сорго обеспечивала биологическую эффективность против альтернариоза от 17 до 51 % (Матвиенко, 2015).

Инокуляция семян и опрыскивание посевов препаратом Фитоспорин-М по технологии No-till достоверно повысила урожайность зерна яровой пшеницы от 0,13 до 0,32, гороха на 0,17-0,32, подсолнечника 0,16-0,28 т/га (Чекаев, Галиуллин, 2022).

Также в научной литературе имеются данные о применении биопрепаратов для защиты растений за рубежом (Leisso, Burrows, 2007). Так в Западном научно-исследовательском центре Колорадо была проведена оценка эффективности препарата Kodiak (*B. subtilis* GBO3) для защиты проростков нута. В ходе исследований установлено, что протравливание препаратом Kodiak семян нута обеспечивало снижение развития *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* на 76,6-82,3 % (Hammon, Berrada, 2001).

Канадскими учеными были проведены исследования, подтвердившие высокую эффективность препарата Serenade против килы на рапсе. Отмечено, что штамм *B. subtilis* QST 713, являющийся основой биопрепарата, активно колонизирует корни рапса, обеспечивая 100 % эффективности (при обработке семян перед посевом и при пересадке рассады). Ученые предполагают, что основным механизмом защиты является формирование индуцированной устойчивости у растений рапса при использовании препарата Serenade (Lahlali, Peng, Gossen, et al., 2013).

Препарат Taegro (*Bacillus subtilis*) обеспечивал высокий защитный эффект в отношении *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* и *Fusarium oxysporum* на растениях перца чили: от 6,67% до 15,56% по сравнению с контролем – 24,44% (Kumar, Singh, Rajkumar et al., 2015).

Применение препарата Rhapsody, основой которого также является штамм *B. subtilis* QST 713, обеспечивало развитие мучнистой росы на листьях огурца на уровне 20-40% по сравнению с контролем – 80-100% (Punja, Tirajoh, Collyer et al., 2019). Кроме того, отмечено, что послеуборочная обработка плодов томата препаратом Rhapsody способствовала снижению поражения плодов грибами *Penicillium* sp. и *Rhizopus stolonifer* до 1-2% (Punja, Rodriguez, Tirajoh, 2016).

Обработка растений рукколы, капусты, редьки и горчицы препаратами Companion (*B. subtilis* GB03) и Triathlon BA (*B. amyloliquefaciens* D747), способствовала увеличению надземной части растений более, чем на 28%, по

сравнению с контролем. Поражение корней растений *Pythium* spp. отмечено на уровне 17-75 % для препарата Companion, 67-83% для препарата Triathlon ВА в зависимости от культуры (McGehee, Raudales, Elmer, et al., 2019).

Таким образом, в научной литературе представлено большое количество исследований, подтверждающих высокую эффективность применения биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов в сельском хозяйстве.

1.3 Условия культивирования

Действующим началом биопрепаратов являются живые клетки микроорганизмов, в связи с чем особое значение на стадии производства биопрепарата имеет чувствительность биоагента к факторам окружающей среды. Так, температура влияет на скорость клеточных реакций, природу метаболизма, пищевые потребности и состав биомассы. Значение рН культуры влияет на конечные продукты анаэробного превращения источников углерода и энергии, оказывает воздействие на состав среды и на характер поверхности микроорганизмов, оказывая влияние на диссоциацию кислот и оснований. Углерод органических веществ бактерии используют для построения своих клеток и в качестве источника энергии для биосинтеза клеточного материала, для роста, подвижности клетки. Метаболизм источника азота обеспечивает главным образом синтез белков, нуклеиновых кислот и полимеров клеточной стенки (Перт, 1978; Мосичев и др., 1982; Barssoum, Al Kassis, Nassereddine et al., 2023; Saberi, Marzban, Ardjmand, et al., 2023).

При оптимальном подборе всех компонентов по качественному и количественному составу, среда обеспечивает достаточно быстрый рост и развитие популяции микроорганизмов и считается сбалансированной, что в свою очередь обеспечивает баланс между стоимостью и эффективностью биопрепарата (Khater, 2012; Gašić, Tanović, 2013; Биопрепараты для защиты растений: оценка качества и эффективности, 2018; Федоренко, 2018).

1.3.1 Температурный режим

Температура окружающей среды является фактором, влияние которого на биомассу неизбежно, поскольку температура клетки должна соответствовать температуре культуральной среды. В отличие от этого значение рН или активность воды в клетке не обязательно должны уравниваться со значениями их во внешней среде. Физиологическое поведение бактериальных клеток часто зависит от температуры и обеспечивается посредством терморегулируемых доменов. Температура влияет на скорость клеточных реакций, природу метаболизма, пищевые потребности и состав биомассы (Abbasiliasi, Tan, Ibrahim et al., 2017).

Уменьшение скорости роста при верхних экстремальных температурах может быть следствием, как нарушения метаболической регуляции, так и отмирания клеток. Повышение температуры в конечном итоге приводит к разрушению структуры белка, что в свою очередь оказывает влияние на сродство между субстратом и ферментом. Поэтому в настоящее время осуществляется активный поиск микроорганизмов, производящих термостабильные ферменты (Самойлова, Сорокина, Пилигаев, 2018). В то же время понижение температуры может способствовать уплотнению мембранных липидов и, как следствие, снижению активности ферментов и растворимости растворимых молекул (Shafi, Mingshan, Zhiqiu et al., 2017).

Снижение температуры роста бактерий может привести к большому увеличению (на 10-20 %) выхода биомассы, рассчитанного по источнику углерода. Так в 2013 году сотрудниками Петрозаводского государственного университета были проведены исследования влияния динамики температуры на активность *Pseudomonas alcaligenes* и *Pseudomonas cichoril*. Бактерии культивировали при температуре от 5 до 35°C. В ходе исследований установлено, что наибольшая скорость роста исследуемых штаммов наблюдается при температуре 15 °C. По результатам изучения влияния

температуры на особенности роста и скорость генерации *P. alcaligenes* и *P. cichoril* можно отметить, что температура выполняет ведущую роль в популяционной изменчивости бактерий. Оптимальный температурный диапазон наряду с питательным субстратом является направляющим и стабилизирующим фактором отбора (Обухова, 2013).

Также положительное влияние низких температур на продуктивность бактерий было отмечено в исследованиях A.R. Kazim и S.B. Alden в 2014 году. Установлено, что антифунгальная активность *B. subtilis* в отношении *Aspergillus niger* при инкубировании при 50°C отличалась от контроля незначительно (диаметр зоны ингибирования составил 19 мм, в контроле – 20 мм), в то время как зона ингибирования *A. niger* при инкубировании при 4°C составила 25 мм (Kazim, Alden, 2014). Однако в исследованиях Усанова В.С. с соавторами, установлено, что повышение температуры культивирования *B. subtilis* до 40 °C положительно сказывается на динамике роста бактерии, количество колониеобразующих единиц превышает контроль на 88,9% (Усанов, Пензин, Шишкин, 2020).

Температура может оказывать влияние на путь превращений источников энергии и глюкозы. При изменении температуры может изменяться потребность в факторах роста. Известно влияние температуры на вторичный метаболизм, яркость и цветное проявление пигментов, сверхсинтез промежуточных продуктов обмена (Ахмедова, 2012; Mandelli, Yamashita, Pereira et al., 2012).

Максимальный процент ингибирования *Phytophthora palmivora*, вызывающей черную гниль у орхидей штаммом *Pseudomonas aeruginosa* RS1, отмечена при 37°C – 54 %, в то время как при повышении и понижении температуры культивирования антифунгальная активность снижается до 35-41% (Sowanpreecha, Rerngsamran, 2018).

Изменение температуры культивирования оказывает влияние на РНК, белок и липидный состав клеток бактерий. При одной и той же скорости роста

содержание РНК в бактериях при снижении температуры увеличивается в несколько раз. Общее содержание белка в клетках при снижении температуры может увеличиваться или уменьшаться в зависимости от природы лимитирующего субстрата (Перт, 1978).

Таким образом, температура является одним из ключевых факторов, определяющих возможность и интенсивность размножения клеток микроорганизмов в процессе культивирования.

1.3.2 рН

Во многих исследованиях микробных культур осуществлялся плохой контроль рН, и рН долгое время не относился к постоянным факторам.

Значение рН культуры влияет на состояние промежуточных продуктов, конечные продукты анаэробного превращения источников углерода и энергии, оказывает воздействие на состав среды и на характер поверхности микроорганизмов (что определяет такие свойства поверхности, как прилипание и флокуляция биомассы), активность ферментов, оказывает влияние на диссоциацию кислот и оснований. Это может быть, как непосредственное влияние ионов водорода или гидроксильных ионов на клетку, так и косвенное воздействие через изменение степени диссоциации веществ субстрата (Перт, 1978).

Многие бактериальные организмы, образующие антибиотики, лучше развиваются при нейтральном значении исходной активной рН среды – при рН около 7,0, а некоторые, например, молочнокислые бактерии – при рН 5,5-6,0. А.И. Осадчая с соавторами в 2013 году сообщили о существовании кислотостойких вариантов штамма *Bacillus thuringiensis* – продуцента биопрепарата «Бактокулицид», которые хорошо развивались при рН 5,2-6,0. Отмечено полное использование основных компонентов питания, увеличение выхода биомассы, синхронность спорообразования, высокий выход

спорокристаллического комплекса при выращивании кислотостойких вариантов в среде с кислым начальным значением рН (Осадчая, Подгорский, Прокопченко, 2013).

Для некоторых штаммов отмечается более широкий диапазон рН среды. Для штамма *Bacillus sp.* P1, выделенного из ризосферы сладкого картофеля, отмечены незначительные колебания КОЕ при культивировании на средах с рН 6-9 ($5,0-8,4 \times 10^5$ КОЕ/мл) (Mohapatra, Samantaray, Samantaray, 2015). Штамм *Bacillus sp.* 3, являющийся действующим агентом биофунгицида «Бацизулин», обнаруживает способность к росту в диапазоне рН от 5,0 до 9,0 с максимумом фунгистатической активности при рН среды 6,0-8,0. Это является неоспоримым преимуществом в условиях совместного использования фунгицидов, гербицидов, инсектицидов и других средств химизации, при смешивании которых в составе баковых смесей возможно резкое снижение рН (Хайбуллин, 2000).

В ходе развития организмов рН среды не остается постоянным, а зависит как от состава субстрата, так и от физиологических особенностей культивируемых микроорганизмов (Емельяненко, 2010). *B. thuringiensis* В-10, основной компонент комплексного микробного инсектицидного препарата «Бактофунгин», способен подщелачивать среду в процессе роста культуры до рН 5,8 при начальном 5,0 и 6,7 при начальном 6,0 (Дрегваль, 2010).

Если в среде в качестве единственного источника азота присутствует сернокислый аммоний и отсутствуют в достаточном количестве ионы кальция, то при развитии любых организмов, использующих аммонийный азот, будет идти сильное подкисление субстрата. И наоборот, если в среде в качестве единственного источника азота имеется, например, KNO_3 , то при использовании азота этого соединения субстрат будет подщелачиваться (Егоров, 2004).

Таким образом, рН питательной среды оказывает существенное влияние на биохимические и физиологические реакции, протекающие в клетках микроорганизмов, и как следствие, на выход целевого продукта.

1.3.3 Источники углеродного питания

Грибы, простейшие и большинство бактерий относятся к гетеротрофам: для построения своих клеток они используют углерод органических веществ. Кроме углерода, организмы нуждаются в источнике энергии для биосинтеза клеточного материала, для роста и для осуществления так называемых «функций поддержания». К данным функциям относятся: оборот клеточного материала, осмотическая работа для поддержания концентрационных градиентов между клеткой и окружающей средой, подвижность клетки и т.д.

На пути превращения, конечные продукты и выход АТФ для того или иного источника энергии или углерода большое влияние могут оказывать концентрация растворенного кислорода, значение рН, температура, ионная сила среды и недостаточное содержание в среде микроэлементов (Płaza, Turek, Król, 2013). На метаболизм источников углерода и энергии могут также оказывать влияние удельная скорость роста и содержание источника углерода – присутствует ли он в избытке или в количестве, лимитирующем рост (Перт, 1978).

Так, отмечено, что при выращивании штамма *B. subtilis* SPB1 на среде с глюкозой выход сурфактина при концентрации в среде глюкозы 40 г/л составил 720 ± 7 мг/л, а при увеличении концентрации глюкозы в среде до 45 г/л, количество сурфактина снизилось до 690 ± 6 мг/л (Ghribi, Ellouze-Chaabouni, 2011). Эти данные подтверждены исследованиями, в ходе которых установлено, что высокая концентрация глюкозы (50-60 г/л) может привести к накоплению избыточной глюкозы в среде, что приводит к низкому рН и, как

следствие, снижению *B. subtilis* производства сурфактина (Chen, Juang, Wei, 2015).

Эти результаты подтверждает многочисленные данные, согласно которым существует некий оптимум насыщения среды питательными компонентами, превышение которого быстро приводит к угнетению роста культуры из-за накопления в среде продуктов ее жизнедеятельности (Перерва, 2011).

Обычно в качестве источников углерода используют углеродсодержащие соединения, которые способны обеспечить хороший рост микроорганизма и высокий уровень биосинтеза метаболитов. Следует отметить, что сахара оказывают разное влияние на метаболизм микроорганизмов. Наиболее часто в состав сред входят сахара: глюкоза, сахароза, мальтоза, галактоза (Duque, Hasan, Bessa, et al., 2012; Medeot, et al., 2017).

Так, в 2013 году были проведены исследования влияния сахарозы на толщину и плотность биопленок, образуемых *B. subtilis*. Отмечено, что на среде, богатой сахарозой, исследуемые штаммы образовывали биопленки толщиной до 140 мкм, что в десятки раз превышало толщину бактериальных пленок на средах, бедных сахарозой. Кроме того, биопленки на средах, обогащенных сахарозой, образовывали более складчатую структуру и были прочнее, что свидетельствует об увеличении механической прочности бактериальных биопленок под действием сахарозы (Dogsa, Brlozник, Stopar et al., 2013). Замена глюкозы на сахарозу в питательной среде для культивирования штамма *B. methylotrophicus* VM47 способствовала увеличению антифунгальной активности исследуемого штамма в отношении *F. oxysporum* в три раза (Tumbariski, Petkov, Denkova, 2015).

Также часто используются соли органических кислот (уксусной, пропионовой, молочной, пировиноградной) и спирты (глицерин, маннит). Так, добавление в среду культивирования *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

уксуснокислого аммония в концентрации 0,10 % и лимоннокислого натрия в концентрации 0,15 % не только сохраняло их антифунгальную активность по отношению к плесневым грибам *A. niger* и *Penicillium granulatum*, но и повышало ее на 14-16 % (Саубенова, 2012).

Часто в промышленном производстве в качестве источника углерода используются крахмал и крахмалсодержащие субстраты (кукурузная, соевая мука и т.д.) (Al-Bahry, Al-Wahaibi, Elshafie et al., 2013). Так, максимальный синтез амилазы штаммом *Bacillus* sp. был отмечен на среде с крахмалом в качестве источника углерода – $80,1 \pm 1,8$ Ед / мл. При этом значительное сокращение амилазной активности изолята наблюдали, когда в среду были внесены ксилоза, сахароза, лактоза и манноза (Khusro et al., 2017).

По данным литературы, уровень накопления биомассы не всегда коррелирует с показателями спорообразования, которое репрессируется, в частности, высоким содержанием сахаров (Хилько, 2004; Мулюкин, Луста, 2006). Кроме того, установлено, что при культивировании бактерий на средах с пшеничными отрубями эффект стимулирования роста и развития растений так же, как и антагонистическая активность культуры, были существенно выше, чем на средах с глюкозой и мелассой. Показатель всхожести семян увеличивался на 7,3-11,4 %, накопление биомассы наземной и корневой частей растений – на 14,7-20,8 % и 18,1-26,5 % соответственно, а диаметр зон ингибирования роста тест-культур *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum* – на 20,5-26,1 % в зависимости от штамма бактерий (Сираева, 2010).

Ученые из Малайзии протестировали в качестве источника углерода отходы производства пальмового масла (ОППА) с целью повышения продукции сурфактина штаммом *B. subtilis* ATCC 21332. Установлено, что быстрый рост бактерий отмечен на средах, содержащих 10, 30 и 50 % ОППА, при 70 % ОППА рост бактериальной культуры существенно замедлялся. Отмечено, что с уменьшением концентрации ОППА в среде, увеличивалась

скорость роста бактериальной культуры. Концентрация ОППА 70 % также оказала негативный эффект на производство сурфактина. Максимальная концентрация сурфактина (30-35 мг/л) была зафиксирована при 50 % ОППА в среде (Abas, Kader, Khalil et al., 2013).

В состав регламентной среды для культивирования аспорогенной культуры *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*, проявляющей высокую инсектицидную активность в отношении насекомых отряда *Lepidoptera*, входят соевая мука, крахмал картофельный и минеральные соли. Существенным недостатком питательной среды является высокая стоимость, обусловленная высокими ценами на компоненты питательной среды. В 2012 году И.Е. Парамоновой с соавторами проведены исследования, целью которых являлся подбор более дешевых и доступных источников углерода для культивирования исследуемого штамма. Установлено, что продуктивность культуры по содержанию белка δ -эндотоксина на питательной среде на основе кормовых дрожжей и кукурузной муки в среднем составила 12,08 мг/мл, на питательной среде на основе кормовых дрожжей и пшеничной муки – 11,72 мг/мл и превысила продуктивность контрольной среды для контроля стерильности (содержание белка – 9,86 мг/мл) в 1,2 раза. Сравнительная оценка стоимости 1 л питательной среды позволила выбрать модифицированные питательные среды не только как продуктивные, но и как наиболее дешевые (Парамонова, Некрасова, Хамзина и др., 2012).

Таким образом, подбор оптимальных источников углеродного питания влияет не только на качество биопрепаратов, но и определяет технологичность процессов промышленного производства.

1.3.4 Источники азотного питания

Метаболизм источника азота обеспечивает главным образом синтез белков, нуклеиновых кислот и полимеров клеточной стенки. Пул аминокислот

в цитоплазме составляет 0,2-5 % веса сухой массы. Азот бактериальных клеток составляет до 12 % веса сухой массы; в грибах – 10 % сухого мицелия (Hernández, Sandoval, Mallerman, et al., 2015).

Различными микроорганизмами могут быть использованы очень многие источники азота, включая неорганические и органические его формы (Sharma, Sharma, Kanwar, 2012; Yoon, Sanford, Löffler, 2015). Так, неорганические источники азота (NH_4NO_3 , NaNO_3) обеспечивали более интенсивную продукцию сурфактина штаммом *B. subtilis* BVk1 (2-2,5 г/л), чем органические (мочевина, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина), при использовании которых выход сурфактина составил 0,5-1 г/л (Abushady, Bashandy, Ibrahim, 2005).

Эта закономерность отмечена в исследованиях по оптимизации среды для культивирования *Pseudomonas aureofaciens* 2006, осуществленных в 2012 году Ю.А. Буровой. Лучший результат отмечен в варианте с нитратной формой азота при концентрации 2 г/л (прирост биомассы 12,5 г/л). Титр активных клеток составил в среднем 10^9 – 10^{10} КОЕ/мл. При использовании аммонийного азота прирост биомассы составил в среднем на 9,5 % меньше предыдущего варианта. В варианте с нитратом аммония максимум биомассы составил 11,4 г/л при концентрации 2 г/л.

Часто фактором роста служат аминокислоты. В клеточном белке индивидуальные аминокислоты составляют 1-5 % от всего белка, на основании чего можно приблизительно оценить количество аминокислот, необходимых в качестве факторов роста. Некоторые бактерии, нуждающиеся в нескольких аминокислотах, растут лучше при внесении в среду одной или более аминокислот в форме пептидов. Так, внесение в среду для культивирования штамма *B. circulans*, выделенного из ризосферы люцерны, DL-метионина в концентрации 4 г/л увеличивало выход цефалоспорина-С, оказывающего выраженный антибактериальный эффект (Abada, El-Hendawy, Osman et al., 2014). Добавление в питательную среду для культивирования *B.*

subtilis ZK-H2 L-аспарагина, L-глутамина, и L-пролина способствовало увеличению синтеза итурина А на 32,81% по сравнению с контролем (Yue, Zhong, Li et al., 2021).

При лимитации роста азотом в биомассе содержится меньше белка, чем при лимитации роста углеродом; например, в дрожжах было обнаружено 30 % белка при лимитировании культуры аммиаком, в то время как при лимитации глицерином количество белка в биомассе дрожжей составило 50 %. Низкое содержание белка при избытке источника углерода является отражением накопления энергетического резерва, такого, как гликоген, в биомассе (Перт 1987).

По мнению некоторых исследователей, для активной продукции бактерицинов возможно использовать бедные по азоту среды, так как в этом случае создаются лучшие условия для их наработки, что дает возможность бактериям конкурировать с другими бактериями в общей экологической нише (Svetoch, Stern, Eruslanov, 2005; He, Kislá, Zhang et al., 2007). Так, установлено, что наибольшая активность протеолитических ферментов отмечена в течение 72 часов культивирования штаммов *B. subtilis* и *B. licheniformis* и при концентрации белка в отрубях пшеницы 1,4 % и 1,6 % в цельно-зерновой муке (Barska, 2014).

При промышленном производстве биопрепаратов в качестве источника азота используются натуральные продукты растительного и животного происхождения (Moghannem et al., 2018). Часто это продукты вторичной переработки, гидролизаты и автолизаты, богатые витаминами, микроэлементами и органическим азотом (Щербаков, Ильязов, Шапошникова, 2014).

Часто основой питательной среды является дрожжевой автолизат, содержащий весь аминокислотный комплекс и витамины группы В. Он является более дешевым и доступным источником органического азота. Так, для культивирования штамма *Azotobacter vinelandii* ЕА 4, являющегося

основой биоудобрения «Азолен», используется среда, в состав которой входит такой дорогостоящий компонент, как дрожжевой экстракт. В ходе исследований по оптимизации состава питательной среды установлено, что добавление в питательную среду дрожжевого автолизата оказывает положительное влияние на титр клеток штамма *A. vinelandii* EA 4 (Леонтьева, 2013). Эта закономерность отмечена и в исследованиях по оптимизации питательной среды для производства биопрепарата «Елена», на основе штамма *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51. В ходе исследований дорогостоящий пептон заменяли на более доступный автолизат отработанных пивных дрожжей. Установлено, что на полученной питательной среде титр клеток составил $2,2 \times 10^{10}$ КОЕ/мл, что удовлетворяет условиям промышленного культивирования микроорганизмов (Четвериков, 2006).

Таким образом, подбор альтернативных источников азотного питания может не только улучшить качество биопрепаратов на основе бактерий, но и снизить себестоимость производства в промышленных условиях.

1.4 Динамика роста штаммов-продуцентов биопрепаратов

На стадии производства биопрепарата необходимо учитывать, что степень проявления полезных свойств микроорганизма-продуцента находится в прямой зависимости не только от его индивидуальных особенностей, но и от условий получения целевого продукта (Berekaa, Zaghoul, Abdel-Fattah, et al., 2009; Хайруллин, Лукьянцев, Уразбахтина, 2010).

Одним из важнейших факторов является время культивирования. Этот фактор может явиться в ряде случаев первостепенным, поскольку обычно описание развития микрофлоры происходит в координатах «численность» – «время».

В процессе культивирования микроорганизмов можно выделить несколько периодов роста.

Лаг-фаза. После внесения в среду посевного материала происходит процесс приспособления посевной культуры к новой среде. Численность популяции в это время не увеличивается (в некоторых случаях даже снижается). Предполагается, что в период лаг-фазы микробные клетки не потребляют субстрата, но метаболическая активность клеток проявляется в повышении содержания белка и РНК, активной выработке ферментов, а также в увеличении объема клеток (Sadouk-Nachaïchi, Tazerouti, Nacene, 2014). По достижении определенных соотношений между величинами поверхности клетки и ее объема происходит деление клетки, вследствие чего численность популяции начинает увеличиваться с возрастающей скоростью. Но даже при фиксированных показателях среды размножения микроорганизмов и работе со строго определенным штаммом нельзя с уверенностью сказать, что через строго определенный промежуток времени клетка поделится на две. Вероятность деления клеток характеризует прирост, а точнее, скорость прироста во времени. Для полноты картины необходимо учитывать продолжительность продуктивного возраста клеток, которая может быть достаточно велика, но протекать без увеличения их численности (Майоров, 2012).

Продолжительность лаг-фазы может увеличиваться при изменении температуры культивирования (Raykova, Peykov, Dimov, 2008; Зими́на, Гази́ева, 2017) или при повышении концентрации желатина в питательной среде (Shafi, Mingshan, Zhiqiu et al., 2017). На продолжительность лаг-фазы может оказать существенное влияние объем посевного материала (Abushady, Bashandy, Ibrahim, 2005). В ходе исследований по определению оптимальных условий культивирования штамма *Cupriavidus euthrophus* В-10646, являющегося продуцентом полигидроксиалканоата, установлено, что при внесении в питательную среду 20 % и 30 % от объема, лаг-фаза продолжалась 8 и 12 часов соответственно. При этом, выход продукта составил 25,0 и 32,0 г/л, соответственно (Volova, Kiselev, Vinogradova et al., 2014).

Экспоненциальная фаза. Или фаза логарифмического роста. По мере увеличения биомассы отчетливее проявляется тенденция к замедлению скорости роста. Продолжительность экспоненциального роста частично зависит от начальной концентрации субстрата, лимитирующего рост.

Стационарная фаза. В среде истощаются питательные вещества и накапливаются продукты обмена, тормозящие рост. Биомасса растет и одновременно происходит гибель части клеток (автолиз), так что общая концентрация сохраняется постоянной. В ранней стационарной фазе размер бактериальных клеток достигает минимума. Для некоторых групп бактерий в стационарной фазе характерно образование эндоспор или экзоспор. В некоторых случаях увеличение синтеза вторичных метаболитов не прямо пропорционально увеличению количества клеток. В исследованиях по оптимизации синтеза итирина А штаммом *B. amyloliquefaciens* HZ-12 отмечено, что максимальное количество биомассы клеток – $(164,2 \pm 6,5) \times 10^8$ КОЕ/мл, достигнуто при 24 ч культивирования. В дальнейшем происходит резкое падение титра, в то время как синтез итирина А возрастает и достигает своего максимума – $(2013,4 \pm 32,8 \text{ мг/л})$ к 72 ч культивирования (Ху, Cai, Zhang et al., 2020).

Фаза отмирания. Или фаза дегенерации культуры, характеризующаяся уменьшением численности популяции. Автолиз в фазе отмирания – это экстремальное проявление нестабильности организма после прекращения роста. В фазе отмирания часто наблюдаются искривленные или разбухшие клетки. Вероятно, это вызвано либо повреждением литическими ферментами, либо слабой регуляцией остаточного синтеза клеточных компонентов.

В настоящее время проводятся многочисленные исследования по изучению параметров периодического культивирования штаммов-продуцентов. Так, в 2012 году Н.В. Шеховцевой с соавторами были проведены исследования кинетических параметров роста бактерий р. *Bacillus*, ассоциированных с подземными органами *Dactylorhiza maculata*. Результаты

исследований показывают, что каждая из четырех культур бактерий обладает специфической кривой роста. Культуры штаммов М и S5 растут в два этапа. Стационарная фаза не выражена: сразу после максимального значения биомассы наблюдается ее снижение. Культура М растет в течение 4-х суток. Удельная скорость роста бактерий М со вторых по четвертые увеличивается более чем в 2 раза. Культура S5 растет в течение 6 суток. Удельная скорость роста со вторых по шестые сутки снижается более чем в 3 раза. Кинетические кривые периодических культур штаммов U и E3 отличаются от кривых роста штаммов М и S5 наличием стационарной фазы. Значение биомассы штамма E3 меньше в 64 раза по сравнению с аналогичным показателем штамма U. Обобщая полученные результаты, можно отметить, что штаммы U и E3 являются быстрорастущими (среднее время генерации составляет 0,6 сут) по сравнению с культурами М (среднее время генерации = 1,3 сут) и S5 (среднее время генерации = 3,1 сут). Штамм U отличается максимальным выходом биомассы, а E3 – минимальным.

Таким образом, изучение особенностей роста бактерий является важным аспектом по оптимизации параметров культивирования штаммов – основы биопрепаратов.

1.5 Оптимизация условий культивирования и разработка технологии получения биопрепаратов

Разработка технологии получения биопрепарата является основой для развития экономически эффективных методов в области проектирования, масштабирования, оптимизации и контроля биотехнологических процессов с целью повышения выхода биомассы или накопления определенных продуктов обмена веществ микроорганизмов, таких как антибиотики или ростстимулирующие вещества (Гордеева, Ивашкин, Гордеев, 2011; Roeva, 2012; Shafi, Sun, Ji et al., 2018).

В 2001 году лабораторией Института биологии Китайской академии наук выделен штамм *B. subtilis* ZK8, обладающий фунгицидной активностью по отношению к широкому спектру патогенов и производящий специфический антибиотик, названный исследователями jіean-пептид, принадлежащий к классу итуринов (Dai-Fu, Zhou, Zhong, 2005). В дальнейшем группой исследователей была проведена оптимизация параметров выращивания штамма *B. subtilis* ZK8. В ходе исследований отмечено, что выход jіean-пептида при культивировании штамма продуцента в течение 36 ч. на оптимизированной среде, содержащей 24 % соевого гидролизата и 0,38 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, увеличился на 41 % по сравнению с контролем и составил $371,3 \pm 32,7$ мг/л (Zhang, Zhou, Fu et al, 2010; Zhong, Zhang, Ren, 2014).

Аналогичные исследования были проведены для расчета параметров культивирования штамма *B. amyloliquefaciens* B15 – продуцента липопептидов. В ходе исследований установлено, что положительный эффект на выход конечного продукта ферментации оказали глюкоза, порошок дрожжевого экстракта и начальный pH, тогда как время сбраживания дало отрицательный эффект. При оптимальных показателях выход липопептидов увеличился с 0,2686 г/л до 0,3309 г/л. Таким образом, производительность процесса увеличилась на 23,19 % (Фань, Чжу, Го, и др. 2015).

В 2006 году С.П. Четвериковым с соавторами была осуществлена оптимизация питательной среды для промышленного производства биопрепарата «Елена». В результате эксперимента была разработана ферментационная среда, на которой антигрибная активность штамма *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 составила 12 ед./мл КЖ, что более чем в 1,5 раза выше, чем в среднем варианте, в то же время титр клеток на данной среде составил 22 млрд КОЕ/мл КЖ, что вполне удовлетворяет условиям промышленного культивирования микроорганизмов.

Исследования, проведенные в целях повышения антибиотической активности штамма *B. subtilis* B38, показали, что лактоза, сукцинат аммония и

MnSO₄ являются определяющими факторами для роста клеток и бактерицидного эффекта против *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteridis* и *Pseudomonas aeruginosa*. Установлено, что максимальная плотность клеток (оптическая плотность_{600нм}=10,2) и высокая антибиотическая активность (360 ед./мл) были получены на среде, в которой содержатся 1,5 % лактозы, 0,1 % сукцината аммония и 0,3 мг/л марганца (Tabbene, Ben Slimene, Djebali et al., 2009).

В 2011 году в отделе микробиологических процессов на твердых поверхностях Института микробиологии и вирусологии НАН Украины была проведена разработка оптимального состава жидкой питательной среды для культивирования в лабораторных условиях *B. subtilis* ИМВ В-7023 – компонента препарата комплексного действия для растений «Комплегран».

В эксперименте задавали следующие уровни исследуемых факторов: меласса, кукурузный экстракт, фосфаты. Выяснено, что максимальный эффект для мелассы был получен при её концентрации 15,0 г/л – титр составил $2,31 \times 10^9$ КОЕ/мл. Максимальные эффекты по влиянию кукурузного экстракта и фосфорнокислых солей соответствовали минимальным значениям их концентраций – на данной среде плотность клеток составляла $1,98 \times 10^9$ КОЕ/мл. Предложенный состав среды значительно дешевле лабораторных сред, которые широко используются для культивирования микроорганизмов этого вида, и может быть рекомендован для использования, как в лабораторных, так и в производственных условиях (Царенко, Рой, Курдиш 2011).

В 2013 году сотрудниками Института биологии УНЦ РАН был проведен ряд экспериментов с целью разработки технологии получения биоудобрения «Азолен». Установлено, что увеличение концентрации сахарозы, дрожжевого автолизата и КН₂РО₄ положительным образом влияет на титр клеток штамма *A. vinelandii* ИБ 4. При этом избыточное содержание в среде азота и фосфора

ведет к снижению антигрибной активности в отношении *B. sorokiniana* Shoem и *F. oxysporum* Schlecht (Леонтьева, Кузина, Логинов, 2013).

Таким образом, разработка технологий получения биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов позволит вывести на рынок конкурентоспособные биопрепараты для защиты сельскохозяйственных культур и снизить отрицательные последствия применения пестицидов.

1.6 Добавки, обеспечивающие увеличение эффективности применения биопрепаратов в сельском хозяйстве

Адьюванты являются автономными продуктами, которые продаются отдельно от биопестицидов. Эти продукты предназначены для смешивания с одним или несколькими пестицидами в резервуарах перед обработкой. Они обеспечивают такие преимущества, как растекание по распыляемой поверхности, устойчивость к смыванию дождем, замедленная деградация при воздействии солнечного света. Недостатки использования адьюванта в баковой смеси включают в себя дополнительные материальные расходы и дополнительные этапы в процессе смешивания (Mesnage, 2018).

Уникальность каждого микробного агента создает дополнительные сложности при рассмотрении конкурирующих ингредиентов, процессов и составов препарата (Tijjani, Bashir, Mohammed et al., 2016; Хужаназарова, Муродова, 2022). Так, культуры, которые являются гидрофобными, нуждаются в тщательном подборе соответствующих поверхностно-активных веществ, легко смешивающихся с водой для распыления (do Nascimento Silva, Mascarin, de Castro, 2019). Эти различия между потребностями микроорганизмов демонстрируют необходимость в уникальных рецептурных решениях для разных микробных пестицидов.

С одной стороны, выбор оптимальной рецептурной формы зависит от физиолого-биохимических и экологических особенностей штамма-

продуцента, трофических потребностей и устойчивости культуры микроорганизма по отношению к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды (Sachdev, Singh, 2016; Павлюшин, Новикова, Бойкова, 2020). С другой стороны, товарная форма обусловлена экологическими условиями и особенностями технологии применения биопестицида (обработка семян, внесение в грунт или обработка растений в процессе вегетирования), а также типом применяемой аппаратуры. Кроме того, необходимо понимание взаимодействия биоагента с патогеном-мишенью. Так, биопестициды для контроля грибов действуют при контакте или конкуренции с патогенами, микробы, применяемые в качестве биостимулятора или биоудобрения для повышения устойчивости растений, проникают в листья растений через устьица (Preininger, Sauer, Bejarano, 2018).

Чрезмерная влажность в виде сильной росы или дождя может смыть биоагенты с поверхности листьев. Одним из способов удержания микроорганизмов на поверхности вегетативных частей растений является добавление прилипателей к баковой смеси для применения, тогда как другой способ включает клейкие агенты в состав биопестицидов (Atanasova-Pancevska, Kungulovski, 2018). Эти агенты обычно состоят из натуральных (углеводные, белковые или другие полимеры) или синтетических химических вещества (этоксилированные феноксиспирты, латексный полимер) (Albuquerque, de Oliveira, dos Santos Silva et al., 2020). Механизм защиты обеспечивается молекулами, которые являются гидрофобными или полимеризуются с образованием нерастворимого в воде остатка для эффективного захвата микробного агента (Sahai, Sinha, Dutta, 2019). Так, добавление в питательную среду ксантановой камеди и патоки улучшает адгезию клеток *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* к кутикуле еловой листовёртки *Choristoneura fumiferena* на 55% (Ndao, Kumar, Tyagi et al., 2019). Биопрепарат на основе *T. longibrachiatum*, в состав которого был включен полиуретан, обеспечивал биологическую эффективность в отношении *Rhizoctonia solani* на

растениях томата на 43% выше, чем в контроле (Mahde, Fayyadh, Al-Luaibi, 2019).

Агрохимические прилипатели используются для увеличения эффективности препаратов на целевых видах, обычно за счет улучшения адгезии и/или удерживания препарата на поверхности листа или за счет увеличения проникновения препарата в растение (Adusei-Fosu, Rolando, Richardson, 2021). На сегодняшний день прилипатели развиваются в сторону многофункциональных добавок с характеристиками, которые делают их трудосберегающими, легкоразлагаемыми и низкотоксичными (Lin, Mao, Zhao, 2023). Комбинация препарата Vertalec (*Akanthomyces dipterigenus*) с прилипателем на основе растительного масла повысила смертность капустной тли *Brevicoryne brassicae* в полевых условиях на 86 % (Prince, Chandler, 2020). Совместное применение препарата Sonata (*B. pumilis*) в сочетании с прилипателем Сильвет обеспечивало снижение развития мучнистой росы, вызываемой *Podosphaera aphanis* на растениях клубники до 3% (Berrie A., Xu, 2021).

В некоторых случаях прилипатели не оказывают на эффективность биопрепаратов положительного эффекта. Так в исследованиях 2017 года отмечено, что совместное применения биопрепарата Serenade (*B. subtilis* QST713) совместно с прилипателем Сильвет Голд обеспечивало защитный эффект в отношении желтой пятнистости листьев, вызванной *Puccinia striiformis*, на уровне контроля (Reiss, Jørgensen, 2017).

Микроорганизмы могут быть защищены от вредной коротковолновой световой энергии путем добавления к составам фотопротекторов. Воздействие солнечного света остается основным фактором снижения эффективности применения микробных пестицидов на полевых растениях. Многочисленные исследования показали, что солнечный свет приводит к быстрой потере жизнеспособности микробов. Естественный солнечный свет, особенно часть ультрафиолетового излучения УФ-В (280–310 нм) и УФ-А (320–400 нм) в

основном отвечают за инактивацию биопрепаратов. УФ-В вызывает прямое повреждение ДНК в виде разрывов цепей и повреждений основания, что может привести к мутациям или нарушениям транскрипции. УФ-А вызывает косвенные повреждения за счет образования радикалов, которые также могут повредить ДНК (Vanhaelewyn, Van Der Straeten, De Coninck, 2020; Enwemeka, Baker, Vumah, 2021).

Фотопротекторы защищают микроорганизмы следующими способами: 1 – в качестве химического солнцезащитного средства, поглощающего коротковолновую энергию: оптические отбеливатели, химические красители, и поглотители (солнцезащитные средства); 2 – в качестве физического солнцезащитного средства, отражающего световую энергию: глины и диоксид титана (do Nascimento, Tabernerо, Cabral Albuquerque et al., 2021).

В составы для фотопротекции включают хромофоры и пигменты. Так, установлено, что конго красный делает устойчивыми к УФ-излучению конидии *M. robertsii* (Licona-Juárez, Bezerra, Oliveira, 2023). Черный меланин, продуцируемый штаммом дрожжей *Hortaea werneckii* EGYNDA08, защищает штамм *B. thuringiensis* subsp. *aegypti* Vt-C18 от дезактивации солнечным светом и увеличивает его биологическую эффективность в отношении личинок хлопкового листового червя *Spodoptera littoralis* в девять раз (Saleh, Abdelrazak, Elsayed, 2018).

Оптические отбеливатели, которые поглощают ультрафиолетовую энергию и преобразуют ее в длину волн безопасного видимого света, могут быть включены в качестве компонентов биопестицида или добавлены в бак для распыления в качестве адъювантов. Кроме того, оптические отбеливатели способны усиливать действие некоторых биопестицидов. В исследованиях 2022 года было установлено, что совместное применение оптического отбеливателя и препарата Лепидоцид (*B. thuringiensis*) обеспечивает смертность личинок червонца непарного *Lycaena dispar* на 36,2% по

сравнению с применением только препарат Лепидоцид (Akhanov, Pavlushin, Polenogova, 2022).

В отличие от химических добавок, способных только поглощать УФ-лучи, физические добавки способны отражать и рассеивать УФ-лучи (Feldbaum, Yaakov, Mani, 2021). Так, внесение в препарат на основе *B. thuringiensis* аморфного диоксида кремния обеспечило жизнеспособность 79,7% спор после воздействия ультрафиолета (УФ-А 385 нм), тогда как жизнеспособность незащищенных спор в этих условиях составила 41,3% (Jalali, Maghsoudi, Noroozian, 2020). Имобилизация *T. viride* и *B. bassiana* на гранулах полимочевины способствовала защите от УФ-излучения и выживаемости 90% клеток (Жемчужина, Фокин, Елизарова и др., 2018).

Таким образом, применение адъювантов позволит улучшить физические и химические свойства биопестицидов и, как следствие, повысить их эффективность в полевых условиях.

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 (приложение 1) из Биоресурсной коллекции ФГБНУ ФНЦБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов». Материалами исследования являлись тест-культуры фитопатогенных грибов – моноспорные 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 параметров 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; биологическая эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении болезней, вызванных грибами р. *Fusarium*.

2.1 Определение культурально-морфологических признаков штаммов бактерий-антагонистов

Культурально-морфологические признаки штаммов-продуцентов изучали на МПА и КГА. Морфологические признаки изучали с

использованием микроскопа Axio Scope A1. Определяли форму и размер клеток, способность к спорообразованию и расположение в клетках спор, способность к движению, окраску по Граму. Изучали особенности роста, форму, размер, поверхность, профиль, цвет, блеск и прозрачность колоний, а также их край, структуру и консистенцию (Градова, Бабусенко, Горнова, 2004; Нетрусов и др., 2005).

2.2 Определение ростстимулирующей активности штаммов бактерий-антагонистов в динамике

Культуры бактерий выращивали на КГА при температуре + 28°C в течение двух суток. Для определения ростстимулирующей активности штаммов в динамике бактериальную массу смывали с ЧП и разбавляли стерильной дистиллированной водой до объема 50 мл. Титр суспензий составлял от 10^7 до 10^9 КОЕ/мл. Полученной суспензией обрабатывали семена пшеницы озимой. Семена выдерживали в водной суспензии в течение двух часов. Далее семена просушивали и оставляли при комнатной температуре на 20-24 ч. По истечении указанного времени осуществляли посев в стаканчики с предварительно прокаленным песком (объемом 0,45 л). В одном варианте по 10 стаканчиков. В каждый стаканчик высаживали по 30 семян, и с момента появления всходов ежедневно производили учет проростков по одному стаканчику каждого варианта в течение 10 суток. Контроль – семена, обработанные дистиллированной водой. Измеряли все проросшие растения. Корневую систему растений тщательно отмывали от песка проточной водой. Осуществляли измерение длины корня и побега каждого проростка. Сырую массу корней и побегов определяли суммарно для всей повторности.

2.3 Определение оптимальных условий культивирования штаммов бактерий-антагонистов

В качестве тестируемых источников углерода в среду вносили сахарозу, глюкозу, мелассу и глицерин. При изучении углеродных источников неизменным компонентом азотного питания служил азотнокислый натрий. При определении оптимальных источников азотного питания испытывали пептон, NaNO_3 , дрожжевой и кукурузный экстракты с неизменным источником углерода глюкозой. В качестве базовой использовали среду Чапека для бактерий (среда собственного приготовления, все компоненты российского производства) (Скворцова, 1981). Для определения оптимальной температуры культивирования штаммы выращивали при температурах 20,0; 25,0; 30,0 и 35,0 °С. Для определения оптимальной рН среды добавлением молочной кислоты или щелочи (4 Н раствор NaOH) реакцию среды устанавливали в пределах 3,0; 6,0; 8,0 и 10,0. рН определяли при помощи рН-метра Sartorius РВ-11 (Германия). При определении оптимальных сроков культивирования использовали периодический способ культивирования в течение 72 часов. Пробы для анализа брали через 8, 16, 24, 36, 48 и 72 ч после начала культивирования.

Пробы подвергались анализу по критериям антибиотической активности и количества колониеобразующих единиц. Антибиотическую активность штаммов определяли модифицированным методом последовательных разведений (Егоров, 2004; Sidorova, Asaturova, Номыак, 2020). Для очистки от клеток бактерий культуральную жидкость центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5810R (Германия) в течение 30 мин (10 000 об./мин) при 15°С и пропускали через мембранный фильтр марки «Millipore» с диаметром пор 0,22 μm . Далее культуральную жидкость вносили в ЧП по 1,0 мл. В ЧП добавляли по 9 мл охлажденной до + 37,0 - + 40,0 °С агаризованной оптимизированной питательной среды и давали агару застыть.

Инокулировали поверхность среды тест-культурой патогена на агаровых блоках *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6. Антибиотическое действие испытуемых бактериальных штаммов определяли по степени развития тест-культуры в сравнении с контролем при температуре + 26,0 °С. Контроль – патоген, посеянный на агаризованную среду с добавлением 1,0 мл стерильных оптимизированной питательной среды. Учеты проводили ежедневно.

Степень ингибирования роста мицелия патогена определяли по формуле (Montealegre, Reyes, Perez, 2003):

$$И = (1 - (A / B)) \times 100, \text{ где} \quad (1)$$

И – ингибирование роста мицелия патогена, %;

А – рост гриба в варианте, мм;

В – рост гриба в контроле, мм.

Жидкие культуры биопрепаратов, полученные на оптимизированной питательной среде, подвергались исследованию по критерию антагонистической активности. В качестве контролей использовали жидкую питательную среду КВ (среда собственного приготовления, все компоненты российского производства) (King, 1954) и КГС. Повторность в каждом опыте – трехкратная.

Определение антагонистической активности исследуемых штаммов проводили методом двойных (встречных) культур (Ваксман, 1947; Егоров 1957) на КГА, среде КВ и агаризованной оптимизированной среде (ориг.). В ЧП высевали агаровый блок с мицелием патогена, бактериальный штамм при этом наносили методом штриха на расстоянии 6 см от блока патогена. Культуры инкубировали в течение 20 дней при температуре + 28 °С. Контрольные варианты – чистые культуры гриба патогена и бактерии, посеянные отдельно. Учеты проводили на 5-е, 10-е, 15-е и 20-е сутки. Отмечался характер взаимоотношений гриба и бактерии: наличие или

отсутствие зон, их размер, изменение цвета, плотности, толщины и направления роста мицелия патогена.

Степень ингибирования роста мицелия патогена определяли по формуле (Montealegre, Reyes, Perez, 2003):

$$И = (1 - (A / B)) \times 100, \text{ где} \quad (2)$$

И – ингибирование роста мицелия патогена, %;

А – рост гриба в варианте, мм;

В – рост гриба в контроле, мм.

Для всех опытов жидкую культуру биопрепарата получали методом периодического культивирования. Инкубацию осуществляли в термостатированных системах культивации клеток (180 об./мин) New Brunswick Scientific Excella E25 (США) в течение 48 ч. Периодическое культивирование осуществляли в конических колбах (350 мл) с объемом питательной среды 100 мл и предварительным внесением посевной (маточной) культуры (2,0 % от объема питательной среды). Маточную культуру получали методом внесения агаризованных блоков с исследуемыми штаммами в конические колбы и последующим культивированием (Асатурова, 2008).

По окончании культивирования во всех опытах определяли численность бактериальных клеток. Для изучения количественных закономерностей роста популяций исследуемых штаммов при различных условиях использовали метод Коха (Практикум по микробиологии, 2005). Определение числа клеток этим методом включает три этапа: приготовление разведений, посев на питательную среду в ЧП.

1,0 мл исследуемой суспензии стерильной пипеткой переносили в колбу с 99,0 мл стерильной воды. Для приготовления разведений стерильную водопроводную воду разливали по 9,0 мл в стерильные сухие пробирки. Затем

отбирали 1,0 мл суспензии из колбы и переносили в пробирку с 9,0 мл стерильной воды. Полученное разведение тщательно перемешивали, несколько раз вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную суспензию клеток. Таким же образом готовили все последующие разведения. Высев исследуемой ЖК осуществляли глубинным способом. Для этого по 1,0 мл из соответствующего разведения переносили в три стерильные ЧП. Затем заливали в чашки по 15,0-20,0 мл среды, расплавленной и остуженной до + 45,0 - + 50,0 °С, и смешивали питательную среду с посевным материалом легкими вращательными движениями, после чего чашки оставляли на горизонтальной поверхности до застывания среды. Колонии бактерий подсчитывали через пять-семь суток инкубации. Количество клеток в 1,0 мл исследуемой ЖК вычисляли по формуле:

$$T = \frac{a \times 10^n}{V}, \text{ где} \quad (3)$$

T – КОЕ в 1,0 мл;

a – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения;

V – объем суспензии, взятый для посева;

10^n – коэффициент разведения.

Подсчет выросших колоний осуществляли с использованием системы для автоматического подсчета колоний Color Qcount, Spiral Biotech (США).

2.4 Выделение, хроматографический анализ и анализ антифунгальной активности бактериальных метаболитов

Выделение антифунгальных метаболитов из стерильного супернатанта осуществляли путем экстракции этилацетатом с последующим упариванием

этилацетатной фракции и проведением анализа сухого остатка с помощью восходящей тонкослойной хроматографии на хроматографических пластинах Kieselgel 60 фирмы Merck с УФ индикатором (толщина слоя 2 мм), подвижная фаза этилацетат-этанол-вода 40:15:15. Пластины разгоняли на высоту 12 см, а затем анализировали под УФ светом при $\lambda = 366$ нм. Для выявления химической структуры групп, которые, вероятно, могут обеспечить биологическую активность изучаемых компонентов, хроматографические пластины опрыскивали растворами детектирующих реактивов (Кирхнер, 1981):

- 1) свежеприготовленная смесь 0,1М FeCl₃ и 0,1М феррицианида калия (1:1);
- 2) 20 % раствор Na₂CO₃ и разбавленный (1:3) реактив Фолина;
- 3) 0,25 % раствор нингидрина в этаноле;
- 4) 0,5 % раствор соли «прочной красной В», затем 0,1 н раствор NaOH. Для выявления поверхностно-активных веществ пластины опрыскивали дистиллированной водой с последующим прогреванием в течение 5 мин. при 110°C.

Степень фунгитоксичности выделенных компонентов оценивали методом биоавтографии (Сидорова, 2002; Сидорова, Асатулова, Хомяк и др., 2019) с применением в качестве тестового гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6. Наличие зон ингибирования роста тест-культуры гриба свидетельствовало о присутствии антифунгальных метаболитов, а их вид и размер позволял дать визуальную оценку их активности. В качестве стандартов антифунгальных липопептидов использовали коммерческие реактивы фенгицин, итурин А и сурфактин Sigma-Aldrich (США).

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

Определение биологической эффективности осуществляли на фоне искусственного заражения семян пшеницы озимой сорта Батько грибом *F. graminearum* BZR F-4 в условиях камеры непрерывного роста растений Binder KWWF 720 (Германия) при температуре 24°C, влажности 65% и освещенности 5000 люкс.

Для опыта использовали прокаленный и просеянный песок, смешанный с инфекционным порошком фузариума. Для приготовления инфекционного порошка чистую культуру *F. graminearum* BZR F-4 выращивали на стерильном проавтоклавиновом зерне в течение 10 дней при комнатной температуре и с доступом света. Затем инокулированное зерно измельчали при помощи лабораторной мельницы ИКА А 11 basic (Германия) до состояния однородного порошка. Песок, смешанный с инфекционным порошком в соотношении 1:60, оставляли в климатической камере на 5 дней для приживаемости патогена.

Семена обрабатывали ЖК штаммов ручным способом, расход рабочего раствора из расчета 10 л/т. В качестве химического эталона использовали фунгицид Кинто Дуо, КС (триконозол 20 г/л + прохлораз 60 г/л) с нормой расхода 2,5 л/т, в качестве биологического эталона – биопрепарат Фитоспорин – М, Ж (*B. subtilis*, 26Д) с нормой расхода 1,0 л/т. Титр ЖК штамма *B. subtilis* BZR 336g $3,1 \times 10^9$ КОЕ/мл, штамма *B. subtilis* BZR 517 – $4,1 \times 10^9$ КОЕ/мл. Для достоверной оценки защитного действия семян, обработанные ЖК штаммов, перед посевом предварительно проращивали в ЧП в течение трех дней. Проклюнувшиеся семена высевали в стаканы по 30 штук в каждый, повторность опыта трехкратная. На 15-е сутки инкубирования в климатической камере корни проросших растений отмывали и осуществляли учет поражения корневыми

гнилями согласно Методическим указаниям по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве (Долженко, 2009):

0 – признаки поражения отсутствуют;

1 – на первичных и вторичных корнях – отдельные участки бурого цвета;

2 – основание стебля белёсое или слегка бурое, отдельные корни или значительные участки их бурые;

3 – основание стебля тёмное с перехватом, большая часть корней отмерла;

4 – отсутствие продуктивных стеблей при наличии симптомов по баллу 3.

По результатам балльной оценки пораженных растений определяли развитие и распространенность болезни по следующим формулам (Долженко, 2009):

$$R = \frac{\sum(a \times b) \times 100}{N \times K}, \text{ где} \quad (4)$$

R - развитие болезни, %

a - количество растений с одинаковым баллом поражения (b);

\sum - сумма произведений, $a \times b$;

N - общее число растений в варианте;

K - высший балл шкалы учета.

Распространенность болезни рассчитывали по формуле:

$$P = \frac{n}{N} \times 100, \text{ где} \quad (5)$$

P - распространенность болезни, %

n - число больных растений в варианте;

N - общее число растений в варианте.

Биологическую эффективность рассчитывали по формуле Эббота:

$$C = \frac{100 \times (P - p)}{P}, \text{ где} \quad (6)$$

C - биологическая эффективность, %;

P - развитие болезни в контроле, %;

p - развитие болезни в варианте, %.

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

Почвенно-климатические условия

Испытания лабораторных образцов биопрепаратов на фоне естественного заражения в условиях мелких делянок были проведены в течение трех лет в период с 2012 по 2015 гг. на экспериментальной базе ФГБНУ ФНЦБЗР.

Территория, согласно агроклиматическому районированию, относится к центральной зоне Краснодарского края. Почвенный покров этой зоны представлен черноземом, выщелоченным сверхмощным слабогумусным на лессовидных суглинках (Кириченко, 1953).

Природные условия Краснодарского края характеризуются заметной сменой биоклиматических факторов, что определяет своеобразие функционирования микробных сообществ почв, которые обеспечивают интенсивность образования и накопления гумуса, его структурно-функциональные особенности (Лобанов, Александрова, Шурай, 2015).

Климат в центральной зоне края умеренно-континентальный с умеренно теплыми весной и осенью. Для региона свойственна периодичность (цикличность) осадков, особенно в феврале – марте при интенсивных восточных и северо-восточных ветрах (свыше 15 м/сек.), большие годовые и суточные колебания показателей температуры, влажности воздуха, продолжительности светового дня, интенсивности солнечной инсоляции, широкое варьирование количества выпадающих осадков по месяцам, сезонам и годам (Лобанов, Александрова, Шурай, 2015).

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 до 67 %. 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 % (приложение 2, таблица 1). Анализ метеорологических условий по данным метеостанции «Круглик» за период проведения исследований по диссертационной работе (2013-2015 гг.) представлен в приложении 2, таблица 2.

Схема мелкоделяночного опыта, 2013 гг.

1. Контроль – посев семян, обработанных водой
2. Химический эталон – Раксил, КС (обработка семян, норма расхода препарата – 0,5 л/га) + Альто Супер, КЭ (обработка растений, норма расхода препарата – 0,5 л/га)
3. BZR 336g *B. subtilis* (норма расхода препарата 3,0 л/т)
4. BZR 517 *B. subtilis* (норма расхода препарата 2,0 л/т)

Схема мелкоделяночного опыта, 2014 гг.

1. Контроль – посев семян, обработанных водой
2. Химический эталон – Раксил, КС (обработка семян, норма расхода препарата – 0,5 л/га) + Альто Супер, КЭ (обработка растений, норма расхода препарата – 0,5 л/га)
3. Биологический эталон – Фитоспорин-М, Ж (норма расхода препарата 1,0 л/т)
4. *B. subtilis* BZR 336g (норма расхода препарата 3,0 л/т)
5. *B. subtilis* BZR 517 (норма расхода препарата 2,0 л/т)

Схема мелкоделяночного опыта, 2015 гг.

1. Контроль – посев семян, обработанных водой
2. Химический эталон – Раксил, КС (обработка семян, норма расхода препарата – 0,5 л/га) + Альто Супер, КЭ (обработка растений, норма расхода препарата – 0,5 л/га)

3. Биологический эталон – Фитоспорин-М, Ж (норма расхода препарата 1,0 л/т)
4. *B. subtilis* BZR 336g (норма расхода препарата 3,0 л/т)
5. *B. subtilis* BZR 517 (норма расхода препарата 2,0 л/т)

Для закладки опыта в условиях мелких делянок осуществляли предпосевную обработку семян пшеницы озимой в лабораторных условиях ручным способом за день до посева. Контрольные варианты обрабатывали дистиллированной водой. В качестве химического эталона использовали Раксил, КС (тебуконазол 60 г/л) с нормой расхода препарата 0,5 л/т, в качестве биологического эталона – Фитоспорин - М, Ж (*B. subtilis* 26 Д) с нормой расхода препарата 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. Опытные участки располагали по предшественнику люцерна.

В течение вегетации растения пшеницы озимой два раза обрабатывали профилактически лабораторными образцами биопрепаратов и эталонами в фазу выхода в трубку (Z 32-35) и в фазу колошения (Z 51-59) (Zadoks et al., 1974). Норма расхода рабочей жидкости составляла 300 л/га. Рабочую жидкость готовили непосредственно перед обработкой. В качестве химического эталона использовали Альто Супер, КС (пропиконазол + ципроконазол, 250 + 80 г/л). В качестве биологического эталона – Фитоспорин-М, Ж (*B. subtilis* 26 Д).

Для определения эффективности обработок в течение вегетации проводили учеты корневых гнилей до обработки и через неделю после. Для учета биологической эффективности выкапывали по 30 растений с трех разных мест каждой делянки. Растения очищали от почвы, тщательно промывали и делали учет согласно шкале поражения корневыми гнилями.

Затем рассчитывали развитие болезни, распространенность и биологическую эффективность (Долженко, 2009).

Распространенность (7) и развитие (8) болезней рассчитывали по следующим формулам:

$$P = \frac{n \times 100}{N}, \quad \text{где} \quad (7)$$

P – распространенность болезни, %

n – число больных растений в варианте, шт.

N – общее число растений в варианте,

$$R = \frac{\sum(a \times b) \times 100}{N \times K}, \quad \text{где} \quad (8)$$

R – развитие болезни, %

a – количество растений с одинаковым баллом поражения (b)

\sum – сумма произведений $a \times b$

N – общее число растений в варианте

K – высший балл шкалы учета

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).

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

Для определения оптимального прилипателя для совместного применения с лабораторными образцами штаммов *B. subtilis* BZR 336 g и *B. subtilis* BZR 517 были протестированы следующие продукты: Адю, 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 органосиликоновых ПАВ и алкоксилатов). Сравнение осуществляли с лабораторными образцами биопрепаратов в форме ЖК без добавления прилипателей.

Совместимость штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 с прилипателями определяли модифицированным методом диффузии в агар (Ваксман, 1947). В центре ЧП с МПА делали лунку, в которую вносили 0,1 мл раствора исследуемого прилипателя. На поверхность среды наносили суспензию штамма, с помощью стеклянного шпателя перенесенную с ЧП. Учеты проводили на седьмые сутки культивирования. О совместимости прилипателей со штаммами судили по наличию зон ингибирования, изменению морфологии штамма-продуцента.

Для определения влияния прилипателей на количество колониеобразующих единиц и антифунгальную активность ЖК штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 смешивали с прилипателями в соотношении, рекомендованном производителем.

Количество колониеобразующих единиц определяли методом Коха (Нетрусов, 2005). Исследование антифунгальной активности проводили методом двойных (встречных) культур (Ваксман, 1947). Антифунгальную активность определяли по формуле (Montealegre, Reyes, Perez, 2003):

$$И=(1-(A/B))\times 100, \text{ где} \quad (9)$$

И – ингибирование роста мицелия патогена, %;

А – рост гриба в варианте, мм;

В – рост гриба в контроле, мм.

Бактериальные экзометаболиты выделяли путем экстракции этилацетатом (х.ч.) (2:1 v/v) супернатанта, полученного после центрифугирования лабораторных образцов биопрепарата на основе штаммов

B. subtilis BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на центрифуге 5810R в течение 30 мин., при 10 тыс. об./мин. на орбитальном шейкере Biosan PSU-20i (Латвия) в течение 1 ч. После разделения органической и водной части этилацетат упаривали досуха на ротационном вакуумном испарителе ИКА RV10 (Германия) при температуре 40 °С. Сухой остаток растворяли в минимальном количестве этилацетата. Полученный раствор был проанализирован методом восходящей тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием кизельгелевых ТСХ-пластин (толщина слоя 2 мм) Merck (Германия), подвижная фаза: этилацетат-этанол-вода 40:15:15, высота подъема растворителя 12 см. ТСХ-пластины затем были проанализованы под ультрафиолетовым светом при длине волны 366 нм. Выявление метаболитов с антигрибной активностью проводили методом биоавтографии (Сидорова, 2002; Сидорова, Асатурова, Хомяк и др., 2019) с применением в качестве тестового гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6.

Биологическую эффективность лабораторного образца биопрепарата на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 с прилипателями определяли на фоне искусственного заражения *F. graminearum* BZR F-21 в условиях климатической камеры. В стаканы с 300 г чистого песка вносили по 1 г инокулята и осуществляли посев семян, предварительно обработанных рабочим раствором лабораторных образцов биопрепарата на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в смеси с прилипателями. Растения помещали в климатическую камеру Binder KWWF 720 (Германия) на 12 суток. Учет поражения корневыми гнилями осуществляли согласно Методическим указаниям по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве (Долженко, 2009):

- 0 – признаки поражения отсутствуют;
- 1 – на первичных и вторичных корнях – отдельные участки бурого цвета;
- 2 – основание стебля белёсое или слегка бурое, отдельные корни или значительные участки их бурые;

3 – основание стебля тёмное с перехватом, большая часть корней отмерла;

4 – отсутствие продуктивных стеблей при наличии симптомов по баллу 3.

По результатам балльной оценки пораженных растений определяли развитие и распространенность болезни по следующим формулам (Долженко, 2009):

$$R = \frac{\sum(a \times b) \times 100}{N \times K}, \text{ где} \quad (10)$$

R – развитие болезни, %;

a – количество растений с одинаковым баллом поражения (b);

\sum – сумма произведений $a \times b$;

N – общее число растений в варианте;

K – высший балл шкалы учета.

Распространенность болезни рассчитывали по формуле:

$$P = \frac{n}{N} \times 100, \text{ где} \quad (11)$$

P – распространенность болезни, %;

n – число больных растений в варианте;

N – общее число растений в варианте.

Биологическую эффективность рассчитывали по формуле Эббота:

$$C = \frac{100 \times (P - p)}{P}, \text{ где} \quad (12)$$

C – биологическая эффективность, %;

P – развитие болезни в контроле, %;

p – развитие болезни в варианте, %.

Повторность во всех опытах трехкратная. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием многогранового теста Дункана многофакторного дисперсионного анализа 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 (таблица 1).

Таблица 1 – Морфологические признаки клеток штаммов бактерий-антагонистов

Признак	Штамм	
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g	<i>B. subtilis</i> BZR 517
Форма клеток и их расположение	палочковидные с закругленными концами, одиночные или соединены попарно	палочковидные с закругленными концами, одиночные или соединены попарно
Размер клеток, мкм	0,46-0,75 x 1,42-1,92	0,49-0,76 x 2,07-3,30
Способность к спорообразованию	имеются споры	имеются споры
Способность к движению, тип движения	клетки подвижны	клетки подвижны
Окраска по Граму	положительная	положительная

Культуральные признаки штаммов бактерий-антагонистов изучали на двух средах: МПА и КГА (таблица 2). На МПА форма колоний штамма *B. subtilis* BZR 336g ризоидная с неправильным или лопастным краем, штамма *B. subtilis* BZR 517 – круглая с фестончатым краем. Колонии у штамма *B. subtilis* BZR 336g блестящие, бесцветные, тогда как у штамма *B. subtilis* BZR 517 матовые в центре, блестящие по краю, бесцветные. Профиль колоний плоский. Структура колоний *B. subtilis* BZR 336g мелкозернистая, штамма *B. subtilis* BZR 517 – струйчатая в центре, мелкозернистая по краю. Консистенция

мягкая, колонии прилипают к петле. Диаметр колоний у штамма *B. subtilis* BZR 336g 3-8 мм, у штамма *B. subtilis* BZR 517 – 2-5 мм.

Таблица 2 – Культурально-морфологические признаки колоний штаммов бактерий-антагонистов

Признак	Штамм			
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g		<i>B. subtilis</i> BZR 517	
	МПА	КГА	МПА	КГА
Форма колоний	ризоидная	ризоидная	круглая	ризоидная
Диаметр колоний, мм	3-8	4-9	2-5	4-8
Край колоний	неправильный, лопастный	лопастный	фестончатый	волнистый
Профиль колоний	плоский	изогнутый	плоский	изогнутый
Оптические свойства поверхности колоний	блестящие, бесцветные	матовые, кремово-желтого цвета	матовые в центре, блестящие по краю, бесцветные	матовые в центре, блестящие по краю, кремового или желто-коричневого цвета
Структура колонии	мелкозернистая	крупнозернистая в центре, мелкозернистая по краю	струйчатая в центре, мелкозернистая по краю	мелкозернистая
Консистенция	мягкая	мягкая	мягкая	мягкая

На КГА формируются колонии ризоидной формы с лопастным краем у штамма *B. subtilis* BZR 336g, с волнистым краем у штамма *B. subtilis* BZR 517. Колонии у штамма *B. subtilis* BZR 336g матовые, кремово-желтого цвета, тогда как у штамма *B. subtilis* BZR 517 колонии матовые в центре, блестящие по краю, кремового или желто-коричневого цвета. Профиль колоний изогнутый. Структура колоний штамма *B. subtilis* BZR 336g крупнозернистая в центре, мелкозернистая по краю, штамма *B. subtilis* BZR 517 – мелкозернистая. Консистенция мягкая, колонии прилипают к петле. Диаметр колоний штамма *B. subtilis* BZR 336g 4-9 мм, штамма *B. subtilis* BZR 517 – 4-8 мм.

В результате секвенирования фрагментов участков вариантов гена 16S РНК исследуемые штаммы отнесены к виду *B. subtilis*.

3.2 Ростстимулирующая активность штаммов бактерий-антагонистов в динамике

Многие бактерии р. *Bacillus* обладают способностью стимулировать рост растений. Эти виды бактерий названы ризобактерии, стимулирующие рост растений (PGPR). На их основе было разработано множество биопрепаратов с иммуно- и рострегулирующими свойствами (гамаир, алирин, экстрасол, фитоспорин и др.) (Рябчинская, Зимина, 2017). Положительное влияние ризобактерий на рост растений достигается как прямым, так и косвенным воздействием. Прямые методы включают производство соединений, которые стимулируют прорастание семян и рост растений, таких как индол-3-уксусная кислота (ИУК), гиббереллины и цитокинины (Goswami et al., 2016). Косвенный механизм осуществляется за счет усиления системной устойчивости и антибиоза (Hashem et al., 2019). Кроме того, виды бактерий р. *Bacillus* также могут действовать как биоудобрения или биостимуляторы, облегчая поглощение определенных питательных веществ из окружающей среды (фиксация азота, солюбилизация фосфатов) (Miljaković et al., 2020).

В наших исследованиях отмечено положительное влияние штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на рост и развитие растений пшеницы озимой в динамике в лабораторных условиях (таблица 3). Установлено, что статистически достоверная разница по отношению к контролю по таким критериям как длина корня и побега, зафиксирована на третьи-четвертые и на восьмые-десятые сутки учетов.

В вариантах с применением исследуемых штаммов показатели длины побега и корня в этот период продолжали превышать показатели в контроле и биологическом эталоне. Так, применение штаммов бактерий способствовало увеличению длины побега на 2,4-17,1%, длины корня на 8,0-37,3%, массы побега на 5,5-24,5%, массы корня на 4,1-48,8 %, по сравнению с контролем. Такое воздействие на растения, начиная с самых ранних этапов развития, в

дальнейшем способствует снижению развития болезней и увеличению урожайности. Установлено, что обработка семян пшеницы озимой штаммами оказывает большее влияние на развитие корней, чем побегов.

Таблица 3 – Влияние штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на биометрические показатели растений пшеницы озимой сорт Батько в динамике, 2012 г.

Длина побега, прибавка в %				Масса побега, прибавка в %		
Сут.	Контроль *	<i>B. subtilis</i> BZR 336g	<i>B. subtilis</i> BZR 517	Контроль *	<i>B. subtilis</i> BZR 336g	<i>B. subtilis</i> BZR 517
1	4,1 ^a	2,4 ^a	0 ^c	-	-	-
3	9,7 ^a	15,5 ^c	3,1 ^a	0,042 ^a	0 ^a	0 ^a
5	15,0 ^a	4,0 ^a	2,0 ^a	0,068 ^a	0 ^a	0 ^a
7	16,2 ^a	5,6 ^a	14,8 ^b	0,091 ^a	5,5 ^{ab}	0 ^a
9	18,6 ^a	0,5 ^a	0 ^a	0,097 ^a	6,2 ^b	18,6 ^b
Длина корня, прибавка в %				Масса корня, прибавка в %		
1	5,8 ^a	11,9 ^a	37,3 ^a	-	-	-
3	8,6 ^c	26,7 ^a	11,6 ^a	0,046 ^a	8,7 ^{ab}	4,3 ^{ab}
5	12,1 ^a	0 ^a	11,5 ^b	0,065 ^a	30,8 ^b	7,7 ^{ab}
7	11,7 ^a	14,5 ^b	24,8 ^{ab}	0,087 ^a	12,6 ^b	17,2 ^b
9	11,4 ^{ab}	11,9 ^b	37,3 ^a	0,084 ^a	48,8 ^b	23,8 ^b

* Контроль указан в мм, г
Математический анализ по методу Дункана был произведен при обработке абсолютных величин в мм, абсолютная величина переведена в проценты для выявления разницы по эффективности между штаммами бактерий-антагонистов и по сравнению с контролем. Между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах строк нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности

В динамике изменения массы побега прослеживалась следующая закономерность: до пятых суток с момента появления всходов масса побега в контроле превышала массу побега в вариантах с применением бактериальных штаммов, а с пятых, наоборот, масса побега в контроле была ниже.

Существенное увеличение массы корня по сравнению с контролем для обоих штаммов отмечено на восьмые-десятые сутки вегетации. Вероятно, это обусловлено способностью штаммов *B. subtilis* синтезировать ИУК, контролирующую широкий спектр функций роста и развития и действующую

как ключевой компонент в формировании корня растения, дифференцировке корневой сосудистой ткани, регуляции боковых корней и т.д. (Ansari, Ahmad, Pichtel, 2019).

На третьи-четвертые сутки для контроля отмечено статистически достоверное снижение интенсивности развития биомассы растений (Асатурова, Томашевич, Дубяга и др., 2023). Вероятно, это объясняется исчерпанием запасов питательных веществ в эндосперме, и переходом растений на внешнее питание. Для вариантов, обработанных суспензией бактериальных штаммов отсутствие подобного снижения, вероятно, обусловлено тем, что содержание ауксинов и цитокининов возрастает в 1,5-2,0 раза на первые сутки после обработки бактериальными культурами, способствуя дальнейшему интенсивному росту (Кудоярова, Высоцкая, Архипова и др., 2016). Такое воздействие на растения, начиная с самых ранних этапов развития, в дальнейшем способствует снижению развития болезней и увеличению урожайности.

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 для увеличения количества колониобразующих единиц и антфунгальной активности

При культивировании микроорганизмов р. *Bacillus* большое значение для спорообразования, синтеза ферментов и накопления их в ЖК имеют источники углеродного и азотного питания (Щербаков, Ильязов, Шапошникова, 2014).

В результате проведенных исследований высокое 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 (таблица 4).

Меласса была отмечена в многочисленных исследованиях по оптимизации параметров выращивания штаммов-продуцентов биопрепаратов (Garcha, Kansal, Gosal, 2019; Gojgic-Cvijovic, Jakovljevic, Loncarevic, et al., 2019; Борисовец, Журавлева, Зуйкевич и др., 2020). Являясь источником не только сахаров, но и витаминов, макро- и микроэлементов, она обеспечивает активный рост культур микроорганизмов.

Таблица 4 – Влияние источников углеродного питания на рост штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в процессе периодического культивирования

Источник питания	Титр ЖК, КОЕ/мл	
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g	<i>B. subtilis</i> BZR 517
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

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

Для выявления возможных механизмов антагонистических взаимодействий бактерий с грибами рода *Fusarium* была изучена их антибиотическая активность модифицированным методом разведений (Егоров, 2004). Антибиотическая активность бацилл имеет широкий спектр действия в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов – бактерий, грибов, простейших и вирусов. Образование специфических продуктов обмена – антибиотиков, угнетающих или полностью подавляющих развитие организмов

других видов, является наиболее существенной и яркой формой антагонизма, широко распространенной в мире микроорганизмов. Количество изученных антибиотиков, продуцируемых *B. subtilis*, составляет несколько десятков (около 70) (Штерншис, Джалилов, Андреева, 2004). Они продуцируют широкий круг антибактериальных и антифунгальных веществ как рибосомальной природы (субтилин, субтилозин, тасА и субланцин), так и не рибосомальной (хлоротетраин, микобациклин, ризатацин, бациллин, диффицидин, липопропротеиды сурфактин, итурин, фенгицин) (Смирнов, Василевская, Резник, 1985; Martin, Abawi, Hoch, 1987; Koumoutsis, Chen, Henne et al., 2004).

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 (таблица 5, рисунок 1).

Таблица 5 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum var. orthoceras* BZR F-6 в зависимости от источника углеродного питания в процессе периодического культивирования

Источник питания	Ингибирование патогена, %, сут.							
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g				<i>B. subtilis</i> BZR 517			
	1	2	3	4	1	2	3	4
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

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

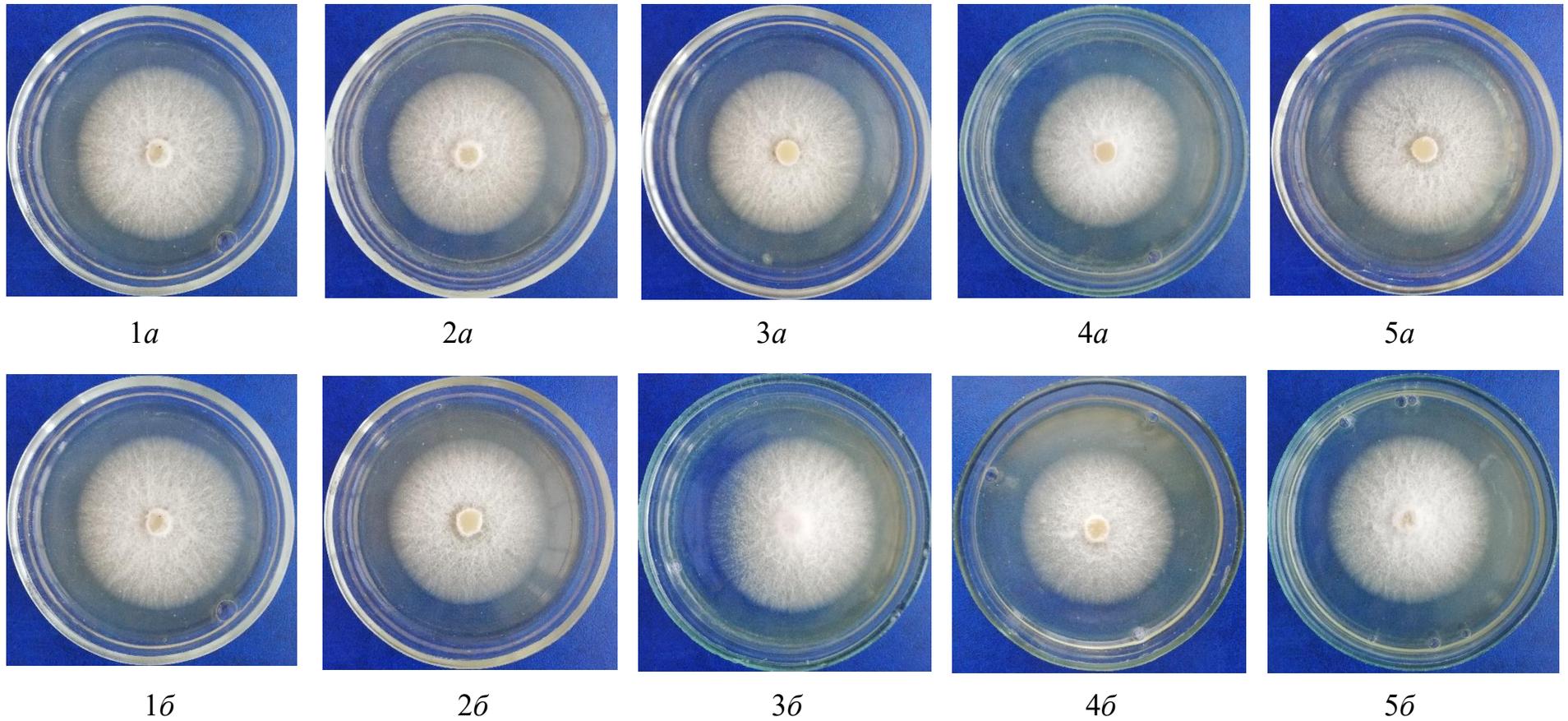


Рисунок 1 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от источника углеродного питания в процессе периодического культивирования (ориг.)

1 – контроль; 2 – сахароза; 3 – глюкоза; 4 – меласса; 5 – глицерин;

a – штамм *B. subtilis* BZR 336g; *б* – штамм *B. subtilis* BZR 517

Полученные результаты согласуются с исследованиями, проведенными Oyedele с соавторами в 2014 г., в результате которых установлено, что глюкоза и сахароза в питательной среде для культивирования штаммов *B. subtilis* DB4 и *B. subtilis* B6 показали минимальную эффективность – процент ингибирования *F. oxysporum* не превысил контрольные показатели (Oyedele et al., 2014).

Тонкослойная хроматография позволяет одновременно анализировать различные образцы культуральных жидкостей и сравнивать профили бактериальных метаболитов в одних и тех же аналитических условиях. Визуализация хроматограмм является гибким методом, поскольку для множественного обнаружения метаболитов можно использовать различные реагенты и обнаруживать не только физиологические различия между видами или штаммами, но и поведение генетически похожих штаммов внутри вида при различных условиях культивирования (Kruse, Pierre, Morlock, 2021).

Хроматографический анализ показал, что максимальный синтез обоими штаммами разнообразных метаболитов отмечен на среде с мелассой, тогда как добавление в среду простых сахаров обеспечивало слабый выход метаболитов (рисунок 2,3). Вероятно, это обусловлено тем, что сам углерод оказывает незначительное влияние на синтез вторичных метаболитов, и большее значение имеют витамины и аминокислоты, входящие в состав мелассы, т.е. необходимо, чтобы источник углерода находился в определенном равновесии с другими элементами питания (например, с азотом).

Биоавтографические исследования подтвердили результаты, полученные в опытах по определению антибиотической активности штаммов. Фенгицин, итурин А, сурфактин и их гомологи — это циклические липопептиды, которые ингибируют рост фитопатогенных грибов. Это проявляется на биоавтограммах, при этом идентифицировать липопептид возможно по двум критериям: хроматографической подвижности (R_f) и характеру роста гриба в зоне ингибирования. Экспериментальным путем с помощью стандартных соединений установлено, что R_f для фенгицина 0,10-

0,13, для итурина А – 0,20-0,31, для сурфактина – 0,70-0,73. При этом фенгицин, сурфактин и их гомологи подавляют рост гриба частично (фунгитоксичность), тогда как итурин А и его гомологи полностью ингибируют рост гриба (фунгицидность).

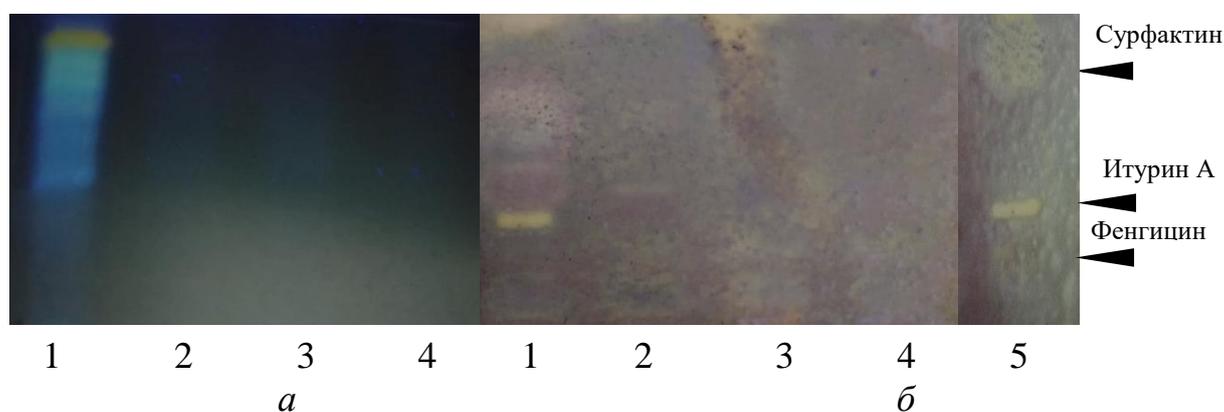


Рисунок 2 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 336g (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

1 – меласса; 2 – глюкоза; 3 – сахароза; 4 – глицерин; 5 – стандартный раствор липопептидов

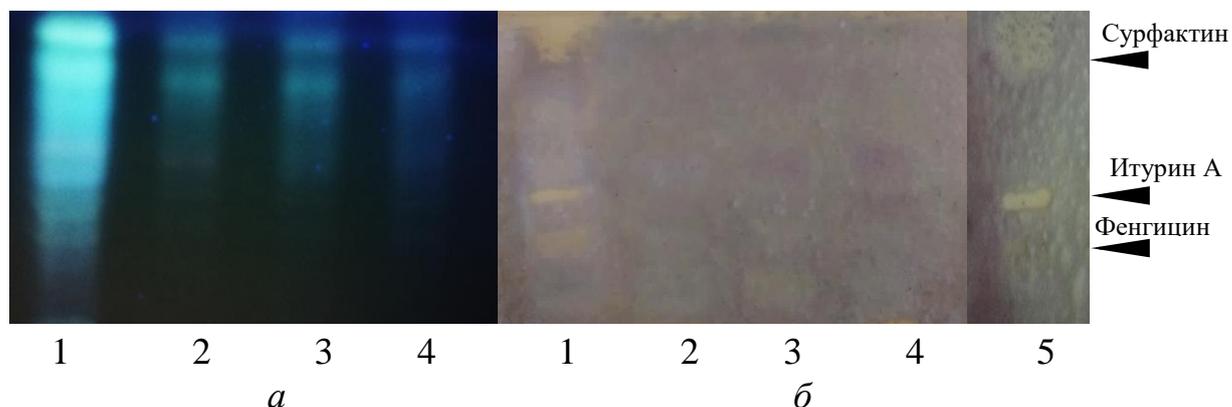


Рисунок 3 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

1 – меласса; 2 – глюкоза; 3 – сахароза; 4 – глицерин; 5 – стандартный раствор липопептидов

Установлено, что добавление в среду для культивирования мелассы способствовало синтезу соединений итуриновой структуры, в то время как применение сахарозы обеспечивало синтез сурфактиноподобных соединений.

Подобные результаты были получены в исследованиях по влиянию источников питания на фунгицидную активность штамма *B. amyloliquefaciens* AR2, в ходе которых установлено, что липопептиды в виде смеси сурфактина, итурина и фенгицина штамм продуцировал только на среде с сахарозой, в то время, как добавление в среду мальтозы, лактозы и сорбита обеспечивало только синтез итурина (Singh, Rautela, Cameotra, 2014).

Результаты исследования по определению оптимальных источников азота для культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Влияние источников азотного питания на рост штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в процессе периодического культивирования

Источник питания	Титр ЖК, КОЕ/мл	
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g	<i>B. subtilis</i> BZR 517
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
Примечание: между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов 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.

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 (7,20 и 8,82 % соответственно) (таблица 7). Аналогичные результаты были получены в исследованиях 2021 г., согласно которым добавление в питательные среды для культивирования штамма *Bacillus* sp. Fc11 нитрата натрия, глицина, нитрата аммония и дрожжевого экстракта обеспечивало ингибирование *P. aphanidermatum* на уровне 5-7% (Ravi et al., 2021). Для штамма *B. subtilis* BZR 517 максимальное ингибирование *F. oxysporum var. orthoceras* BZR F-6 отмечалось на среде с добавлением пептона – 19,1 %.

Таблица 7 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum var. orthoceras* BZR F-6 в зависимости от источника азотного питания в процессе периодического культивирования

Источник питания	Ингибирование патогена, %, сут.							
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g				<i>B. subtilis</i> BZR 517			
	1	2	3	4	1	2	3	4
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
Примечание: между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности								

Следует отметить, что, в вариантах с добавлением пептона и кукурузного экстракта не был сформирован воздушный мицелий, что свидетельствует о накоплении в ЖК фунгистатических соединений (рисунок 4).

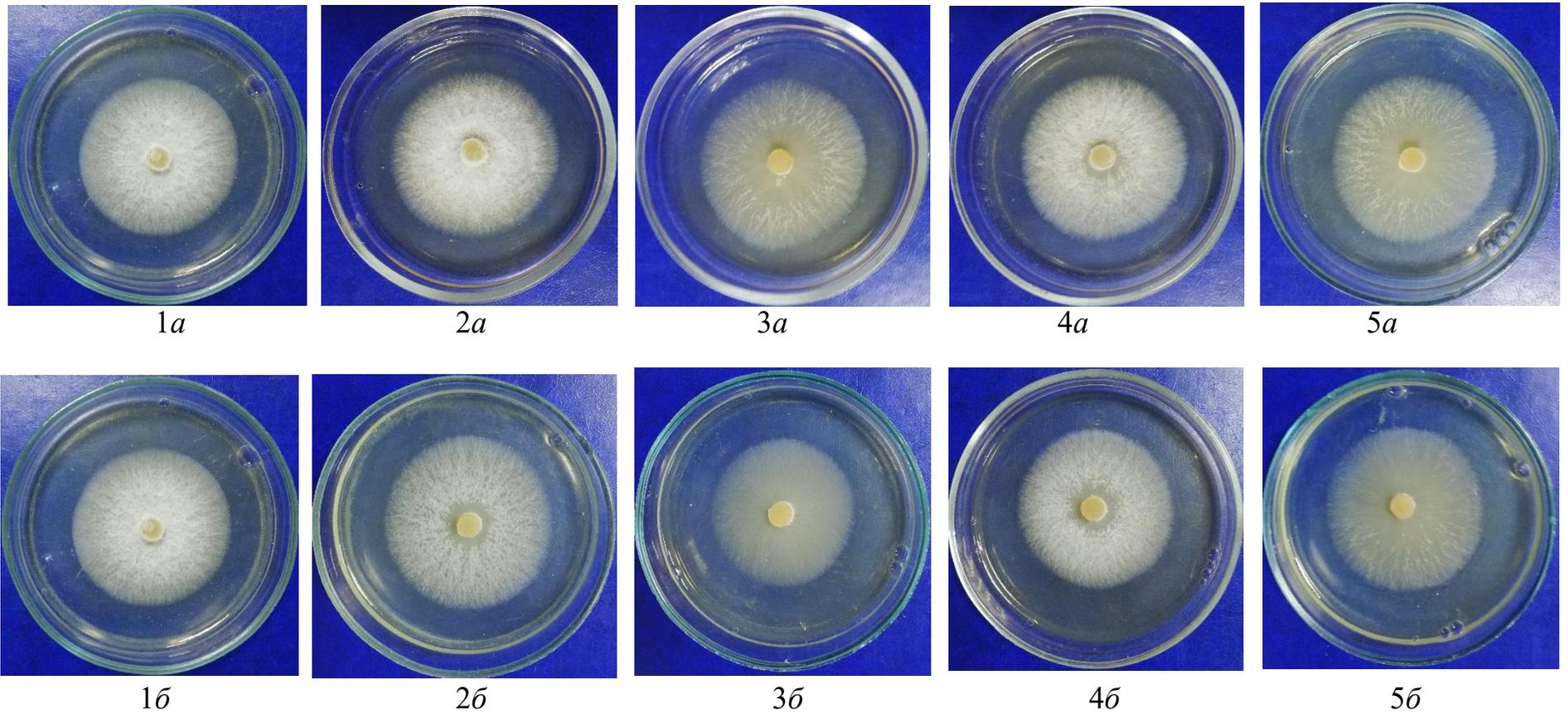


Рисунок 4 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от источника азотного питания в процессе периодического культивирования (ориг.)

1 – контроль; 2 – NaNO_3 ; 3 – пептон; 4 – дрожжевой экстракт; 5 – кукурузный экстракт

a – штамм *B. subtilis* BZR 336g; *б* – штамм *B. subtilis* BZR 517

Результаты наших исследований полностью согласуются с выводами Ху с соавторами, согласно которым подбор оптимальных источников азота для культивирования штамма *B. amyloliquefaciens* HZ-12 обеспечивал образование биомассы на уровне $1,6-1,8 \times 10^{10}$ КОЕ /мл, в то время как синтез итурина А был незначительным по сравнению с подбором других условий культивирования (Xu et al., 2020).

Хроматографический анализ выявил увеличение количества полос с «усложнением» состава источника азота (рисунок 5, б). Также было отмечено, что некоторые метаболиты образовывались только с определенным источником азота. Так добавление в среду пептона оказывает прямое влияние на метаболизм штамма *B. subtilis* BZR 336g, что проявляется в виде дополнительной оранжевой полосы. В то время как для штамма *B. subtilis* BZR 517 существенное значение при культивировании имеет кукурузный экстракт в составе среды – яркая голубая полоса. Наиболее интенсивное свечение было отмечено в вариантах с применением пептона, дрожжевого и кукурузного экстрактов.

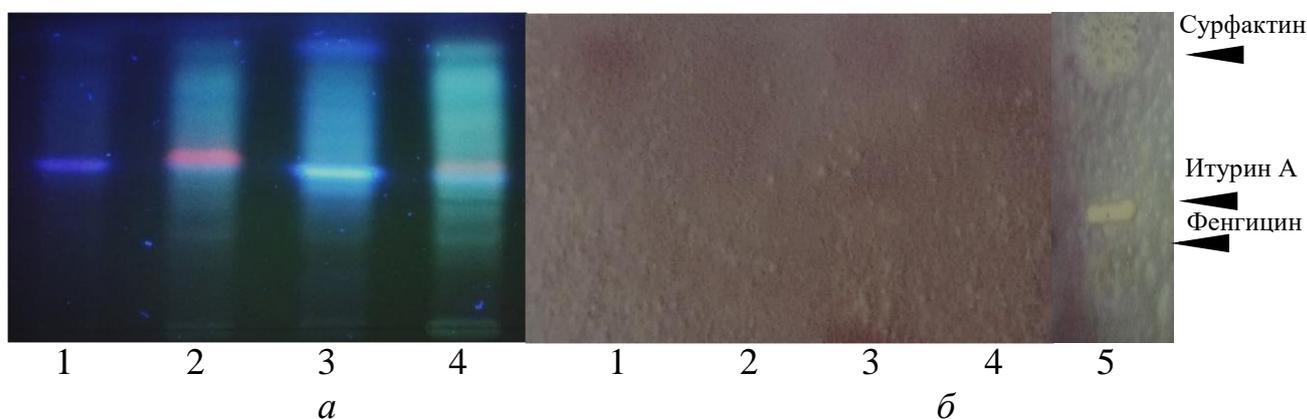


Рисунок 5 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 336g (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

1 – NaNO_3 ; 2 – пептон; 3 – кукурузный экстракт; 4 – дрожжевой экстракт; 5 – стандартный раствор липопептидов

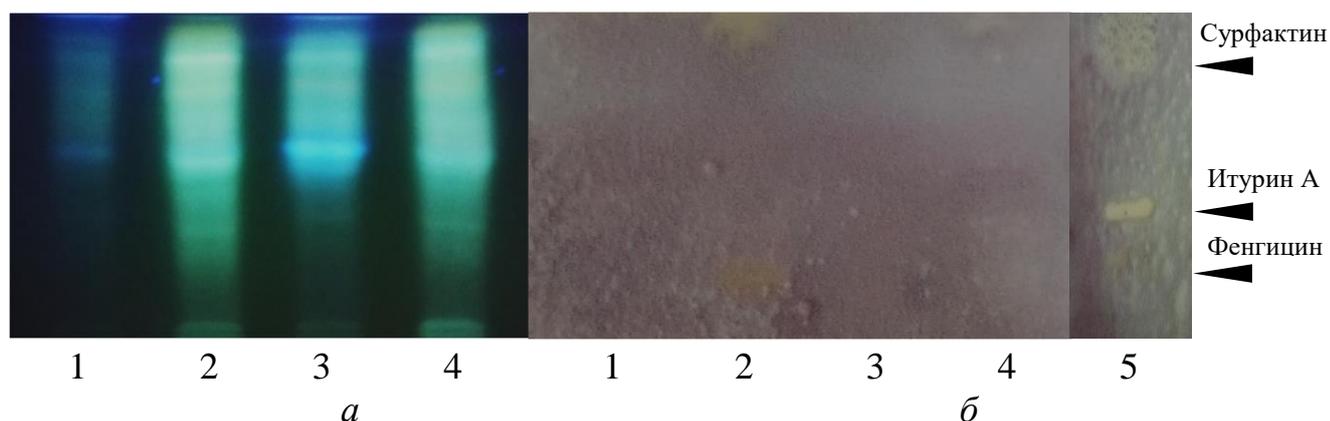


Рисунок 6 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

1 – NaNO_3 ; 2 – пептон; 3 – кукурузный экстракт; 4 – дрожжевой экстракт; 5 – стандартный раствор липопептидов

В исследованиях многих авторов упоминалось, что максимальный выход активных метаболитов отмечался на средах с добавлением в качестве источников азота органических соединений (Parthipan et al., 2017; Osman et al., 2019).

Сравнение полученных биоавтограмм с коммерческими эталонами показало, что незначительное количество сурфактина синтезировано обоими штаммами на среде пептоном и кукурузным экстрактом.

Температура является одним из важных факторов для роста микроорганизмов. С повышением температуры скорость роста микроорганизмов вначале увеличивается, достигая максимальной. Дальнейшее увеличение температуры ведет к необратимой инактивации клеточных компонентов и гибели клетки. При пониженной температуре снижается не только скорость роста, но и скорость отмирания, и соответственно увеличивается выживаемость микроорганизмов.

Известно, что штаммы *B. subtilis* способны расти в температурном диапазоне от 5,5 °C до 55,7 °C (Khadka, Adhikari, Thapa et al., 2020; Gauvry, Mathot, Couvert et al., 2020; Pant, Prakash, Pavani, et al., 2020). В ходе

исследований установлено, что для штамма *B. subtilis* BZR 336g оптимальной является температуре культивирования 20,0 и 25,0 °C: $(1,7 \pm 0,07) \times 10^9$ 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 °C: $(8,9 \pm 0,4) \times 10^8$ КОЕ/мл (таблица 8).

Таблица 8 – Влияние температуры на рост штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в процессе периодического культивирования

Температура, °C	Титр ЖК, КОЕ/мл	
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g	<i>B. subtilis</i> BZR 517
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

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

Сравнительное изучение антибиотической активности ЖК исследуемых штаммов в отношении тест-культуры *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 представлено в таблице 9.

Таблица 9 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от температуры культивирования в процессе периодического культивирования

Температура, °C	Ингибирование патогена, %, сут.							
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g				<i>B. subtilis</i> BZR 517			
	1	2	3	4	1	2	3	4
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}

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

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: ингибирование мицелия патогена отмечено на уровне 7,6 % на третьи сутки учета. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 отмечена обратная закономерность: понижение температуры приводило к снижению антибиотической активности до 8,7 %. Следует отметить, что в вариантах с добавлением бактериального супернатанта (при температуре 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 мицелия патогена, рост тонкого паутинистого мицелия и изменение его окраски, что свидетельствует об активном подавлении роста мицелия патогена (рисунок 7).

Полученные данные подтверждаются результатами исследований культивирования штамма *Bacillus sp.* 3, обладающего антифунгальной активностью, согласно которым максимальная антагонистическая активность, соответствующая наибольшему выходу биомассы, достигается при 28°С. При пониженной (20,0°С) и повышенной (37,0°С) температурах культивирования накопление антигрибных метаболитов снижается: диаметр зон ингибирования роста тест культуры *F. graminearum* BZR F-4 достоверно уменьшается на 11,1-21,7 % (Сираева, 2010). Исследования по оптимизации параметров культивирования штамма *B. circulans*, проявившего высокую антагонистическую активность в отношении ряда патогенов, вызывающих болезни растений, показали, что 30,0°С – оптимальная температура. При данной температуре зафиксирован максимальный выход антифунгальных метаболитов (Abada, El-Hendawy, Osman et al., 2014). 30,0°С также оказалась предпочтительной для синтеза штаммом *B. subtilis* KLP2015 липопептидов, активных в отношении *Mucor sp.* и *A. niger* (Meena et al., 2020).

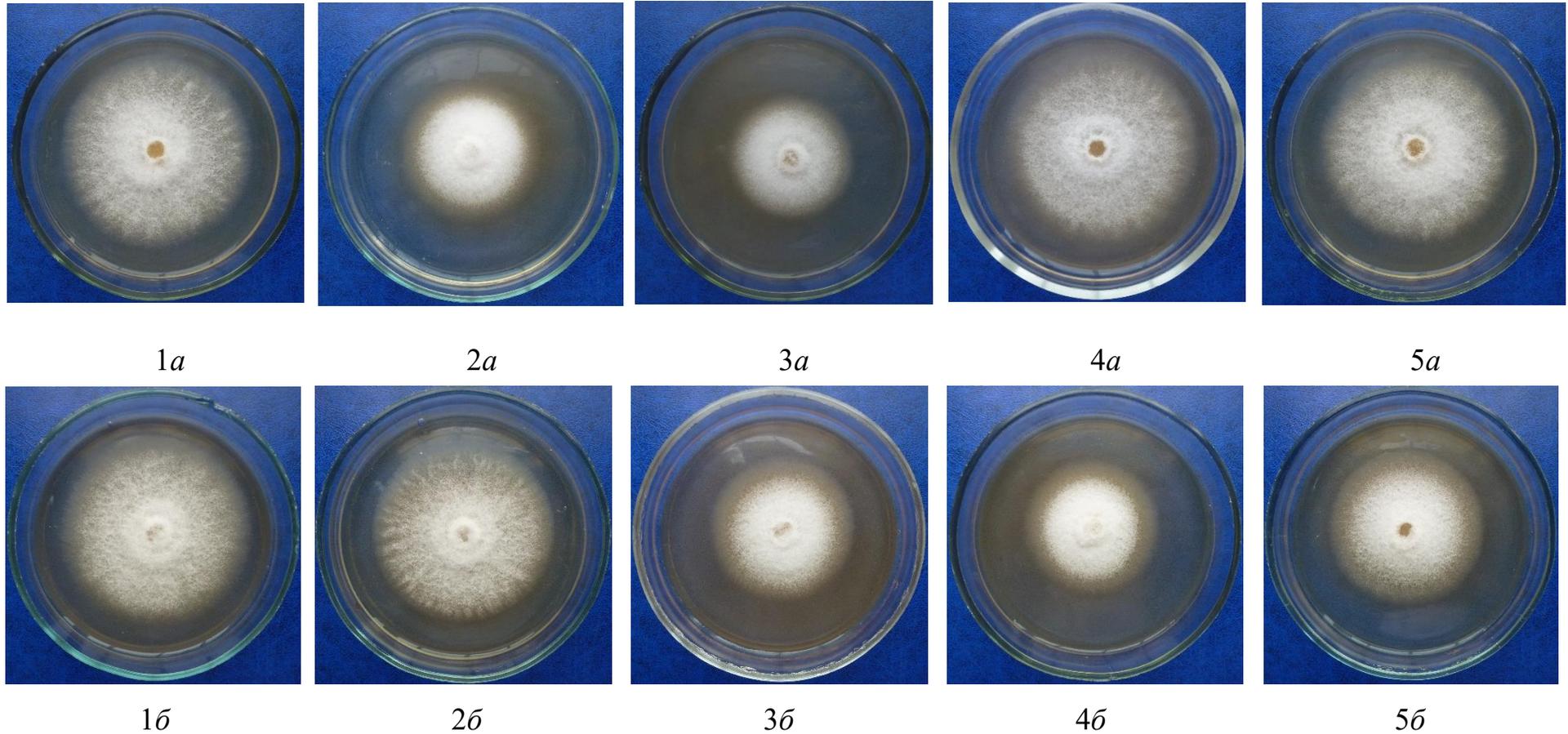


Рисунок 7 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от температуры культивирования в процессе периодического культивирования (ориг.)

1 – контроль; 2 – 20,0°C; 3 – 25,0°C; 4 – 30,0°C; 5 – 35,0°C

a – штамм *B. subtilis* BZR 336g; *б* – штамм *B. subtilis* BZR 517

Важно подчеркнуть, что антибиотические метаболиты штамма *B. subtilis* BZR 336g вызывали более существенные морфологические изменения патогенного микромицета по сравнению с антибиотическим действием соединений, продуцируемых штаммом *B. subtilis* BZR 517.

Полученные данные подтверждает изучение антибиотической активности исследуемых штаммов методом хроматографии и биоавтографии (рисунок 8, 9). Установлено, что повышение температуры культивирования способствует синтезу ряда соединений, не зафиксированных при 20,0° С – появление желтых полос.

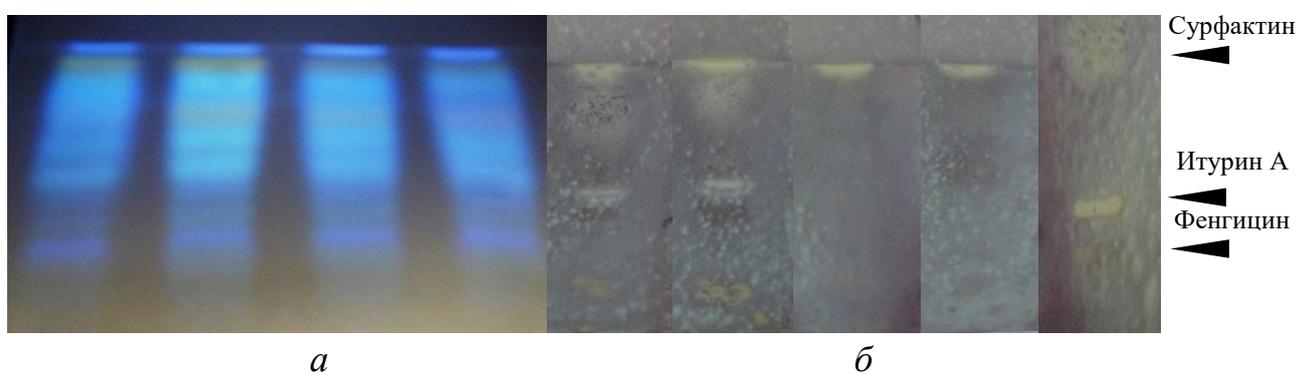


Рисунок 8 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 336g (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

1 – 20,0°С; 2 – 25,0°С; 3 – 30,0°С; 4 – 35,0°С; 5 – стандартный раствор липопептидов

При сравнении полученных липопептидных профилей с коммерческим сурфактином и итурином А было обнаружено, что и штамм *B. subtilis* BZR 336g, и штамм *B. subtilis* BZR 517 продуцируют оба липопептида.

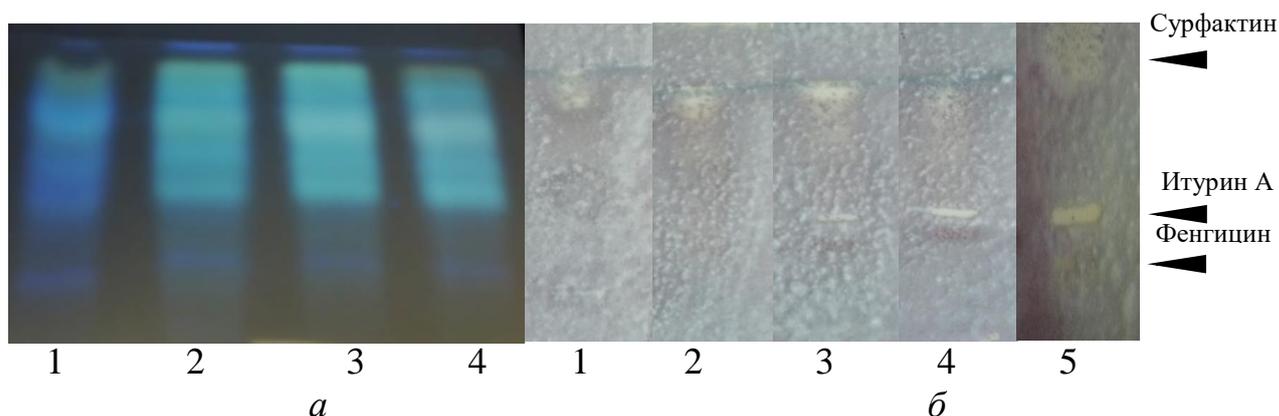


Рисунок 9 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

1 – 20,0°C; 2 – 25,0°C; 3 – 30,0°C; 4 – 35,0°C; 5 – стандартный раствор липопептидов

Визуальная оценка позволяет сделать вывод, что штамм *B. subtilis* BZR 336g накапливает сурфактин и итурин А больше, чем штамм *B. subtilis* BZR 517. Причем наличие и количество этих метаболитов может существенно изменяться в зависимости от температуры культивирования. Если синтез сурфактина обоими штаммами был отмечен во всех вариантах опыта, то синтез итурина, отмечен только при температуре 20 и 25°C для штамма *B. subtilis* BZR 336g, и 30,0 и 35,0°C для штамма *B. subtilis* BZR 517 (Sidorova, Asaturova, Номуак et al., 2020).

Существенное значение при культивировании микроорганизмов имеет рН среды. При ее изменении в неблагоприятную сторону микроорганизмы перестают расти, даже если все остальные условия будут оптимальны.

Установлено, 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 pH 6,0 и 8,0 (таблица 10).

Таблица 10 – Влияние pH на рост штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в процессе периодического культивирования

pH	Титр ЖК, КОЕ/мл	
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g	<i>B. subtilis</i> BZR 517
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 нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности

Отмечено, что штамм *B. subtilis* BZR 517 проявлял высокую антибиотическую активность в большем диапазоне pH, чем штамм *B. subtilis* BZR 336g. Установлено, что максимальное накопление метаболитов, оказывающих выраженный фунгицидный эффект, происходит при pH 8,0 и 10,0 для штамма *B. subtilis* BZR 336g и pH 6,0, 8,0 и 10,0 для штамма *B. subtilis* BZR 517 (таблица 11, рисунок 10).

Таблица 11 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от pH в процессе периодического культивирования

pH	Ингибирование патогена, %, сут.							
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g				<i>B. subtilis</i> BZR 517			
	1	2	3	4	1	2	3	4
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 нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности

Лимитирующим для обоих штаммов оказалось значение рН 3,0. При пониженной рН среды существенно снижался синтез антибиотических веществ для подавления роста тест-культуры.

В некоторых случаях наблюдается предпочтение микроорганизмов к щелочной среде. Так, в своих исследованиях 2011 г. A.S.S. Ibrahim с соавторами обнаружили, что продукция *B. agaradhaerens* β-циклодекстринов, увеличивается с увеличением рН среды и достигает максимума при рН 10,0 – 6,3 мг. При этом, отмечено, что доля γ-циклодекстринов была выше при слабокислой-нейтральной среде (рН 6,0-7,0). Для штамма *B. flexus* FPB17, выделенного из щелочной почвы Северного Гуджарата (Индия), щелочная среда также оказалась более предпочтительной. Установлено, что оптимум рН для роста клеток – 10,0, а для активного производства щелочной фосфатазы – 9,0 (Falguni, Sharma, 2012).

Измерение рН среды после культивирования показало, что исследуемые штаммы способны как подкислять щелочную среду, так и подщелачивать кислую, приводя рН среды ближе к нейтральной (для обоих штаммов рН питательной среды после культивирования составила 6-7,5).

Результаты хроматографических и биоавтографических исследований антибиотической активности исследуемых штаммов в зависимости от рН питательной среды представлены на рисунках 11, 12. Хроматографические исследования показали, что, несмотря на то, что оба штамма относятся к виду *B. subtilis*, метаболический обмен у них протекает совершенно по-разному. Так, для обоих штаммов зафиксированы разные цветные полосы в зоне накопления сурфактина, что может свидетельствовать об образовании различных гомологов данного липопептида. При исследовании хроматографической подвижности компонентов культуральной жидкости с рН 3,0 отмечено отсутствие роста мицелия патогена. Вероятно, это обусловлено чувствительностью *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 к пониженной рН среды.

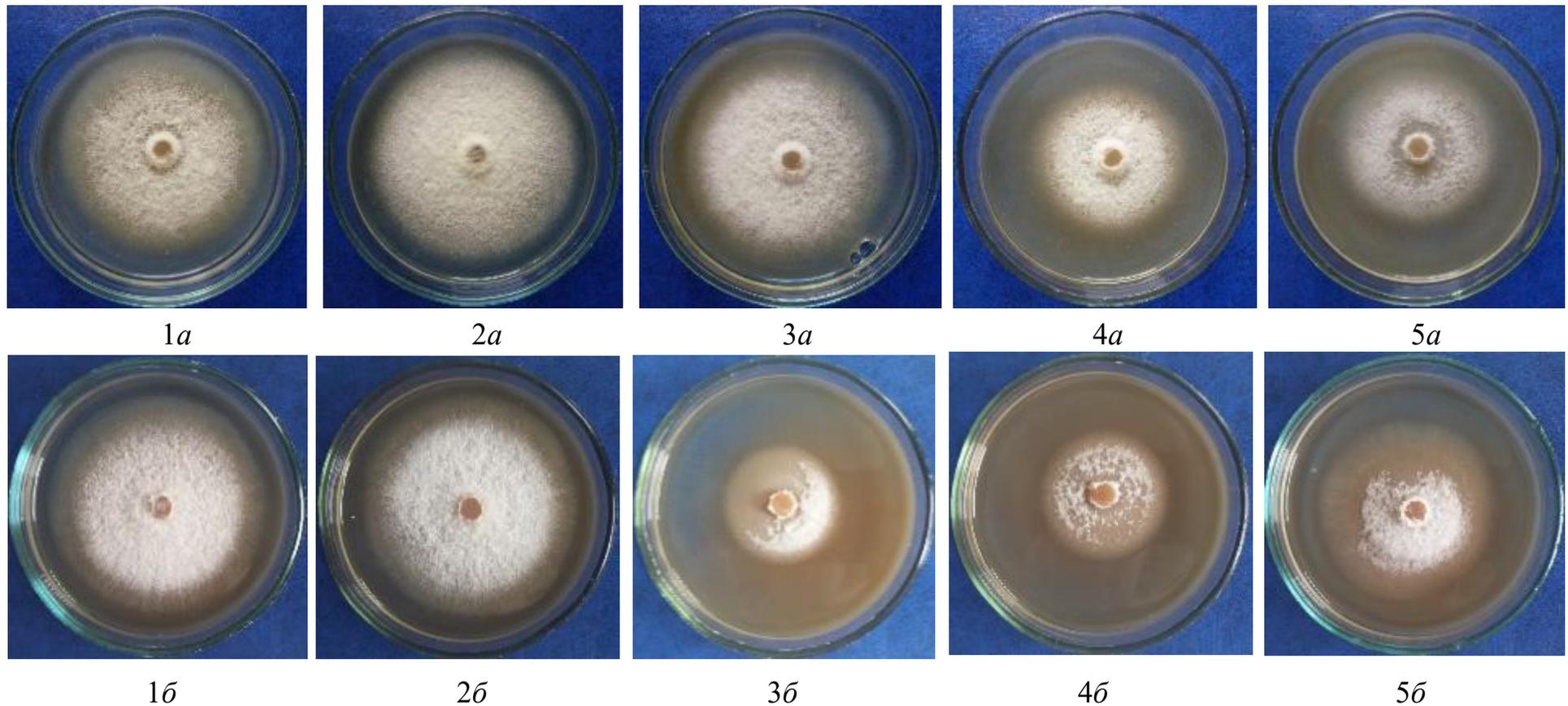


Рисунок 10 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от pH в процессе периодического культивирования (ориг.)

1 – контроль; 2 – pH 3,0; 3 – pH 6,0; 4 – pH 8,0; 5 – pH 10,0

a – штамм *B. subtilis* BZR 336g; *б* – штамм *B. subtilis* BZR 517

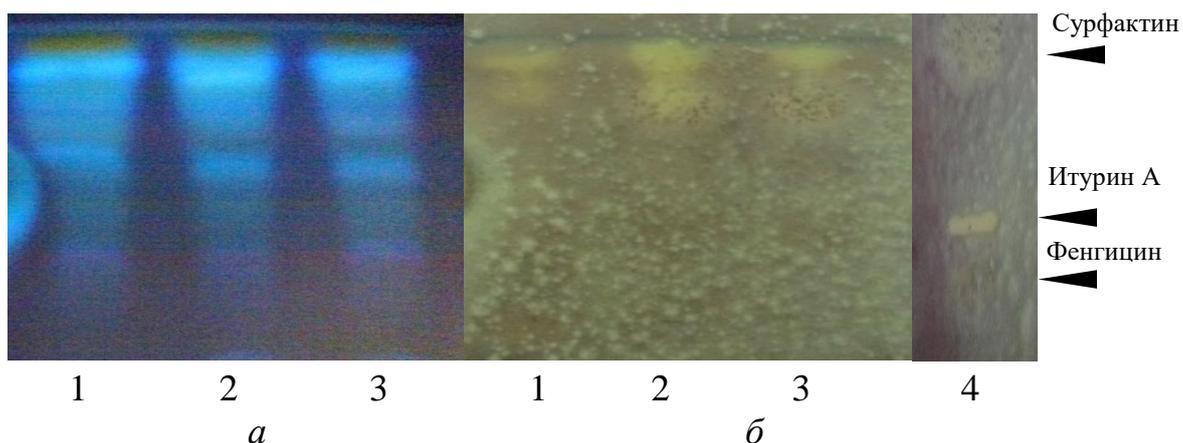


Рисунок 11 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 336g (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

1 – рН 6,0; 2 – рН 8,0; 3 – рН 10,0; 4 – стандартный раствор липопептидов

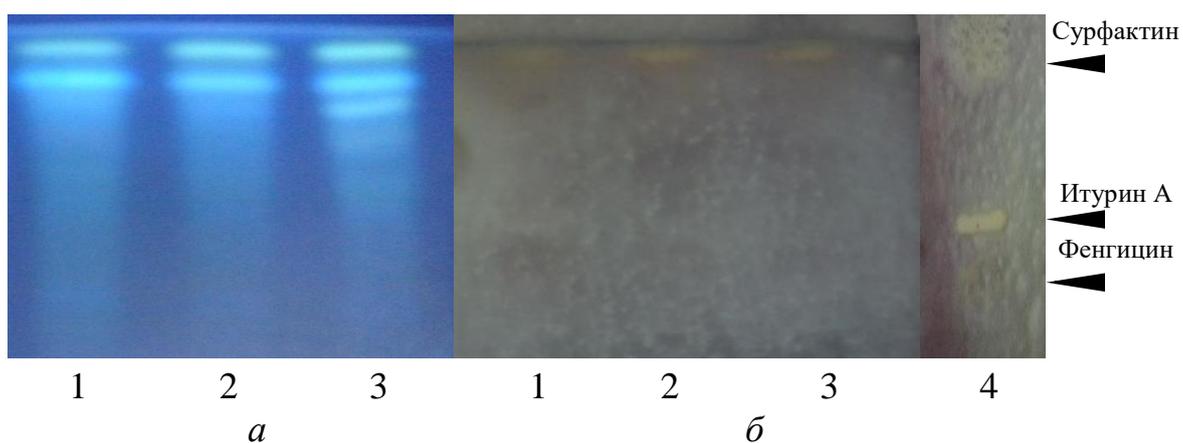


Рисунок 12 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

1 – рН 6,0; 2 – рН 8,0; 3 – рН 10,0; 4 – стандартный раствор липопептидов

Установлено, что максимальное накопление сурфактина и итурина А, оказывающих выраженный фунгицидный эффект, происходит при рН 8,0 для штамма *B. subtilis* BZR 336g и 6,0 и 8,0 для штамма *B. subtilis* BZR 517. Следует отметить, что при более высокой рН питательной среды итурин А

продуцировался в следовых количествах или вообще не синтезировался (Sidorova, Asaturova, Номыак et al., 2020).

Одним из важнейших факторов на стадии промышленного производства биопрепаратов является время культивирования. Если бактериальные культуры инкубируются слишком долго, некоторые метаболиты могут быть преобразованы в другие соединения. Необходимо учитывать, что максимальный уровень синтеза метаболитов может приходиться на стационарную фазу или конец экспоненциального роста (Bauman, Otero, 2006; Чеботарь, Завалин, Кипрушкина, 2007; Chen, Wu, Bernard, 2009). Это демонстрирует важность построения кривых роста бактерий в процессе культивирования. Кроме того, определение времени культивирования штаммов-продуцентов может существенно сократить затраты электроэнергии при наработке биопрепаратов в промышленных масштабах.

Результаты исследований развития штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 при периодическом способе выращивания представлены на рисунке 13.

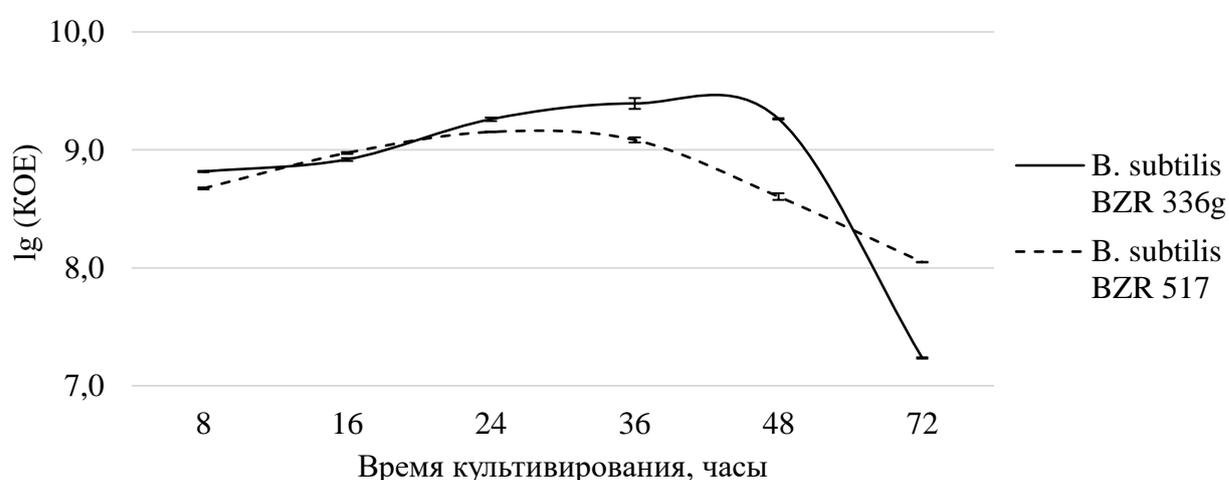


Рисунок 13 – Динамика роста штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в процессе периодического культивирования

В процессе культивирования исследуемых штаммов были выделены следующие фазы роста. Лаг-фаза начиналась после внесения в среду посевной (маточной) культуры с титром $(3,9 \pm 0,05) \times 10^8$ КОЕ/мл у штамма *B. subtilis* BZR 336g и $(4,1 \pm 0,01) \times 10^7$ КОЕ/мл у штамма *B. subtilis* BZR 517 и

продолжалась до восьми часов. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 в этот период началась переходная фаза. Численность его популяции начала увеличиваться и составила $(4,7 \pm 0,09) \times 10^8$ КОЕ/мл.

Необходимо отметить, что численность популяции штамма *B. subtilis* BZR 336g в это время не увеличивалась, то есть происходило увеличение объема клеток, но не деление. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 в этот период началась переходная фаза. Численность его популяции начала увеличиваться и составила $(4,7 \pm 0,09) \times 10^8$ КОЕ/мл.

Экспоненциальная фаза была зафиксирована 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. Максимальный титр клеток был отмечен именно в данный период 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.

После короткой стационарной фазы, во время которой происходило прекращение роста бациллярных клеток, наступала фаза отмирания (после 48 часов культивирования для штамма *B. subtilis* BZR 336g и после 36-и часов – для штамма *B. subtilis* BZR 517). Отмечено, что стационарная фаза культивирования штамма *B. subtilis* BZR 517 наступила раньше, чем для штамма *B. subtilis* BZR 336g. Также для штамма *B. subtilis* BZR 517 характерна быстрая фаза отмирания. Вероятно, это связано с тем, что для данной культуры бактерий характерно более короткое время генерации клеток. Повышение температуры культивирования приводит к возрастанию интенсивности процессов клеточного метаболизма и, как следствие, более активному росту культуры клеток.

Анализ роста исследуемых объектов позволяет сделать вывод о том, что при культивировании в диапазоне 24-48 часов компоненты питательной среды активно потреблялись или практически полностью утилизировались бациллярными штаммами, а продукты обмена, в том числе и антифунгальные вещества, накапливались.

Исследование антибиотической активности показало, что начальный синтез антибиотических веществ исследуемых штаммов был отмечен после восьми часов культивирования (таблица 12; рисунок 14, 15). В этот период ЖК исследуемых штаммов оказывала лишь статическое действие на возбудителя фузариоза *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6. Так, в вариантах с ЖК на основе исследуемых штаммов были отмечены фрагменты лизированного мицелия. Интенсивное накопление антифунгальных веществ в среде начиналось с 16-ти часов культивирования штаммов. Для многих видов бактерий в стационарной фазе происходит наиболее активный синтез антибиотических соединений (Fira, Dimkić, Verić et al., 2018).

Таблица 12 – 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, %, сут.							
	<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

Для штамма *B. subtilis* BZR 517 к 72-м часам инкубации наблюдалось существенное снижение антагонистической активности. При этом в вариантах с добавлением бактериального супернатанта (при культивировании в течение 48-72-х часов) также отсутствовала характерная фиолетовая окраска микромицета, что свидетельствует об интенсивном накоплении антибиотических веществ в указанные временные интервалы.

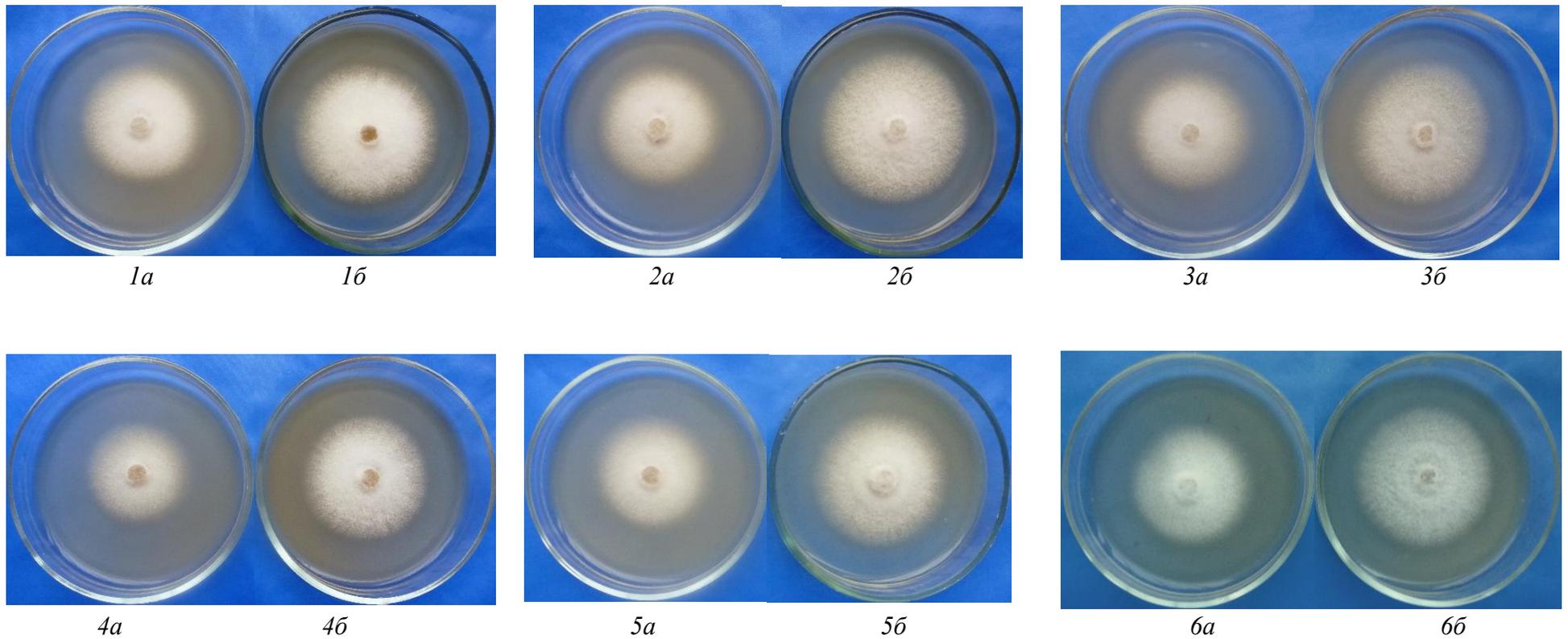


Рисунок 14 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 336g в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от времени в процессе периодического культивирования (ориг.)
1 – 8 часов; 2 – 16 часов; 3 – 24 часа; 4 – 36 часов; 5 – 48 часов; 6 – 72 часа;
a – штамм *B. subtilis* BZR 336g; б – контроль.

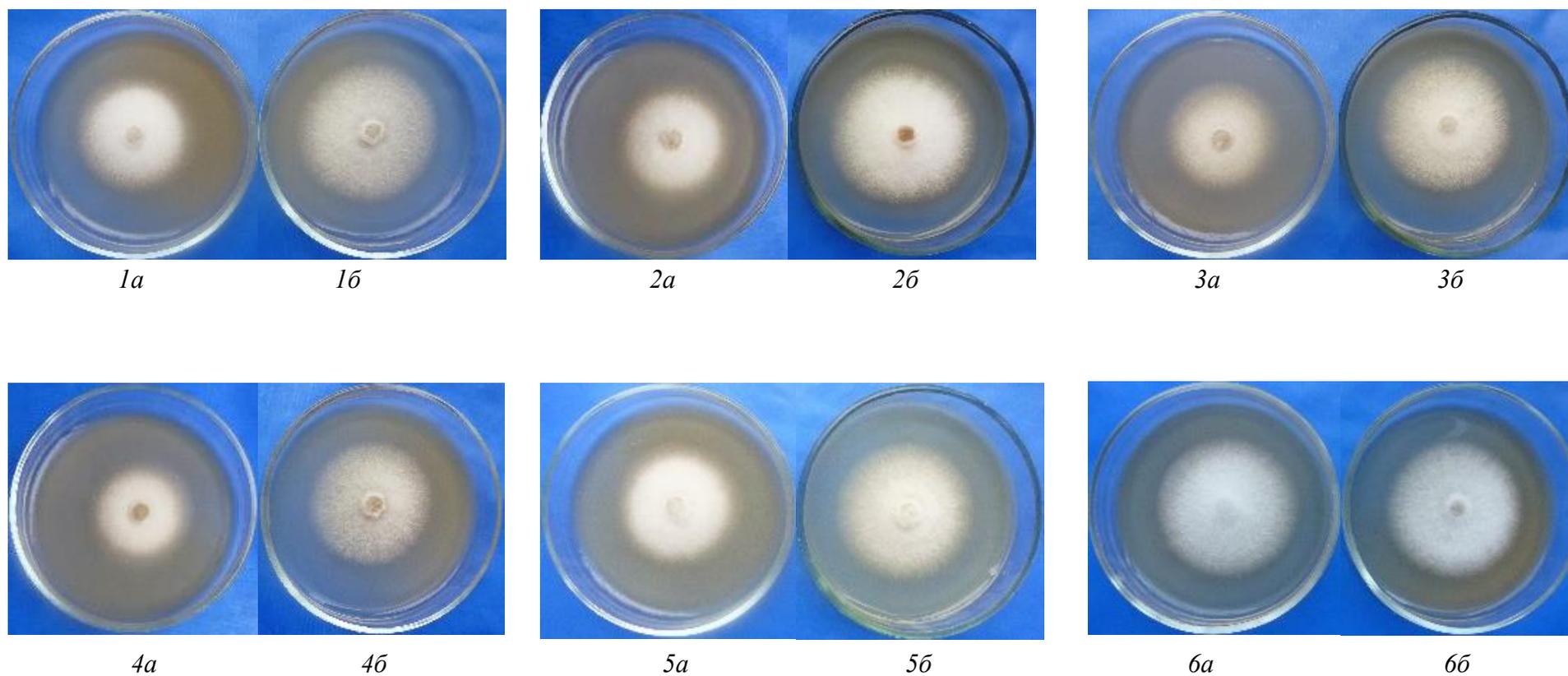


Рисунок 15 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от времени в процессе периодического культивирования (ориг.)
1 – 8 часов; 2 – 16 часов; 3 – 24 часа; 4 – 36 часов; 5 – 48 часов; 6 – 72 часа;
а – штамм *B. subtilis* BZR 517; б – контроль.

Отмечено, что антибиотические вещества штамма *B. subtilis* BZR 336g вызывали более существенные морфологические изменения патогенного микромицета по сравнению с антифунгальным действием соединений, продуцируемых штаммом *B. subtilis* BZR 517. К концу культивирования в вариантах с добавлением ЖК исследуемого штамма тест-объект формировал воздушный мицелий только на посевном блоке, отмечался рост тонкого, лизированного субстратного мицелия возбудителя фузариоза.

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.

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

На основании полученных данных была разработана оригинальная оптимизированная питательная среда. В ее состав вошли следующие компоненты: хлористый калий, магний сернокислый, калий фосфорнокислый, кукурузный экстракт, кальций углекислый, железо сернокислое, меласса. Следует отметить, что среды КВ и КГС были выбраны для включения в программу испытаний, в том числе и потому, что исследуемые штаммы были выделены из природных источников на среде КВ, а КГС является одной из распространенных сред для работы, в том числе, с бактериями р. *Bacillus*. В ходе исследований установлено, что количество колониеобразующих единиц ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g на оптимизированной среде оказалось на три порядка выше, чем на среде КВ и КГС. 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 (таблица 13).

Сотрудниками Казанского федерального университета установлено, что при выращивании *Bacillus sp.* 3 на картофельно-глюкозной среде уровень

накопления биомассы составляет $4,6 \pm 0,2$ г/л с титром $(0,27 \pm 0,05) \times 10^{10}$ КОЕ/мл, а содержание спор – 45,3%; на мелассной – $5,0 \pm 0,2$ г/л, $(0,98 \pm 0,04) \times 10^{10}$ КОЕ/мл и 52,6 % соответственно, на мелассно-кукурузной – $5,1 \pm 0,3$ г/л, $(1,02 \pm 0,06) \times 10^{10}$ КОЕ/мл и 57,3 % соответственно, на пшеничной среде – $5,3 \pm 0,2$ г/л, $(1,04 \pm 0,05) \times 10^{10}$ КОЕ/мл и 83,5 % соответственно (Сираева, 2010).

Известно, что для разработки биотехнологий получения биопрепаратов комплексного действия необходимо получение ЖК с оптимальным количеством микробных клеток в сочетании с высокой концентрацией антифунгальных веществ. Поэтому на последующем этапе осуществлены исследования антифунгальной активности штаммов-продуцентов биопрепаратов на различных питательных средах (таблица 13).

Многими исследователями отмечена прямая зависимость между условиями культивирования штаммов бактерий рода *Bacillus* и уровнем антифунгальной активности в отношении возбудителей болезней сельскохозяйственных культур (Zhao, Nan, Tan, 2014; Kilani-Feki, Khedher, Dammak, 2016; Horak, Engelbrecht, Jansen, 2019).

Для штамма *B. subtilis* BZR 336g максимальная антифунгальная активность отмечена на ОПС, тогда как на питательных средах КВ и КГА (картофельно-глюкозный агар) 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 29).

Степень ингибирования *F. graminearum* BZR F-4 в варианте со штаммом *B. subtilis* BZR 517 к десятым суткам увеличивалась на всех питательных средах, однако существенной разницы как в варианте со штаммом *B. subtilis* BZR 336g, выявлено не было, антифунгальная активность на всех средах колебалась в диапазоне от 46,8 до 64,0 %.

Таблица 13 – Рост и антифунгальная активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на различных питательных средах в процессе периодического культивирования

Питательная среда	Титр ЖК, КОЕ/мл	Ингибирование мицелия патогена, %			
		инкубация, сут.			
		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					

Эти результаты могут быть связаны с увеличением синтеза антифунгальных метаболитов при изменении компонентов питательной среды (предшественники и т.д.) (Xu, Cai, Zhang, 2020). Так, низкие концентрации фенгицинов не оказывают какого-либо влияния на клеточные стенки, в то время, как высокие концентрации вызывают образование крупных пор, из-за чего теряется способность удерживать содержимое клеток (Соколова, Глинушкин, 2017).

При этом важно отметить, что только на оптимизированной среде штамм *B. subtilis* BZR 336g обладал высокой подвижностью – уже на пятые сутки совместной инкубации биоагент занял всю площадь питательной среды, блокируя рост патогена (рисунок 16).

Кроме того, среди особенностей воздействия метаболитов активных штаммов бактерий на *F. graminearum* BZR F-4 необходимо отметить следующее: в зоне антагонистического действия бактерий в некоторых вариантах наблюдался лизис уже сформировавшегося мицелия, ингибирование роста и изменение окраски мицелия патогена. Подобные

изменения вызваны активным синтезом антибиотических соединений и хитиноподобных ферментов (хитиназы, протеазы), способных разрушать клеточные стенки и лизировать гифы грибов (Максимов, Веселова, Нужная, 2015).

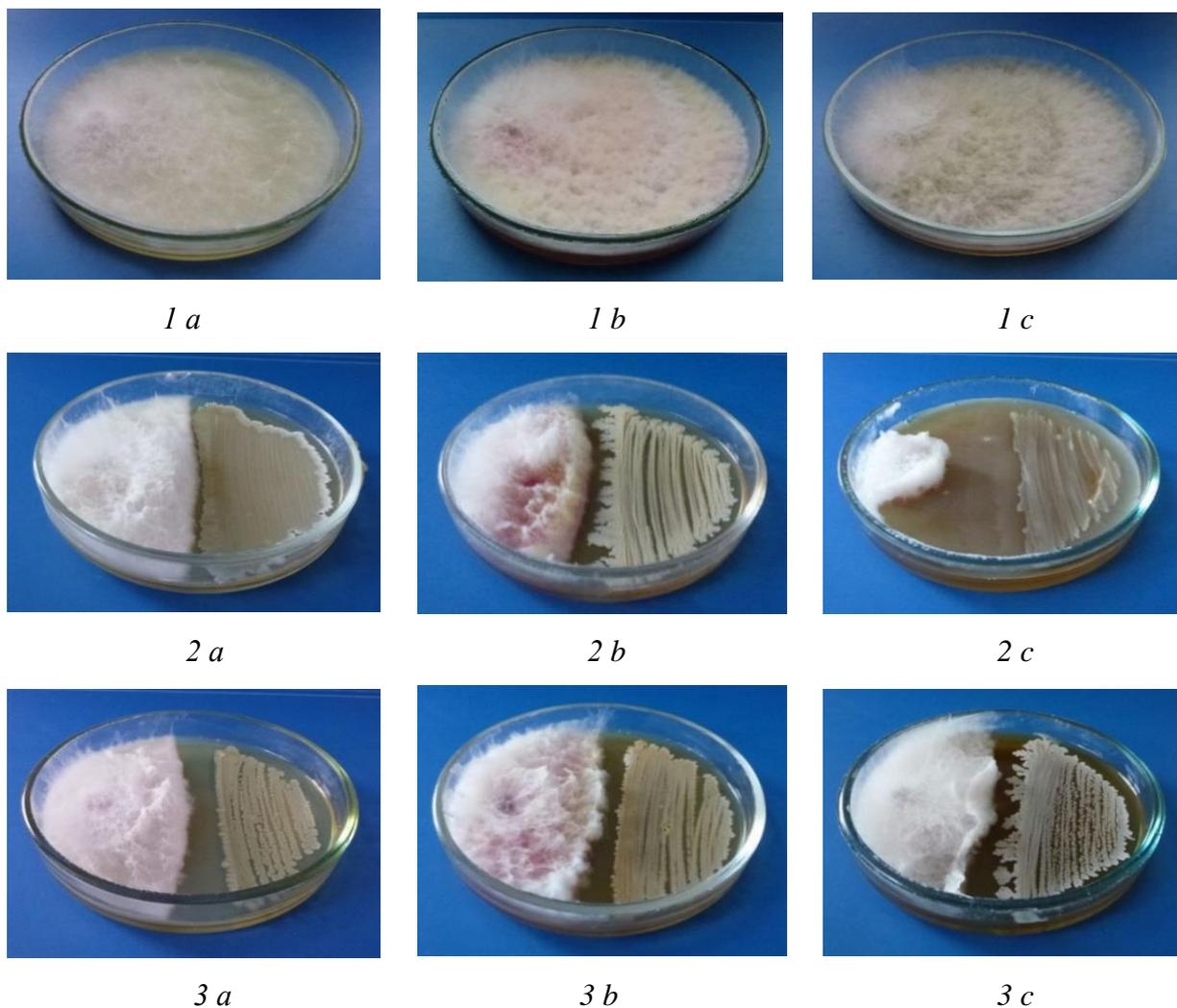


Рисунок 16 – Антифунгальная активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. graminearum* BZR F-4 на различных питательных средах (ориг.)

a – КВ; *b* – КГА; *c* – ОПС;

1 – контроль (чистая культура *F. graminearum* BZR F-4 без антагониста); 2 – двойная культура *F. graminearum* BZR F-4 и *B. subtilis* BZR 336g; 3 – двойная культура *F. graminearum* BZR F-4 и *B. subtilis* BZR 517.

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 17, 18). Анализ метаболитов под УФ366 светом позволил нам сделать некоторые предположения относительно их химической структуры.

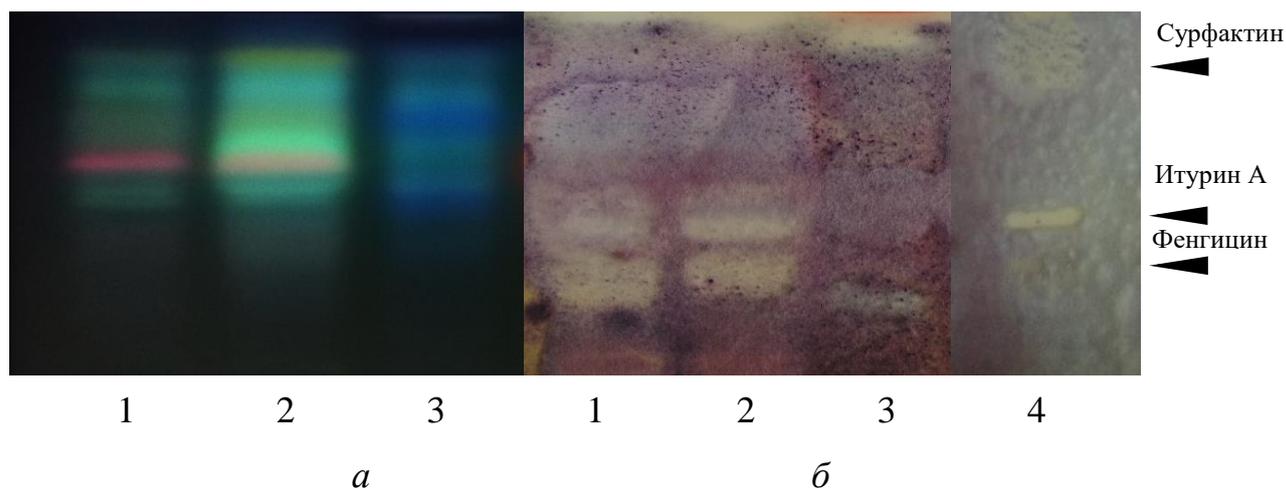


Рисунок 17 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

1 – КГА; 2 – ОПС; 3 – КБ; 4 – стандартный раствор липопептидов

Так, на среде КВ для штамма *B. subtilis* BZR 336g отмечены синие полосы, что может свидетельствовать о присутствии фенольных структур, для штамма *B. subtilis* BZR 517 в аналогичных зонах отмечено светло-зеленое свечение, что характерно для циклических соединений. Следует отметить, что при культивировании штаммов на КГС зафиксировано интенсивное красное свечение, которое не было отмечено ни в одном из предыдущих опытов, что также может свидетельствовать об активном метаболизме в подобранных условиях культивирования.

Исследования биоавтограмм также показали, что накопление антифунгальных метаболитов зависит не только от состава питательной среды, но и от штамма-продуцента.

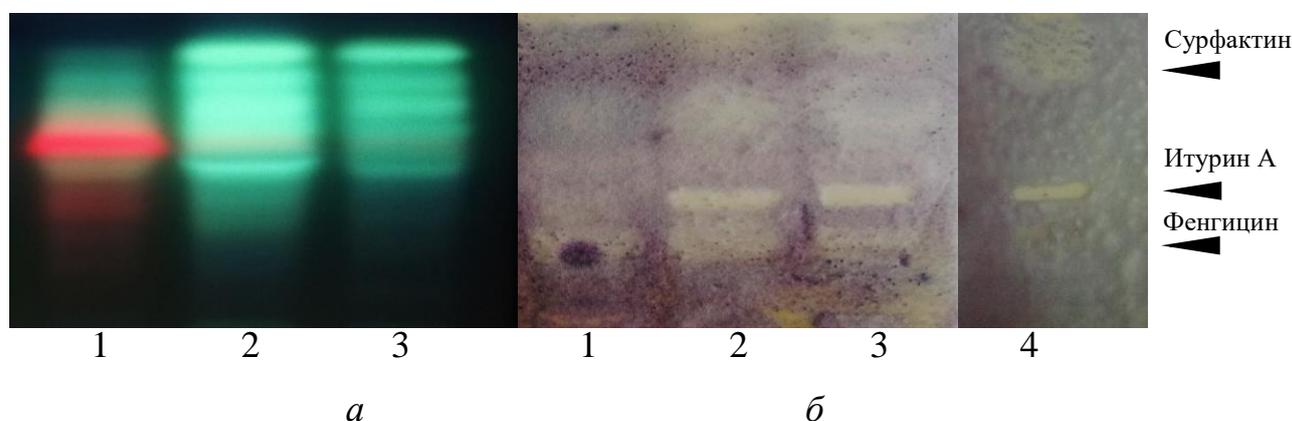


Рисунок 18 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

1 – КГА; 2 – ОПС; 3 – КБ; 4 – стандартный раствор липопептидов

Хроматографический анализ показал, что состав питательной среды существенно влияет на накопление антифунгальных метаболитов у обоих исследуемых штаммов. Продуцирование липопептида итурин отмечено у обоих штаммов, при этом для штамма *B. subtilis* BZR 517 оно было наиболее выражено на среде КГА и оптимизированной среде, в то время как для штамма *B. subtilis* BZR 336g только на оптимизированной среде. Синтез фенгицина штаммами *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 отмечен на среде КГА и оптимизированной среде. Синтез сурфактина отмечен только в варианте со штаммом *B. subtilis* BZR 336g на среде КБ.

В производстве биопрепаратов важным завершающим этапом является приготовление препаративной формы. Ее качество – одно из условий высокой эффективности и стабильности биопрепарата. Препаративная форма тесно связана с технологией применения биопрепаратов и их сроком хранения. Правильно подобранная препаративная форма позволяет создать оптимальные

условия для доставки к целевому объекту, снизить норму расхода препарата, обеспечить равномерное распределение пестицида по обрабатываемой поверхности, продлить сроки его действия (Штерншис 2012, Новикова 2010). Наибольшее распространение на современном рынке биопрепаратов получила жидкая форма, представляющая собой ЖК с клетками агента установленного титра. Такая форма наименее трудо- и энергозатратна (Саламатова, 2010).

Лабораторные образцы биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 представляют собой жидкую культуру, состоящую из питательной среды и бактериальных клеток. Цвет желто-оранжевый или оранжевый. Состав однородный. Со временем выпадает осадок минеральных солей, входящих в состав питательной среды. В некоторых случаях возможно образование хлопьев углекислого кальция. Перед использованием рекомендуется встряхнуть емкость с биопрепаратом. Лабораторные образцы обладают хорошей растворимостью в воде, не образуют хлопьев, что позволяет использовать их в опрыскивателях с мелкодисперсными распылителями. Рабочий раствор целесообразно готовить за 1-2 часа до обработки для активации биопрепарата (рисунок 19).

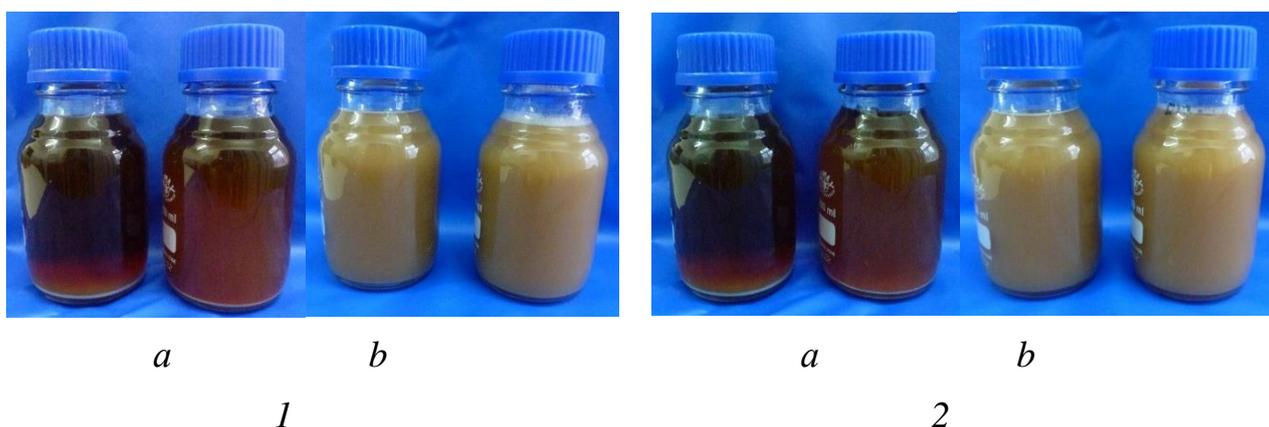


Рисунок 19 – Лабораторные образцы биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 (ориг.)

1 – *B. subtilis* BZR 336g; 2 – *B. subtilis* BZR 517;

a – лабораторный образец препарата в покое; *b* – лабораторный образец после встряхивания

Таким образом, полученные лабораторные образцы биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 соответствуют основным техническим требованиям к современному биопрепарату.

3.5 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

Многими авторами отмечено положительное влияние предпосевной обработки семян препаратами на основе бактерий рода *Bacillus* (Mahmood, Turgay, Farooq, 2016; Arkhipova, Galimsyanova, Kuzmina, 2019). Мы провели оценку лабораторных образцов биопрепаратов, полученных на стандартных и оптимизированных питательных средах, на фоне искусственного заражения *F. graminearum* BZR F-4 в условиях климатической камеры, на растениях пшеницы озимой сорт Батько (таблица 14). Кроме того, в данной работе мы оценивали лабораторные образцы не только на основе одного штамма, но и включили варианты с различным соотношением разных лабораторных образцов с целью выяснения их аддитивного или синергического действия.

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 растений пшеницы озимой составила от 81,1 до 97,7 %. Причем в вариантах с нормой применения ЖК на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и BZR 517 2,0 и 1,0, а также 1,0 и 1,0 л/т, полученных на ОПС, всхожесть не отличалась от контроля без инфекции (97,6%) и составила 97,7 и 94,4% соответственно.

Таблица 14 – 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, 2014 г.

Вариант, норма применения, л/т	Всхожесть, %	Биологическая эффективность, %*
Контроль без инфекции	97,6 ^b	
Контроль с инфекцией (обработка водой)	58,8 ^{ab}	68,4/ 100**
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}
КБ		
<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
КГС		
<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		

При анализе биологической эффективности 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 *B. subtilis* BZR 336g и BZR 517 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%.

На следующем этапе были проведены исследования влияния ЖК штаммов на рост и развитие проростков пшеницы озимой (таблица 15, рисунок 20).

Таблица 15 – Влияние ЖК штаммов на рост и развитие растений пшеницы озимой на фоне искусственного заражения грибом *F. graminearum* BZR F-4 с применением различных питательных сред, климатическая камера, сорт Батько, 2014 г.

Вариант, норма применения, л/т	прибавка массы побега, %	прибавка массы корня, %	прибавка длины побега, %	прибавка длины корня, %
Кинто Дуо, КС, химический эталон, 2,5	0 ^a	15,5 ^a	0 ^a	20,8 ^{ab}
Фитоспорин-М, Ж, биологический эталон,	0,33 ^a	0 ^a	26,8 ^{cd}	1,3 ^{ab}
КБ				
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0	0 ^a	0 ^a	6,0 ^{abc}	39,6 ^b
<i>B. subtilis</i> BZR 517, 2,0	0 ^a	0 ^a	15,2 ^{abcd}	8,9 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517, 2,0	0 ^a	2,23 ^a	17,9 ^{abcd}	28,3 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 2,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517, 1,0	5,6 ^a	9,97 ^a	4,9 ^{abc}	0 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 1,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517, 1,0	16,7 ^b	47,3 ^b	22,3 ^{abcd}	8,8 ^{ab}
КГС				
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0	21,4 ^b	10,3 ^a	17 ^{abcd}	1,7 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 517, 2,0	24,9 ^b	20,4 ^{ab}	25,6 ^{bcd}	37,3 ^b
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517, 2,0	17,3 ^b	0 ^a	24,7 ^{abcd}	23,8 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 2,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517, 1,0	3,72 ^a	0 ^a	9,5 ^{abcd}	2,1 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 1,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517, 1,0	16,9 ^b	0 ^a	25,4 ^{bcd}	7,0 ^{ab}
ОПС				
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0	5,2 ^a	13,4 ^a	15,9 ^{abcd}	19,5 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 517, 2,0	0,08 ^a	0 ^a	20,5 ^{abcd}	0 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517, 2,0	25,2 ^b	15,7 ^a	30,2 ^d	0 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 2,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517, 1,0	9,4 ^a	0 ^a	24,5 ^{bcd}	8,2 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 1,0 + <i>B. subtilis</i> BZR 517, 1,0	0 ^a	2,82 ^a	24,5 ^{bcd}	22,6 ^{ab}
Между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности				

Штаммы *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 уже демонстрировали свою способность стимулировать рост и развитие растений пшеницы на более ранних этапах исследований (Асатулова, 2012). По результатам опыта на искусственном инфекционном фоне было отмечено положительное влияние на длину и массу надземной части растений.

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 % – КБ, от 15,9 до 30,2 % – ОПС, длины корня от 23,8 до 37,3 % на среде КГС, от 28,3 до 39,6% – КБ, от 19,5 до 22,6 % – ОПС, массы побега до 16,9 % на среде КГС, массы корня до 47,3 на среде КВ (Хомяк, Жевнова, Асатулова, 2021). Отмечено, что для вариантов, с применением ОПС характерно более интенсивное увеличение роста и развития надземных частей растений, более дружные и выровненные всходы. Такие результаты обусловлены способностью штаммов бактерий рода *Bacillus* как непосредственно стимулировать рост растений за счет синтеза регуляторов роста (ауксины), так и опосредованно влиять на рост растений за счет синтеза антибиотиков, биосурфактантов и сидерофоров, подавляющих рост и развитие фитопатогенов (Максимов, Веселова, Нужная, 2015).

Отмечено, что для вариантов, в которых применялась оптимизированная среда характерно более интенсивное увеличение роста и развития надземных частей растений, более дружные и выровненные всходы.

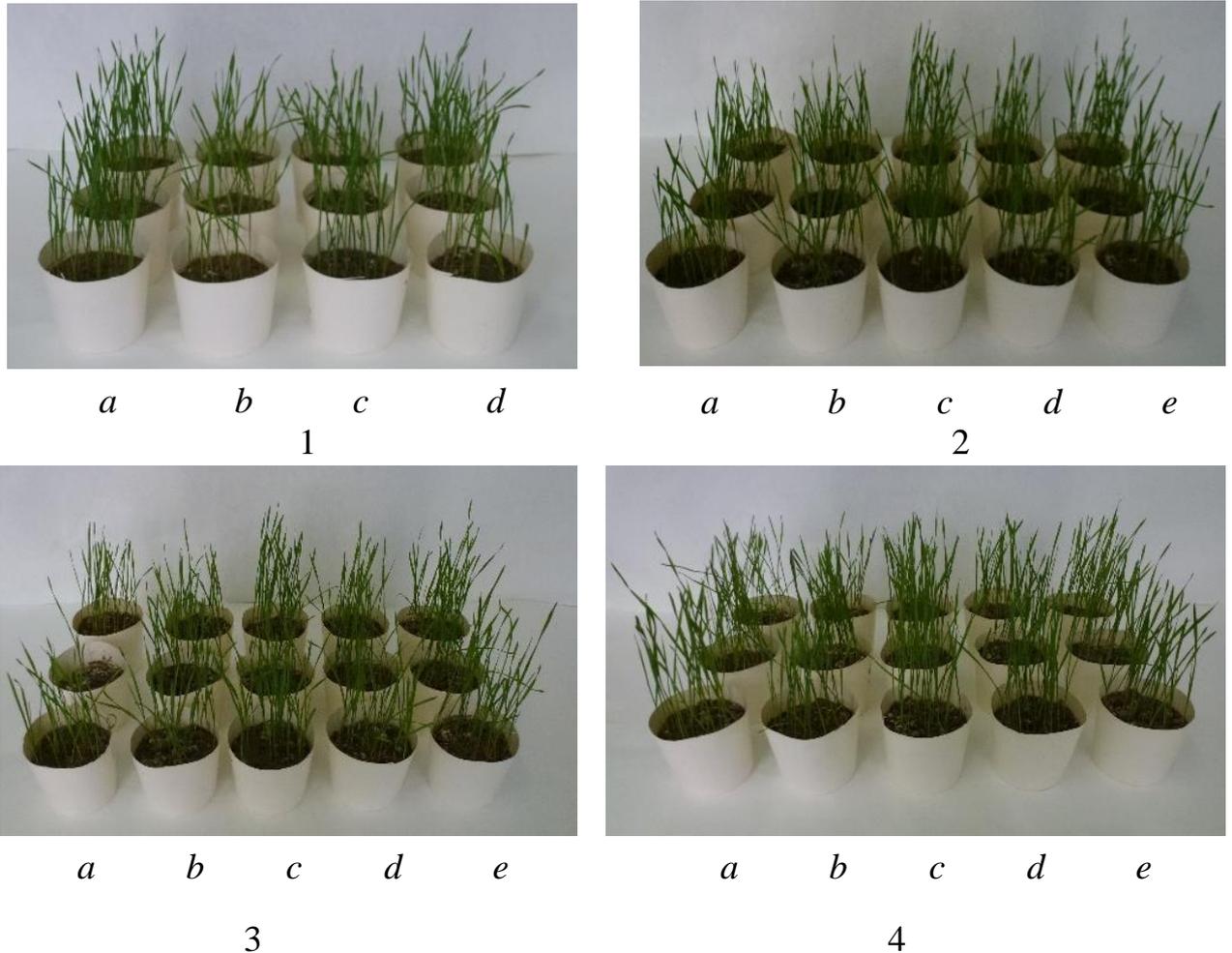


Рисунок 20 – Влияние ЖК штаммов на рост и развитие растений пшеницы озимой на фоне искусственного заражения грибом *F. graminearum* BZR F-4 с применением различных питательных сред (ориг.)

1a – контроль без инфекции; 1b – контроль с инфекцией; 1c – Кинто Дуо, КС; 1d – Фитоспорин –М, Ж.

2 – КГС; 3 – КБ; 4 – ОПС

a – *B. subtilis* BZR 336g; b – *B. subtilis* BZR 517; c – *B. subtilis* BZR 336g + *B. subtilis* BZR 517 (3+2); d – *B. subtilis* BZR 336g + *B. subtilis* BZR 517 (2+1); e – *B. subtilis* BZR 336g + *B. subtilis* BZR 517 (1+1).

В ходе исследований установлено, что применение ЖК, полученной с использованием ОПС обеспечивало всхожесть и биологическую эффективность на уровне стандартных сред. Но с учетом того, что компоненты

ОПС доступные, а ЖК штаммов на ее основе обладает высокой эффективностью по таким критериям как количество колониеобразующих единиц и антифунгальная активность, ОПС была включена в программу исследований по разработке технологии производства биопрепаратов. Кроме того, установлено, что совместное применение штаммов нецелесообразно, так как значения всхожести и биологической эффективности, полученные в результате применения смеси штаммов в различных соотношениях, достоверно не различаются внутри одной группы.

3.6 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.

Технические условия являются неотъемлемой частью комплекта конструкторской или другой технической документации на продукцию, а при отсутствии документации должны содержать полный комплекс требований к продукции, ее изготовлению, контролю и приемке. ТУ является техническим документом, который разрабатывается по решению разработчика (изготовителя) или по требованию заказчика (потребителя) продукции (ГОСТ 2.114-95).

Биопрепараты применяются в качестве микробиологических препаратов для защиты растений пшеницы озимой от возбудителей болезней. Обработку проводят рабочим раствором препарата путем предпосевной

обработки семян и опрыскивания вегетирующих растений. Срока ожидания у препаратов нет.

Препараты пожаровзрывобезопасны. В воздушной среде и в присутствии других веществ пожаровзрывоопасных соединений не образуют.

Пролитые в помещении препараты засыпают песком, опилками или почвой, собирают в контейнеры и уничтожают путем захоронения в отведенных для этого местах. Место разлива промывают водой, либо 2 % раствором хлорамина. В случае разлива препаратов на открытом пространстве участки разливов засыпаются песком опилками или почвой, либо перекапываются.

Хранить препараты следует в крытых складских помещениях, обеспечивающих защиту от воздействия прямых солнечных лучей. Температура хранения +4 +10° С.

Допускается хранить биопрепараты при температуре до +25° С в течение 3 месяцев. Гарантийный срок хранения 6 месяцев.

По истечении указанного срока продукт подвергается повторным испытаниям на соответствие показателей требованиям ТУ

Детально проработаны и оформлены ТУ на каждый комплексный бактериальный биопрепарат (приложение 3).

Лабораторный регламент является первым нормативным технологическим документом, разработкой которого завершаются научные исследования в лабораторных условиях. Лабораторный регламент устанавливает методы изготовления продукции и условия, обеспечивающие воспроизводимость технологических процессов в лабораторных условиях со стабильными выходами, а также правила техники безопасности (ГОСТ Р 54763-2011).

Новый штамм-продуцент биопрепарат *B. subtilis* BZR 336g:

- справка о депонировании культуры микроорганизмов в ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения

Россельхозакадемии (РСАМ) от 5 декабря 2012 г. Штамм депонирован под регистрационным номером РСАМ01729;

- патент РФ на изобретение № 2553518 от 20.05.2015 «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* для получения биофунгицида против фитопатогенных грибов»;

- заключение о патогенности штамма *B. subtilis* BZR 336g для теплокровных животных от 17.05.2013 г. (приложение 4).

Новый штамм-продуцент биопрепарат *B. subtilis* BZR 517:

- справка о депонировании культуры микроорганизмов в ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии (РСАМ) от 5 декабря 2012 г. Штамм депонирован под регистрационным номером РСАМ01728;

- патент РФ на изобретение № 2552146 от 29.04.2015 «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* BZR 517 для получения биофунгицида против фитопатогенных грибов»;

- заключение о патогенности штамма *B. subtilis* BZR 517 для теплокровных животных от 17.05.2013 г. (приложение 4).

- патент РФ на изобретение № 2621356 от 02.06.2017 «Биофунгицид для защиты сельскохозяйственных культур от болезней и повышения урожайности» (приложение 5).

Для выращивания штамма-продуцента комплексных бактериальных биопрепаратов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на твердой питательной среде в пробирках и ЧП используют МПА.

МПА (г, мл/л): мясо-пептонный агар – 41,5, вода дистиллированная – 1000.

Для получения комплексных бактериальных биопрепаратов на основе *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 используют оригинальную оптимизированную питательную среду следующего состава: хлористый калий, магний серноокислый, калий фосфорнокислый, кукурузный экстракт, кальций углекислый, железо сернокислое, меласса, вода дистиллированная.

При этом маточную культуру получают методом внесения агаризованных блоков штамма *B. subtilis* BZR 336g в конические колбы (350 мл) с объемом оптимизированной питательной среды 100 мл и последующим культивированием. Агаризованные блоки вырезаются стерильным ланцетом, предварительно прокаленным в стерилизаторе StenMax15. Внесение агаризованных блоков осуществляется в ламинарном шкафу с вертикальным потоком воздуха SafeFAST Elite, для обеспечения стерильности работы. После внесения агаризованных блоков колбы накрываются ватно-марлевыми крышками и плотно завязываются резинками и устанавливаются в термостатированные системы культивации клеток New Brunswick Scientific Excella E25. Инкубация осуществляется при 180 об./мин. в течение 48 ч. при температуре 30 °С для получения биопрепарата на основе *B. subtilis* BZR 336g и при 36 ч. при температуре 35 °С для получения биопрепарата на основе *B. subtilis* BZR 517.

Комплексные биопрепараты на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 получают внесением маточной культуры (2,0 % от объема питательной среды) в конические колбы (1000 мл) с объемом оптимизированной питательной среды 500 мл и последующим культивированием. Внесение маточной культуры осуществляется одноканальным дозатором 1000-10 000 мкл. Eppendorf. Внесение маточной культуры осуществляется в ламинарном шкафу с вертикальным потоком воздуха SafeFAST Elite, для обеспечения стерильности работы. После внесения маточной культуры колбы плотно завязываются резинками и устанавливаются в термостатированные системы культивации клеток New Brunswick Scientific Excella E25. Инкубация осуществляется при 180 об./мин. в течение 48 ч. при температуре 30 °С для получения биопрепарата на основе *B. subtilis* BZR 336g и при 36 ч. при температуре 35 °С для получения биопрепарата на основе *B. subtilis* BZR 517.

Далее осуществляются слив и упаковка биопрепаратов в тару из

пластических масс, которые являются наиболее гигиеничными, удобными, гарантирующими защиту биопрепарата от вредных воздействий атмосферного воздуха и загрязнения.

Детально проработанны и оформлены лабораторные регламенты на каждый комплексный бактериальный биопрепарат (приложение 6).

Полученные экспериментальные данные в рамках лабораторных регламентов и ТУ будут прошли апробацию в ООО «Биотехагро» и предложены для промышленного производства (приложение 7). Использование данной технологии в перспективе позволит максимально удовлетворять потребности региональных сельхозтоваропроизводителей, что особенно актуально для юга России, так как тенденцией современного этапа развития биологической защиты растений в РФ является существование не только крупнотоннажного производства биопрепаратов, но и их наработка в условиях биолaborаторий или небольших фирм.

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

Испытания лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на фоне естественного заражения в условиях мелких делянок были проведены в течение трех лет в период с 2013 по 2015 гг. на экспериментальной базе ФГБНУ ФНЦБЗР (рисунок 22). Для закладки опыта была использована мягкая пшеница озимая сорта Калым.



Рисунок 21 – общий вид участка (экспериментальная база ФГБНУ ФНЦБЗР, мелкие делянки, 2012 г.) (ориг.)

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%. (рисунок 22).

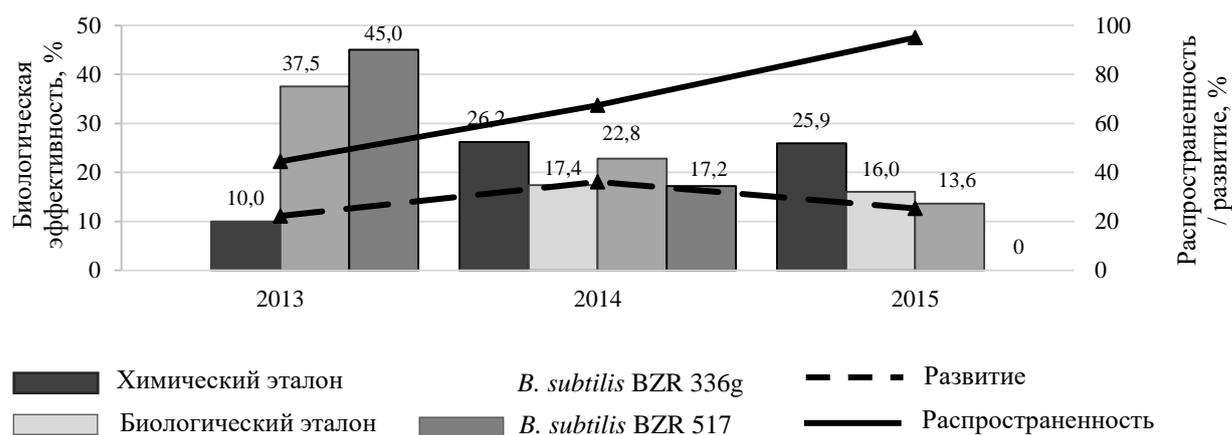


Рисунок 22 – Биологическая эффективность лабораторных образцов биопрепаратов против фузариозных корневых гнилей пшеницы озимой в условиях полевого мелкоделяночного опыта, сорт Калым, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013-2015 гг.

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.

Одним из показателей, определяющих сохраненный урожай зерновых культур является масса 1000 зерен (таблица 16). 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. 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.

Таблица 16 – Хозяйственная эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на растениях пшеницы озимой в условиях полевого мелкоделяночного опыта, сорт Калым, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013-2015 гг.

Вариант, нормы 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									

Таким образом обработка лабораторными образцами биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 при благоприятных погодных условиях способна снижать развитие корневых гнилей фузариозной этиологии пшеницы озимой, а также обеспечивать сохраненный урожай в условиях мелкоделяночных полевых испытаний.

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

Для исследования совместимости штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 выбрали прилипатели разных химических групп (рисунок 23).

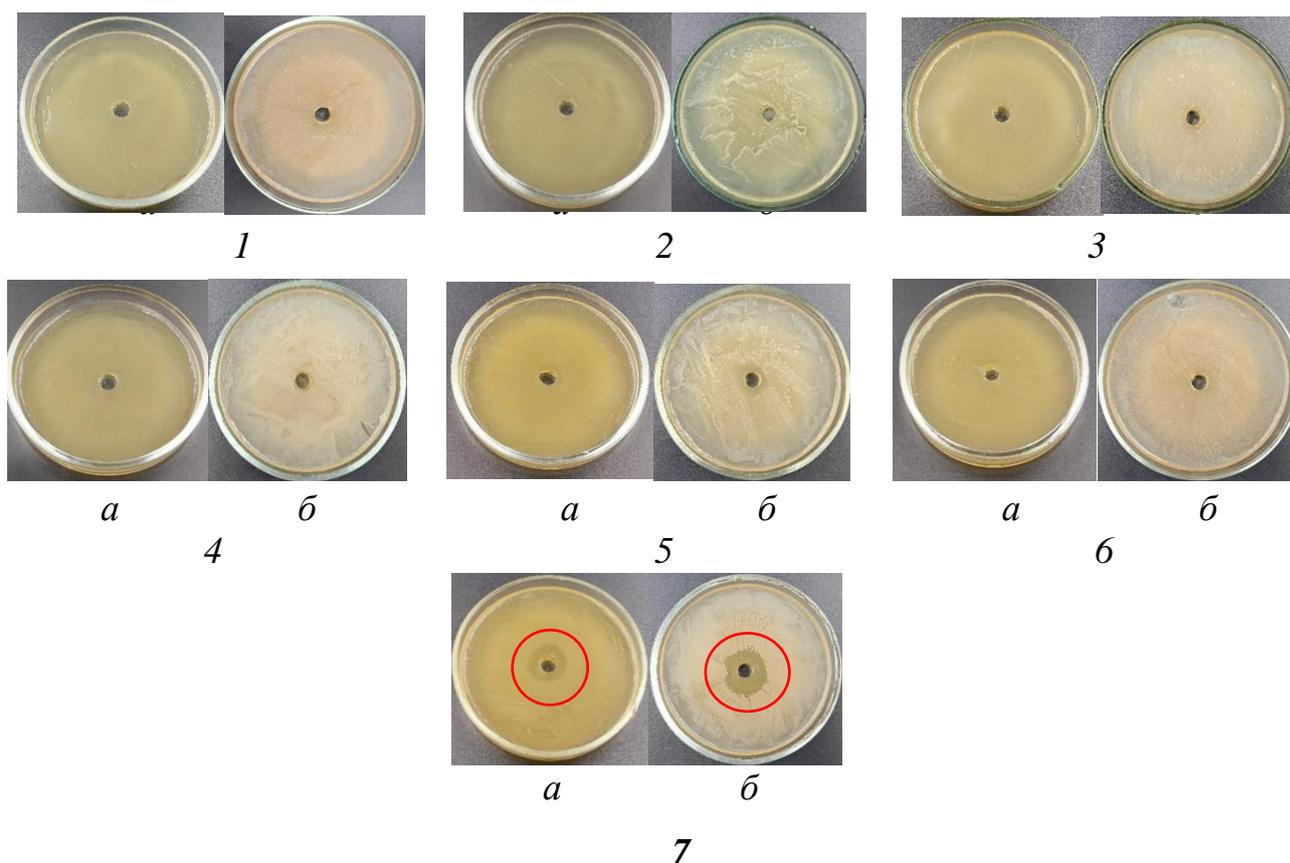


Рисунок 23 – Совместное культивирование штаммов *B. subtilis* BZR 336g (а) и *B. subtilis* BZR 517 (б) с прилипателями (ориг.)

1 – контроль, 2 – Адю, 3 – Липосам, 4 – Хайгер, 5 – Сильвет Голд, 6 – Полидон Бонд, 7 – Панэм

В ходе исследований установлено, что Панэм ингибировал рост исследуемых штаммов.

Прилипатели, не оказывающие на штаммы *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 ингибирующее действие, были включены в план исследования по определению влияния на такие критерии как количество колониеобразующих единиц и антифунгальная активность.

Отмечено, что для штамма *B. subtilis* BZR 336g данные, полученные в варианте с применением прилипателя Сильвет Голд, статистически значимо отличались от лабораторного образца биопрепарата без добавления прилипателей (рисунок 24). Так, 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 статистически достоверно снижать количество колониеобразующих единиц с $2,7 \times 10^8$ до $2,0-2,1 \times 10^8$ КОЕ/мл.

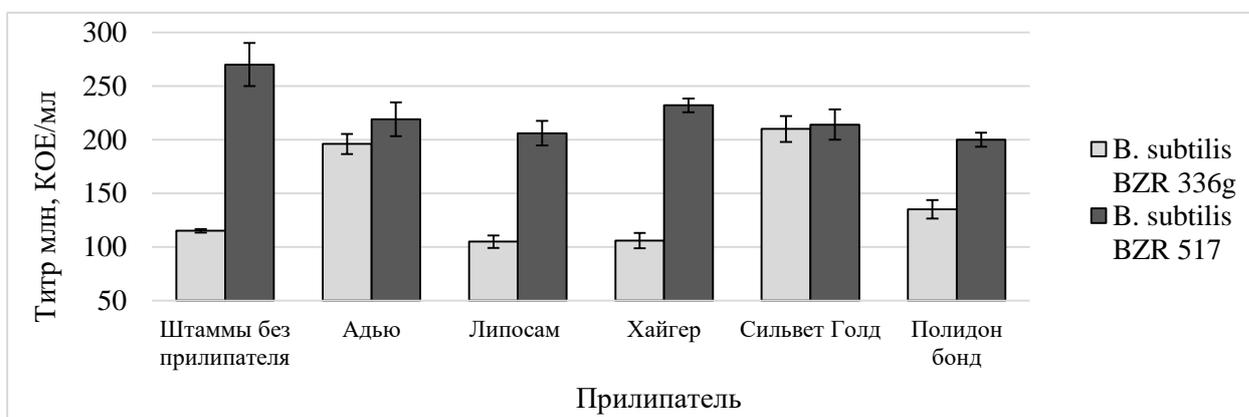


Рисунок 24 – Влияние прилипателей на количество колониеобразующих единиц в одном мл лабораторного образца биопрепарата на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

Прилипатели способны снижать антифунгальную активность лабораторных образцов биопрепаратов на основе исследуемых штаммов (таблица 17).

Таблица 17 – 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/га	Антифунгальная активность, %			
	инкубация, сут.			
	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,	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				

Так, для штамма *B. subtilis* BZR 336g на пятые сутки инкубирования для прилипателей Липосам и Полидон Бонд отмечено достоверное снижение антифунгальной активности в отношении *F. graminearum* BZR F-4 до уровня 47,0% и 31,0% соответственно. К десятым суткам инкубирования в варианте с применением прилипателя Полидон Бонд отмечено полное отсутствие антифунгальной активности по сравнению с лабораторным образцом без добавления прилипателя. Данные, полученные с применением прилипателя Хайгер, статистически значимо не отличались от лабораторного образца без добавления прилипателей – 79,5 и 78,5% соответственно.

Эта тенденция сохранялась на 15-е и 20-е сутки учета. Применение Хайгера обеспечивало ингибирование мицелия *F. graminearum* BZR F-4 на

уровне лабораторного образца без добавления прилипателя до 73,0 % на 15-е сутки и до 61,3 % на 20-е сутки, в то время как внесение других прилипателей снижало антифунгальную активность лабораторного образца биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g. Применение прилипателя Адьо на пятые сутки инкубирования статистически значимо не отличалось от лабораторного образца – 76,3 %. Но к 10-м суткам антифунгальная активность в варианте с применением Адьо начала снижаться и к 20-м суткам было отмечено отсутствие ингибирования мицелия патогена.

Для штамма *B. subtilis* BZR 517 также отмечено снижение антифунгальной активности при применении прилипателя Полидон Бонд. Так, на пятые сутки ингибирования мицелия *F. graminearum* BZR F-4 отмечено на уровне 36,8% по сравнению с лабораторным образцом – 75,9 %, на 10-е 22,0% и 64,6% соответственно. К 15-м суткам инкубирования было отмечено отсутствие ингибирования мицелия патогена (рисунок 39).

Также для штамма *B. subtilis* BZR 517 отмечено статистически достоверное снижение антифунгальной активности при добавлении прилипателя Сильвет Голд с 57,4 до 40,7 % в течение всего периода инкубации. Для остальных прилипателей статистически значимой разницы зафиксировано не было.

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 (Cambaza, 2018) (рисунок 25).

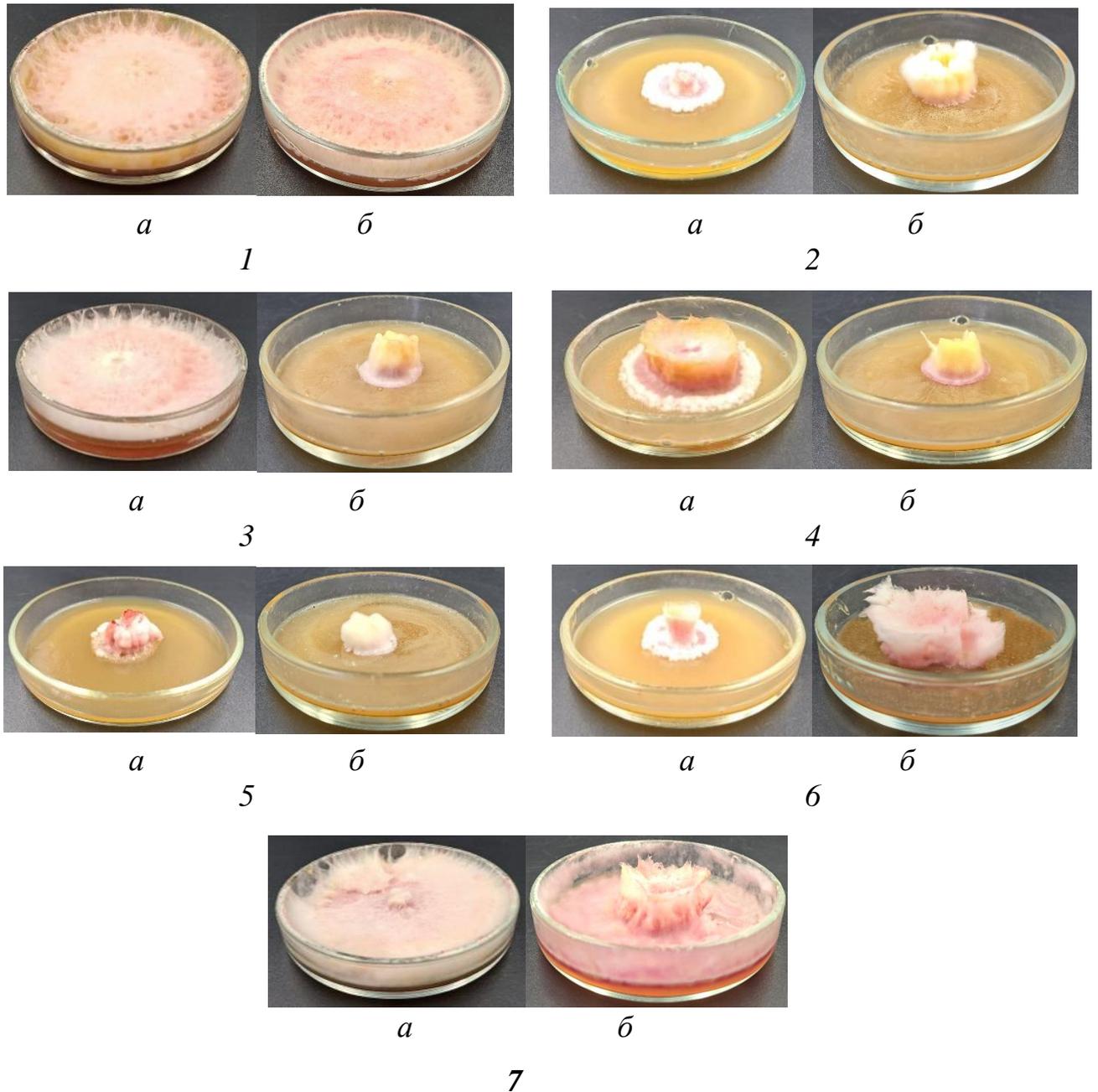


Рисунок 25 – Влияние прилипателей на антифунгальную активность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336 g (a) и *B. subtilis* BZR 517 (б) (ориг.)

1 – контроль, 2 – Штамм без прилипателя, 3 – Адю, 4 – Липосам, 5 – Хайгер, 6 – Сильвет Голд, 7 – Полидон Бонд

При просмотре ТСХ-пластин под УФ366 светом обнаружен набор полос, различающихся как по площади, так и по характеру свечения, который дает возможность сделать предположение относительно химической структуры светящихся компонентов (рисунок 26). Так, синее свечение при длине волны 366 нм говорит о присутствии соединений фенольной природы (R_f 0,78), зеленое – циклических соединений (R_f 0,74). Однако при добавлении различных прилипателей площадь и состав соединений менялись. Для штамма *B. subtilis* BZR 336g в сочетании с прилипателем Адю отмечено отсутствие соединений фенольной природы, оказывающих на гриб фунгицидное действие. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 в варианте с добавлением прилипателя Сильвет голд, зона циклических соединений отсутствовала, а при добавлении прилипателя Хайгер площадь соединений фенольной природы была значительно меньше.

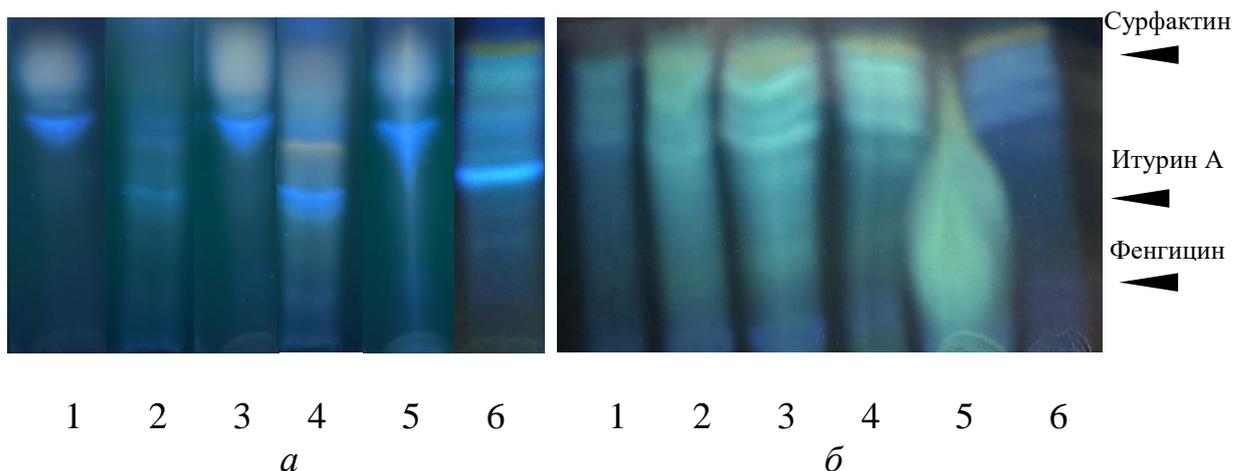


Рисунок 26 – Хроматограмма метаболитов лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g (а) и *B. subtilis* BZR 517 (б) с различными прилипателями в составе под ультрафиолетом 366 нм (ориг.) 1 –Хайгер, 2 – Адю, 3 – Полидон Бонд, 4 – Липосам, 5 – Сильвет голд, 6 – штамм без прилипателя

Что касается биоавтографических исследований вариантов опыта с добавлением прилипателей, на пластинах было отмечено полное отсутствие роста гриба, вероятно, из-за компонентов прилипателей.

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.

Отмечено, что для обоих штаммов показатели всхожести статистически значимо не отличались от лабораторного образца. Исключение составил только Липосам в сочетании со штаммом *B. subtilis* BZR 336g, обеспечивший всхожесть на уровне 43,3%, всхожесть в лабораторном образце без прилипателя составила 63,0% (таблица 18).

Таблица 18 – 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, 2023 г.

Вариант, норма применения, мл/га	Всхожесть, %	Биологическая эффективность, %*
<i>B. subtilis</i> BZR 336g		
Контроль без инфекции	100 ^c	-
Контроль с инфекцией*	62 ^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 ^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 мл / га	86,7 ^a	12,6 ^a
Липосам, Г, 6 мл/га	98,9 ^a	17,7 ^a
Хайгер, Ж, 4,5 мл/га	90 ^a	60,9 ^c
Сильвет Голд, Ж, 3 мл / га	84,4 ^a	0 ^{ab}
Полидон Бонд, Ж, 4,5 мл/га	88,9 ^a	0 ^b
<i>B. subtilis</i> BZR 517 без прилипателя	91,1 ^a	19,4 ^a
* - 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 без прилипателя (13,5%), в то время как совместно применение Сильвет Голд в сочетании с лабораторным образцом биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 517 не оказало защитного эффекта.

Отсутствие защитного действия против корневой гнили фузариозной этиологии у лабораторного образца на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g отмечено в вариантах с применением в качестве прилипателей Аджю, Липосам и Полидон Бонд, у лабораторного образца на основе штамма *B. subtilis* BZR 517 – с Сильвет Голд и Полидон Бонд.

В ходе исследования влияния прилипателей на ростстимулирующую активность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 установлено, что для длины побега статистически значимые различия между лабораторным образцом и вариантами с добавлением прилипателей отмечены для штамма *B. subtilis* BZR 336g в вариантах с применением Липосама и Полидона Бонд. Применение данных прилипателей обеспечивало прибавку длины побега от 35,9 до 36,8 %, по сравнению с лабораторным образцом без прилипателя. Для длины корня у обоих штаммов статистически значимых различий между лабораторным образцом и вариантами с применением прилипателей отмечено не было (таблица 19).

Также в ходе исследований не отмечено статистически значимого увеличения массы побегов и корней по сравнению с лабораторным образцом при применении различных прилипателей. В ходе исследований отмечено, что в вариантах с применением штаммов *B. subtilis* масса побега и корня меньше, чем в контроле с инфекцией (Хомяк, Жевнова, Аллахвердян и др., 2023).

Таблица 19 – Влияние лабораторных образцов биопрепаратов на рост и развитие растений пшеницы озимой на фоне искусственного заражения грибом *F. graminearum* BZR F-21 с применением различных прилипателей, климатическая камера, сорт Таня, 2023 г.

Вариант, норма применения	прибавка массы побега, %	прибавка массы корня, %	прибавка длины побега, %	прибавка длины корня, %
<i>B. subtilis</i> BZR 336g				
Адью, Ж, 3 мл / га	0 ^a	0 ^a	8,5 ^{ab}	0 ^a
Липосам, Г, 6 мл/га	30,4 ^{abc}	0 ^a	36,8 ^{bc}	16,3 ^a
Хайгер, Ж, 4,5 мл/га	0 ^{ab}	0 ^a	0,3 ^a	7,3 ^a
Сильвет Голд, Ж, 3 мл/га	0 ^a	0 ^a	0,3 ^a	5,9 ^a
Полидон Бонд, Ж, 4,5 мл/га	37,6 ^{abc}	7,3 ^a	35,9 ^{bc}	40,6 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 336g без прилипателя *	0,0157 ^{abc}	0,0079 ^a	9,2 ^a	1,2 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 517				
Адью, Ж, 3 мл / га	0 ^a	0 ^a	5 ^d	0,9 ^a
Липосам, Г, 6 мл/га	0 ^a	0 ^a	0 ^{bc}	8,7 ^a
Хайгер, Ж, 4,5 мл/га	0 ^a	0 ^a	0 ^{abc}	0 ^b
Сильвет Голд, Ж, 3 мл/га	0 ^a	0 ^a	0 ^{ab}	0 ^b
Полидон Бонд, Ж, 4,5 мл/га	0 ^a	0 ^a	0 ^a	4,8 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 517 без прилипателя *	0,0215 ^a	0,0129 ^a	19,1 ^d	5,8 ^a
* В вариантах ЖК без прилипателя указаны сантиметры для показателей длины и граммы для показателей массы Между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности				

Такой эффект в сочетании низкой биологической эффективностью, вероятно, может быть обусловлен запуском реакций в тканях растения, способствующих развитию приобретенного иммунитета при воздействии агрессивных патогенов (Palazzini, Alberione, Torres, et al., 2016; Кабашникова, 2020).

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.

Заключение

Изучено влияние штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на рост и развитие растений пшеницы озимой сорт Батько в динамике. Установлено, что применение штаммов способствовало увеличению длины побега на 2,4-17,1%, длины корня на 8,0-37,3%, массы побега на 5,5-24,5%, массы корня на 4,1-48,8 %, по сравнению с контролем.

Изучено влияние источников углеродного питания на количество колониобразующих единиц и антифунгальную активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517. Установлено, что использование мелассы в качестве источника углерода обеспечивало титр ЖК штамма *B. subtilis* BZR 336g на уровне $(4,0 \pm 0,14) \times 10^7$ КОЕ/мл, штамма *B. subtilis* BZR 517 на уровне $(1,3 \pm 0,09) \times 10^7$ КОЕ/мл. Кроме того, добавление мелассы обеспечивало антифунгальную активность в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 на уровне 9,8% для штамма *B. subtilis* BZR 336g и 8,8 % для штамма *B. subtilis* BZR 517. Добавление в среду для культивирования мелассы способствовало синтезу соединений итуриновой структуры, в то время как применение сахарозы обеспечивало синтез сурфактиноподобных соединений.

Изучено влияние источников азотного питания на количество колониобразующих единиц и антифунгальную активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517. Установлено, что внесение в питательную среду для культивирования штамма *B. subtilis* BZR 336g пептона, дрожжевого и кукурузного экстрактов способствовало получению титра на уровне $(1,8 \pm 0,1) \times 10^7$, $(1,5 \pm 0,28) \times 10^7$ и $(7,1 \pm 0,4) \times 10^7$ КОЕ/мл соответственно. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 титр $(1,1 \pm 0,08) \times 10^8$ и $(1,1 \pm 0,05) \times 10^8$ КОЕ/мл был отмечен при добавлении пептона и кукурузного экстракта. Добавление дрожжевого и кукурузного экстрактов в среду для штамма *B. subtilis* BZR 336g обеспечивало ингибирование *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 на уровне 7,2

и 8,8 % соответственно. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 максимальное ингибирование *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 отмечалось на среде с добавлением пептона – 19,1 %. Биоавтографические исследования показали, что сурфактин синтезировался обоими штаммами на среде пептоном и кукурузным экстрактом.

Изучено влияние температуры культивирования на количество колониобразующих единиц и антифунгальную активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517. Установлено, что для штамма *B. subtilis* BZR 336g оптимальной является температура культивирования 20,0°C – $(1,7 \pm 0,07) \times 10^9$ КОЕ/мл и 25,0°C – $(1,6 \pm 0,2) \times 10^9$ КОЕ/мл. Высокий титр ЖК штамма *B. subtilis* BZR 517 отмечен при температуре 30,0 °C – $(8,9 \pm 0,4) \times 10^8$ КОЕ/мл. Культивирование штамма *B. subtilis* BZR 336g при температуре 20,0 и 25,0°C способствовало накоплению метаболитов, обеспечивающих антибиотическую активность в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 на уровне 33,3 % и 32,1 % соответственно. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 максимальная антибиотическая активность (24,4 % и 25,9 % соответственно) отмечена при температуре 25,0 и 30,0° C. Отмечено, что сурфактин обоими штаммами синтезируется во всех вариантах опыта, а итурин только при температуре 20 и 25°C для штамма *B. subtilis* BZR 336g, и 30,0 и 35,0°C для штамма *B. subtilis* BZR 517.

Изучено влияние кислотности питательной среды на количество колониобразующих единиц и антифунгальную активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517. Установлено, что для штамма *B. subtilis* BZR 336g максимальный титр клеток на уровне $(2,7 \pm 0,07) \times 10^9$ КОЕ/мл отмечен при pH 8,0. 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 отмечен при pH 6,0 и 8,0. При этих значениях pH также были отмечены максимальные показатели антифунгальной активности в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 – 23,1 % для штамма *B. subtilis* BZR 336g, 7,5 % и 41,8% для штамма *B. subtilis* BZR 517. При пониженной pH

3,0 существенно снижался синтез антибиотических веществ для подавления роста тест-культуры. Установлено, что максимальное накопление сурфактина и итурина А, оказывающих выраженный фунгицидный эффект, происходит при рН 8,0 для штамма *B. subtilis* BZR 336g и 6,0 и 8,0 для штамма *B. subtilis* BZR 517.

Изучено влияние времени культивирования на количество колониеобразующих единиц и антифунгальную активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517. Максимальный титр клеток был отмечен в экспоненциальную фазу роста. Для штамма *B. subtilis* BZR 336g эта фаза отмечена в период от 16-и до 36-и часов. Титр был отмечен на уровне $(2,4 \pm 0,24) \times 10^9$ КОЕ/мл. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 экспоненциальная фаза отмечена в период от 16-и до 24-х, титр составил $(1,4 \pm 0,01) \times 10^9$ КОЕ/мл. В этот же период для обоих штаммов отмечено максимальное накопление антифунгальных метаболитов, обеспечивающих ингибирование *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 на 20,0 % для штамма *B. subtilis* BZR 336g и на 21,3 % для штамма *B. subtilis* BZR 517.

Установлено влияние оптимизированной питательной среды на количество колониеобразующих единиц и антифунгальную активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517. Обнаружено, 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, что на два-три порядка выше, чем на стандартных питательных средах. Для штамма *B. subtilis* BZR 336g антифунгальная активность в отношении *F. graminearum* BZR F-4 от 76,0 до 90,0 % отмечена на ОПС, тогда как на питательных средах КВ антифунгальная активность составила от 46,1 до 64,0%. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 существенной разницы между ОПС и стандартными средами выявлено не было, антифунгальная активность на всех средах составила от 46,8 до 64,0 %. Хроматографический анализ показал, что синтез итурина отмечен у обоих штаммов, при этом для штамма *B. subtilis* BZR 517 он было

наиболее выражен на среде 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 в варианте со штаммом *B. subtilis* BZR 336g на среде КВ.

Проведена оценка препаративной формы лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517. Установлено, что лабораторные образцы представляют собой жидкую культуру, состоящую из питательной среды и бактериальных клеток. Цвет желто-оранжевый или оранжевый. Состав однородный. Со временем выпадает осадок минеральных солей, входящих в состав питательной среды. В некоторых случаях возможно образование хлопьев углекислого кальция.

Установлено влияние состава питательной среды на биологическую эффективность ЖК штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на фоне искусственного заражения в условиях климатической камеры. Отмечено, что применение ОПС обеспечило всхожесть растений пшеницы озимой, сорт Батько, от 81,1 до 97,7 %, в то время как применение стандартных сред обеспечило всхожесть на уровне 65,5-77,7 %. Установлено, что максимальная биологическая эффективность в отношении *F. graminearum* BZR F-4 в вариантах опыта с применением ЖК на основе исследуемых штаммов была достоверно выше, чем в биологическом эталоне и на уровне химического эталона. Так, применение ЖК на основе смеси штаммов *B. subtilis* BZR 336g и BZR 517 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%. 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.

На основании полученных данных детально проработанны и оформлены технические условия и лабораторные регламенты на каждый комплексный бактериальный биопрепарат.

Установлено влияние коммерческих прилипателей на жизнеспособность, количество колониеобразующих единиц и антифунгальную активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517. Отмечено, что исследуемые штаммы не совместимы с прилипателем Панэм. Обнаружено, что применение прилипателя Сильвет Голд способно увеличивать титр ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g до $2,1 \times 10^8$ КОЕ/мл. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 отмечена способность прилипателей Полидон Бонд и Липосам статистически достоверно снижать количество колониеобразующих единиц с $2,7 \times 10^8$ до $2,0-2,1 \times 10^8$ КОЕ/мл. Для штамма *B. subtilis* BZR 336g в сочетании с прилипателями Липосам, Полидон Бонд и Адью отмечено достоверное снижение антифунгальной активности в отношении *F. graminearum* BZR F-4 до 0%. Применение Хайгера обеспечивало ингибирование мицелия *F. graminearum* BZR F-4 на уровне лабораторного образца без добавления прилипателя до 73,0 % на 15-е сутки и до 61,3 % на 20-е сутки. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 также отмечено снижение антифунгальной активности при применении прилипателя Полидон Бонд. Также для штамма *B. subtilis* BZR 517 отмечено статистически достоверное снижение антифунгальной активности при добавлении Прилипателя Сильвет Голд с 57,4 до 40,7 % в течение всего периода инкубации. Для остальных прилипателей статистически значимой разницы зафиксировано не было. Для штамма *B. subtilis* BZR 336g в сочетании с прилипателем Адью отмечено отсутствие соединений фенольной природы. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 в варианте с добавлением прилипателя Сильвет голд, зона циклических

соединений отсутствовала, а при добавлении прилипателя Хайгер площадь соединений фенольной природы была значительно меньше.

Установлено влияние коммерческих прилипателей на биологическую эффективность и ростстимулирующий эффект лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517. Отмечено, что применение прилипателя Липосам в сочетании с лабораторным образцом биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g обеспечивает всхожесть на уровне 43,3% по сравнению с лабораторным образцом без прилипателя – 63,0%. В остальных вариантах статистически значимой разницы зафиксировано не было. Внесение в лабораторный образец биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 517 прилипателя Хайгер обеспечило статистически достоверный защитный эффект на уровне 60,9 %. Для штамма *B. subtilis* BZR 336g применение прилипателя Сильвет Голд обеспечило биологическую эффективность, статистически не отличающуюся от лабораторного образца – 13,5%. Отсутствие защитного действия против корневой гнили фузариозной этиологии 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 обеспечивало прибавку длины побега от 35,9 до 36,8 %, по сравнению с лабораторным образцом. Для показателей длины корня, массы побегов и корней у обоих штаммов статистически значимых различий между лабораторным образцом и вариантами с применением прилипателей отмечено не было.

Установлено влияние лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на биологическую эффективность и структуру урожая на фоне естественного заражения в условиях мелких делянок. Отмечено, что в 2013 г. биологическая эффективность в вариантах с применением ЖК исследуемых штаммов составила от 37,5 до 45,0

%, в варианте с применением химического эталона – 10 %. Применение лабораторных образцов биопрепаратов обеспечило получение сохраненного урожая на уровне 3,9 т/га, химического эталона – 2,9 т/га. В 2014 г. биологическая эффективность в вариантах с применением исследуемых штаммов отмечена на уровне 17,2-22,8 % при биологической эффективности в варианте с применением химического эталона – 26,2 %, биологического – 17,4 %. 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. 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 %. В варианте с применением лабораторного образца на основе штамма 517 защитный эффект не отмечен. 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.

Выводы

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. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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 Адью 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ рынка биопрепаратов для защиты растений и инокулянтов в 2022-2023 гг, 2023. Электронный ресурс [<https://airp-rf.ru/list/udobreniya-mi5/?ysclid=lseaisaii5687495721>]
2. Асатулова А.М. Изучение кинетики роста штаммов бактерий-антагонистов возбудителей фузариоза при периодическом культивировании // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК. 2008. № 1(138). С. 79-82.
3. Асатулова, А.М. Перспективные штаммы бактерий – продуценты микробиопрепаратов для снижения вредоносности фузариоза на подсолнечнике: дисс... канд. биол. наук. СПб., 2009. 176 с.
4. Асатулова А.М., Дубяга В.М., Томашевич Н.С., Жарникова М.Д. Отбор перспективных агентов биологического контроля для защиты озимой пшеницы от возбудителей фузариоза // Электронный политематический научный журнал КубГАУ. 2012. №75 (01). [электронный ресурс] - Режим доступа [<http://ej.kubagro.ru/2012/01/pdf/37.pdf>].
5. Асатулова А.М., Томашевич Н.С., Дубяга В.М., Жевнова Н.А., Павлова М.Д., Хомяк А.И. Штаммы бактерий-антагонистов, обладающие ростстимулирующей активностью в отношении растений озимой пшеницы // Достижения науки и техники АПК. 2023. Т. 37. № 5. С. 21-27. DOI: 10.53859/02352451_2023_37_5_21
6. Астапчук И. Л., Якуба Г. В., Насонов А. И. Антифунгальная активность биологических препаратов по отношению к возбудителям корневой гнили и гнили сердцевины плодов яблони из рода *Fusarium link* // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2021. №. 71. С. 219-233.
7. Ахмедова Ф.Р., Джафарова У.Д. Изучение распространения пигментообразующих бактерий в различных субстратах // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2012. № 12. С. 26-29

8. Белошапкина О.О. Биопрепараты в защите садовых растений против фитопатогенных грибов // «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем» с молодежной стратегической сессией «Кадры, ресурсы, возможности, инновации». Материалы Международной научно-практической конференции. Краснодар. 2016. С. 533-537.

9. Биологическая защита растений / под ред. М.В. Штерншис. М.: Колос. 2004. 264 с.

10. Биопрепараты для защиты растений: оценка качества и эффективности // под ред. О. М. Минаева, Е. Е. Акимова, Т. И. Зюбанова, Н. Н. Терещенко. – Томск: Национальный исследовательский Томский государственный университет, 2018. 130 с.

11. Бирюков, В.В. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза / В.В. Бирюков, В.М. Кантере, М.: Наука, 1985. 296 с.

12. Борисовец Д.С., Журавлева Е.С., Зуйкевич Т.А., Красочко П.А., Яромчик Я.П., Морозов А.М., Курбат И.А. Оптимизация состава среды для культивирования штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из донных отложений пресноводных водоемов // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. 2020. № 2. С. 3-12.

13. Бурова Ю.А., Ибрагимова С.А., Ревин В.В. Получение бактериальной суспензии *Pseudomonas aureofaciens* 2006 на мелассе и изучение некоторых ее свойств // Вестник ОГУ. 2012. №10 (146). С61-65.

14. Ваксман З.А. Антагонизм микробов и антибиотические вещества / З.А. Ваксман, М.: Гос.изд-во иностр. лит., 1947. 391 с.

15. Ванюшина О. И. Органическое сельское хозяйство в России: особенности и перспективы развития // Актуальные вопросы развития современного общества. 2019. С. 72-75.

16. Власова О. И., Данилец Е. А., Передериева В. М., Вольтерс И. А. Эффективность использования биопрепаратов при возделывании озимой

пшеницы // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2019. № 149. С. 23-30. DOI: 10.21515/1990-4665-149-011

17. Высоцкая Е.А., Крекотень М.А. Анализ технологических приемов и технических средств предпосевной обработки семян биопрепаратами // Вестник Воронежского Государственного Аграрного Университета. 2015. № 4-2 (47). С. 100-104.

18. Ганнибал Ф. Б., Гагкаева Т. Ю., Гомжина М. М., Полуэктова Е.В., Гультяева Е.И. Ассоциированные с пшеницей микромицеты и их значимость как возбудителей болезней в России // Вестник защиты растений. 2022. Т. 105, № 4. С. 164-180. DOI 10.31993/2308-6459-2022-105-4-15508.

19. Гатагонова Ф. А. Влияние биопрепарата Бактофит на устойчивость к болезням и продуктивность кукурузы // Научные труды студентов Горского государственного аграрного университета "Студенческая наука - агропромышленному комплексу": Научные труды студентов Горского государственного аграрного университета, Владикавказ, 04-05 апреля 2019 года. Т. 56/3. Владикавказ: Горский государственный аграрный университет, 2019. С. 41-44.

20. Гиченкова О. Г., Лаптина Ю. А. Влияние биопрепаратов на основе *Trichoderma* и *Bacillus subtilis* на продуктивность картофеля в условиях орошаемого земледелия Волгоградской области // Аграрная Россия. 2023. №. 7. С. 17-23.

21. Гордеева Ю.Л., Ивашкин Ю.А., Гордеев Л.С. Алгоритмы расчета показателей процесса микробиологического синтеза в периодических условиях культивирования // Вестник Астраханского государственного технического университета. 2011. № 2. С. 7-14.

22. ГОСТ 2.114-95 Технические условия. Минск.: ИПК Издательство стандартов № 1995. 1995. 25 с.

23. ГОСТ Р 54763-2011 Средства лекарственные для ветеринарии. Технологические регламенты производства. М.: Стандартинформ. 2013. 79 с.
24. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Ч.1. М.: Министерство сельского хозяйства. 2022. 820 с.
25. Градова Н.Б., Бабусенко И.Б., Горнова Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии, М.: ДеЛи принт. 2004. 144 с.
26. Дрегваль О.А., Черевач Н.В., Вінніков А.І. Підбір оптимальних режимів кислотності середовища та аерації при глибинному культивуванні *Bacillus thuringiensis* та *Beauveria bassiana* // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. 2010. Вип. 18. Т. 1. – С. 15–19.
27. Егоров Н.С. Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности / Н.С. Егоров, М.: Изд-во Моск. ун-та, 1957. 78 с.
28. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров, М.: Изд-во МГУ; Наука. 2004. 528 с.
29. Емельяненко В.А. Зависимость жизнедеятельности бифидобактерий от кислотности среды культивирования / В.А. Емельяненко, А.М. Королюк // Наука и современность. 2010. № 2 (1). С.23-28.
30. Ефремов Н.А., Чердакова М.П. Индустрия органики: мировой опыт и российские перспективы // Фундаментальные исследования. 2015. № 5. С. 405-409.
31. Жемчужина Н. С., Фокин А. О., Елизарова С. А., Горелов П. В. Новая форма биопрепаратов – микроконтейнеры из полимерного биоразлагаемого материала // Лаборатория и производство. 2018. № 1(1). С. 138-141.
32. Захарова Л.М., Кудрявцев Н.А. Биофунгицид Витаплан на посевах льна // Защита и карантин растений. 2015. №4. С. 26-28.

33. Зими́на М.И., Гази́ева А.Ф. Исследование процесса синтеза бактериоцинов // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2017. №3-1. 3 с.
34. Кабашникова Л. Ф. Прайминг защитных реакций в растениях при патогенезе: приобретенный иммунитет // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. 2020. №. 4. С. 19-29.
35. Кириченко К.С. Почвы Краснодарского края / К.С. Кириченко. - Краснодар: Крайгосиздат, 1953. 236 с.
36. Козлова А. С., Шпато́ва Т. В., Штернши́с М. В. Оценка биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* в отношении грибных болезней смородины // Теория и практика современной аграрной науки. 2021. С. 115-118.
37. Коноваленко Л. Ю. Биологические средства защиты растений для органического земледелия // Итоги и перспективы развития агропромышленного комплекса. 2018. С. 26-36.
38. Кудоярова Г. Р., Высоцкая Л. Б., Архипова Т. Н. Влияние ауксинпродуцирующих и фосфатмобилизующих бактерий на подвижность почвенного фосфора, скорость роста растений пшеницы и усвоение ими фосфора // Агрохимия. 2016. № 5. С. 28-34.
39. Кузьмина Л. Ю., Архипова Т. Н., Актуганов Г. Э., Галимзянова Н. Ф., Четвериков С. П., Мелентьев, А. И. Бактерии родов *Advenella*, *Bacillus* и *Pseudomonas* - перспективная основа биопрепаратов для растениеводства // Биомика. 2018. № 10(1). С. 16-19.
40. Леонтьева Т.Н., Кузина Е.В., Логинов О.Н. Оптимизация состава питательной среды для производства биоудобрения «Азолен» // Известия Уфимского научного центра РАН. 2013. № 3. С. 49-52.
41. Лобанов В.Г., Александрова А. В., Шурай К. Н., Авдеев А. С., Рашид И. Д. Структурно-функциональные характеристики гуминовых кислот почвы Краснодарского края // Политематический сетевой электронный

научный журнал Кубанского Государственного Аграрного Университета. 2015. № 109. С. 1016-1025.

42. Лысак, Л.В. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий Изд. и перераб. доп. / Л.В. Лысак, Т.Г. Добровольская, И.Н. Скворцова, М.: Макс Пресс, 2003. 120 с.

43. Майоров А.А. Анализ параметров существования и размножения микроорганизмов // Техника и технология пищевых производств. 2012. № 3. С. 1-5.

44. Максимов И.В., Веселова С.В., Нужная Т.В., Сарварова Е.Р., Хайруллин Р.М. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 6. С. 763-775.

45. Максимов И.В., Максимова Т.И., Сарварова Е.Р., Благова Д.К. Эндофитные бактерии как агенты для биопестицидов нового поколения (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 2. С. 134-148.

46. Малкова А. В., Иркитова А. Н., Дудник Д. Е., Каргашилова Е. Н., Функ И. А. Антифунгальная активность бактерий рода *Bacillus* по отношению к фитопатогену *Alternaria* sp. // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2021. № 11(205). 40-43.

47. Маслова М. В., Грошева Е. В. Эффективность биопрепаратов ризоплан и алирин-б в борьбе с грибными патогенами перца сладкого // Наука и Образование. 2020. Т. 3. №. 4.

48. Матвиенко Е.В. Влияние предпосевной обработки семян препаратами, условий посева и метеоусловий года на распространенность и развитие альтернариоза на сорго в условиях лесостепи Самарской области // Ученые записки Тамбовского отделения РoСМУ. 2015. №3. С. 5-9.

49. Мезюха А. Н., Гайзатулин А. С., Яценко С. Н. Биопрепараты и проблемы их использования в сельском хозяйстве (аналитический обзор) //

Успехи молодежной науки в агропромышленном комплексе: Сборник трудов LVII Студенческой научно-практической конференции. Тюмень: Государственный аграрный университет Северного Зауралья. 2022. С. 98-107.

50. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве // под ред. В.И. Долженко. СПб: ВИЗР, 2009. 378 с.

51. Мосичев М.С. Общая технология микробиологических производств / М.С. Мосичев, А.А. Складнев, В.Б. Котов М.: Легкая и пищевая пром-ть, 1982. 264 с.

52. Мулюкин А.Л., Луста К.А., Грязнова М.Н. Образование покоящихся форм *Bacillus cereus* и *Micrococcus luteus* // Микробиология. 2006. № 6. С. 782-789.

53. Наумов Т. Н. Анализ эффективности применения биологических пестицидов в возделывании гороха (*Pisum sativum* L.) // Агрэкологические аспекты устойчивого развития АПК. 2021. С. 77-82.

54. Новикова И. И. Полифункциональные биопрепараты для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем в биологическом земледелии // АгроЭкоИнженерия. 2019. №2 (99). С. 183-194.

55. Обухова Е.С., Сидорова Н.А. Физиологическая характеристика ахромогенных видов рода *Pseudomonas* в условиях динамики термического режима культивирования // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. 2013. №6. С. 19-21.

56. Осадчая А. И., Подгорский В.С., Прокопченко С.Ф. Рост и развитие продуцента бактокулицида в зависимости от pH среды // Микробиол. журн. 2013. Т. 52. № 1. С. 24–27.

57. Павлюшин В. А., Новикова И. И., Бойкова И. В. Микробиологическая защита растений в технологиях фитосанитарной оптимизации агроэкосистем: теория и практика (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2020. № 55(3). С. 421-438.

58. Парамонова И.Е., Некрасова Н.И., Хамзина К.С., Балпанов Д.С., Тен О.А. Разработка и изучение влияния состава питательной среды и условий культивирования *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* на биосинтез белка δ -эндотоксина // Биотехнология. Теория и практика. 2012. № 4. С. 20-24.

59. Перерва Т.П., Мирюта Г.Ю., Дворник А.С., Можилевська Л.П., Кунах В. А. Оптимизация бактериальных питательных сред экстрактом *Ungerniia viictoriis* // Біотехнологія. 2011. Т. 4. №4. С. 59-64.

60. Перт, С.Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С.Д. Перт. М.: Мир, 1978. 333 с.

61. Пикушова Э.А., Шадрина Л.А., Горьковенко В.С., Москалева Н.А. Мониторинг почвенных микромицетов в черноземе выщелоченном западного предкавказья в агроценозе озимой пшеницы // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2008. № 431. С. 88.

62. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608с.

63. Потапенко Д. Ю., Рзаева В. В. Значение биологических препаратов при возделывании сельскохозяйственных культур // Достижения молодежной науки для агропромышленного комплекса: Сборник трудов LVII научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных. Тюмень: Государственный аграрный университет Северного Зауралья, 2023. С. 80-82.

64. Пусенкова Л.И., Ильясова Е.Ю., Максимов И.В., Ласточкина О.В. Повышение адаптивного потенциала посевов сахарной свеклы микробными биопрепаратами в условиях биотических и абиотических стрессов // Сельскохозяйственная биология. 2015. №1. С. 115-123.

65. Разина А.А., Дятлова О.Г. Влияние азотных удобрений на рентабельность протравливания // Защита и карантин растений. 2015. №2. С. 18-19

66. Резанова Г.И. Роль биопрепаратов при возделывании озимой пшеницы // Научно-агрономический журнал. 2013. №1(92). С. 20-22
67. Рогожникова Е.С., Шпанев А.М. Эффективность применения биофунгицида Витаплан на яровом ячмене в условиях северо-запада Нечерноземной зоны // Вестник защиты растений. 2016. Т. 89. №. 3. С. 140-142.
68. Российский рынок биологических средств защиты растений. Research Techart. 2014. 29 с. [электронный ресурс] - Режим доступа: <http://techart.ru/files/publications/publication-674.pdf>
69. Рубанов Н.И., Фомин А.А. Рынок биопродуктов в растениеводстве // Московский экономический журнал. 2018. №3. С. 76-96. DOI 10.24411/2413-046X-2018-13002
70. Рябчинская Т.А., Зимина Т.В. Средства, регулирующие рост и развитие растений, в агротехнологиях современного растениеводства // Агрехимия. 2017. № 12. С. 62-92. DOI: 10.7868/S0002188117120092
71. Самойлова Ю. В., Сорокина К. Н., Пилигаев А. В., Пармон В. Н. Применение бактериальных термостабильных липолитических ферментов в современных биотехнологических процессах: обзор // Катализ в промышленности. 2018. № 6. С. 61-73. DOI 10.18412/1816-0387-2018-6-61-73.
72. Санин С.С., Назарова Л.Н., Неклеса Н.П., Полякова Т.М., Гудвин С. Эффективность биопестицидов и регуляторов роста растений в защите пшеницы от болезней // Защита и карантин растений. 2012. №3. С. 16-18.
73. Сафроновская, Г. Биопестициды - перспективный сегмент рынка средств защиты растений / Г. Сафроновская // Наше сельское хозяйство. – 2021. – № 1(249). – С. 28-35.
74. Саубенова М.Г., Олейникова Е.А. Влияние состава среды на антагонистическую активность молочнокислых микроорганизмов // Биотехнология. Теория и практика. 2012. №3. С. 83-86.

75. Сидорова Т.М., Асатурова А.М., Хомяк А.И., Томашевич Н.С. Выделение и характеристика антигрибных метаболитов штаммов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus subtilis* BZR 517 модифицированным методом биоавтографии // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. № 1. С. 178-185. doi: 10.15389/agrobiology.2019.1.178eng
76. Скворцова И.Н. Методы идентификации и выделения почвенных бактерий рода *Pseudomonas* / И.Н. Скворцова. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981. 78 с.
77. Смирнов В.В. Антибиотики: Учеб. пособие для студентов биол. спец. вузов / В.В. Смирнов, И.А. Василевская, С.Р. Резник. Киев: Выща школа, 1985. 191 с.
78. Соколова Г.Д., Глинушкин А.П. Антагонисты фитопатогенного гриба *Fusarium graminearum* // Микология и фитопатология. 2017. Т. 51. № 4. С. 191-201.
79. Соболева О.М. Роль ризосферных бактерий в повышении экологизации агроценозов // Достижения науки и техники АПК. 2018. №5. С. 19-22.
80. Танделова А. В. Биологическая эффективность применения фунгицидов против болезней груши // Научные труды студентов Горского государственного аграрного университета "Студенческая наука - агропромышленному комплексу": Научные труды студентов Горского государственного аграрного университета. Владикавказ: Горский государственный аграрный университет, 2019. С. 116-117.
81. Табакова И.Д., Чухина О.В. Сравнительная оценка действия фунгицидов химической и биологической природы на выход и качество ягод *Fragaria ananassa* // Вестник Северного (Арктического) федерального университета. Серия: Естественные науки. 2015. №1. С. 95-101.
82. Терентьев С. Е., Ковалёва А. Е. Развитие органического сельского хозяйства в Российской Федерации // Научное обеспечение

устойчивого развития агропромышленного комплекса горных и предгорных территорий. 2018. С. 161-164.

83. Усанов В.С., Пензин А.А., Шишкин В.В., Татаренко И.Ю. Влияние температуры культивирования и активной кислотности соево-кукурузного субстрата на динамику роста бактерии *Bacillus subtilis* // Дальневосточный аграрный вестник. 2020. № 3 (55). С. 117-124. DOI: 10.24411/1999-6837-2020-13040

84. Фань С., Чжу Х., Го Д., Золотухин С.Н., Юдина Т.Г., Ван Д. Оптимизация производства липопептидов, синтезируемых *Bacillus amyloliquefaciens* В15, методом анализа на поверхности отклика // Вестник Ульяновской ГСХА. 2015. №1 (29). С. 51-58.

85. Федоренко В. Ф. Современные технологии производства пестицидов и агрохимикатов биологического происхождения / В. Ф. Федоренко, Н. П. Мишуров, Л. Ю. Коноваленко. Москва: ФГБНУ "Росинформагротех". 2018. 124 с.

86. Хайбуллин А.И. Физико-химическая совместимость агрохимикатов в баковых смесях // Агрохимия. 2000. № 1. С. 86-91.

87. Хилько Т.В. Оптимизация питательных сред для роста и спорообразования бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* Микробиологический журнал. 2004. Т. 66. № 1. С. 36-41

88. Холод Н.А. Оптимизация применения микробиологических препаратов для управления патосистемами в агроценозе земляники // Плодоводство и виноградарство Юга России. № 29(05). 2014. 12 с. [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/14/05/12.pdf>

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

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

91. Хомяк А.И., Жевнова Н.А., Аллахвердян В.В., Асатурова А.М. Подбор прилипателей для совместного применения с лабораторным образцом биопрепарата в сельском хозяйстве // Достижения науки и техники АПК. 2023. Т. 37. № 8. С.53-58. DOI: 10.53859/02352451_2023_

92. Хужаназарова М. К., Муродова С. С. Технология получения биопрепарата на основе ризобактерий, иммобилизированных флокулянтном Гипан // Научное обозрение. Биологические науки. 2022. № 3. С. 34-38. DOI: <https://doi.org/10.17513/srbs.1281>.

93. Царенко И.Ю., Рой А.А., Курдиш И.К. Оптимизация питательной среды для культивирования *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 // Мікробіологічний журнал. 2011. Т. 73. № 2. С. 13-19.

94. Чеботарь В.К. Эффективность применения биопрепарата Экстрасол / В.К. Чеботарь, А.А. Завалин, Е.И. Кипрушкина. М.: Издательство ВНИИА. 2007. 230 с.

95. Чекалова К.В. Разработка новой препаративной формы биологических фунгицидов на основе клеток микроорганизмов *Trichoderma viride* и *Pseudomonas fluorescens*: автореф. дис.... канд. биол. наук: М., 2007. 20 с.

96. Чекаев Н. П., Галиуллин А. А. Продуктивность сельскохозяйственных культур в зависимости от применения микробиологического препарата Фитоспорин-М в технологии No-till // Инновационная техника и технология. 2022. Т. 9. №. 3. С. 91-97.

97. Черников И. А. Эффективность биофунгицида Бактофит, СП на картофеле на разных агрохимических фонах // Современные проблемы агрохимии, агропочвоведения и агроэкологии: Материалы 56-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием молодых ученых, специалистов-агрохимиков и экологов, посвященной 150-летию со дня рождения академика К. К. Гедройца (ВНИИА), Москва: Всероссийский научно-исследовательский институт агрохимии имени Д.Н. Прянишникова, 2023. С. 169-174.

98. Шеховцова Н.В., Первушина К.А., Маракаев О.А. Кинетические параметры роста бактерий, ассоциированных с подземными органами *Dactylorhiza maculata* (L.) Sw. (orchidaceae) // Фундаментальные исследования. 2012. № 3. С. 542-544.

99. Штерншис М.В. Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus* для управления здоровьем растений / М.В. Штерншис, А.А. Беляев, В.П. Цветкова, Т.В. Шпатова, А.А. Леляк, С.А. Бахвалов // Монография. Издательство СО РАН, Новосибирск, 2016. 233 с.

100. Щербаков М.Г., Ильязов А.А., Шапошникова М.Ю. Влияние состава питательных сред на протеолитическую активность глубинных культур *Bacillus subtilis* ВКПМ 2335 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ 2336 // Биопрепараты: профилактика диагностика лечение. 2014. № 1 (49). С. 36-39.

101. Якименко М. В., Бегун С. А., Сорокина А. И. Оценка интенсивности роста штаммов *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium fredii* дальневосточной селекции на средах с различными углеводами // Достижения науки и техники АПК. 2020. Т. 34. № 6. С. 33-37. DOI: 10.24411/0235-2451-2020-10606

102. Abada E.A., El-Hendawy H.H., Osman M.E., Hafez M.A. Antimicrobial activity of *Bacillus circulans* isolated from rhizosphere of *Medicago sativa* // Life Science Journal. 2014. № 11(8). P. 711-719.

103. Abas M.R., Kader A.J.A., Khalil M.S., Hamid A.A., Isa M.H.M. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 by using treated palm oil mill effluent (POME) as fermentation media // International Conference on Food and Agricultural Sciences. 2013. Vol. 55. № 17. P. 87-93.

104. Abbasiliasi S., Tan J. S., Ibrahim T. A. T., Bashokouh F., Ramakrishnan N. R., Mustafa S., Ariff A. B. Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review // Rsc Advances. 2017. № 7(47). P. 29395-29420.

105. Abbey L., Abbey J., Leke-Aladekoba A., Iheshiulo E. M. A., Ijenyo M. Biopesticides and Biofertilizers: Types, Production, Benefits, and Utilization // Byproducts from Agriculture and Fisheries: Adding Value for Food, Feed, Pharma, and Fuels. 2019. P. 479-500. <https://doi.org/10.1002/9781119383956.ch20>

106. Abushady H.M., Bashandy A.S., Ibrahim H.M.M. Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production // International Journal of Agriculture & Biology. 2005. № 7(3). P. 337-344.

107. Acheuk F., Basiouni S., Shehata A.A., Dick K., Hajri H., Lasram S., Yilmaz M., Emekci M., Tsiamis G., Spona-Friedl M., May-Simera H., Eisenreich W., Ntougias S. Status and Prospects of Botanical Biopesticides in Europe and Mediterranean Countries // Biomolecules. 2022. T. 12. №. 2. P. 311. <https://doi.org/10.3390/biom12020311>

108. Adusei-Fosu K., Rolando C. A., Richardson B. Evaluating the efficacy of potential fungicide-adjuvant combinations for control of myrtle rust in New Zealand // Journal of Plant Diseases and Protection. 2021. № 128(6). P. 1501-1515. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00523-1>

109. Akhanaev Y., Pavlushin S., Polenogova O. The effect of mixtures of *Bacillus thuringiensis*-based insecticide and multiple nucleopolyhedrovirus of *Lymantria dispar* L. in combination with an optical brightener on L.

dispar larvae // BioControl. 2022. № (67). P. 331–343. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10526-022-10137-7>

110. Al-Bahry S.N., Al-Wahaibi Y.M., Elshafie A.E., Al-Bemani A.S., Joshi S.J., Al-Makhmari H.S., Al-Sulaimani H.S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* b20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery // International Biodeterioration & Biodegradation. 2013. № 81. P. 141-146.

111. Al-Zaidi A.A., Elhag E.A., Al-Otaibi S.H., Baig M.B. Negative effects of pesticides on the environment and the farmers awareness in Saudi Arabia: a case study // Journal Of Animal And Plant Sciences. 2011. № 21. P. 605-611.

112. Albuquerque P. B. S., de Oliveira W. F., dos Santos Silva P. M., dos Santos Correia M. T., Kennedy J. F., Coelho L. C. B. B. Epiphanies of well-known and newly discovered macromolecular carbohydrates – A review // International journal of biological macromolecules. 2020. № 156. P. 51-66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.046>

113. Amin N. Teaching of biopesticide development as a technopreneurship opportunity in plant protection // Journal of Biology, Agriculture and Healthcare. 2013. Vol.3. № 6. P. 2224–3208.

114. Ansari F. A., Ahmad I., Pichtel, J. Growth stimulation and alleviation of salinity stress to wheat by the biofilm forming *Bacillus pumilus* strain FAB10 // Applied soil ecology. 2019. № 143. P. 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.05.023>

115. Arkhipova T., Galimsyanova N., Kuzmina L., Vysotskaya L., Sidorova L., Gabbasova I., Melentiev A., Kudoyarova G. Effect of seed bacterization with plant growth-promoting bacteria on wheat productivity and phosphorus mobility in the rhizosphere // Plant Soil Environmental. 2019. № 65. P. 313-319. <https://doi.org/10.17221/752/2018-PSE>

116. Arnaouteli S., Bamford N.C., Stanley-Wall N.R., Kovács Á. T. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions // Nature Reviews Microbiology. 2021. P. 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00540-9>
117. Atanasova-Pancevska N., Kungulovski D. Isolation, characterization and formulation of antagonistic bacteria against fungal plant pathogens // AGROFOR. 2018. № 3(3). P. 80-89. DOI: <https://doi.org/10.7251/AGRENG1803080A>
118. Ayer K. M., Strickland D. A., Choi M., Cox K. D. Optimizing the integration of a biopesticide (*Bacillus subtilis* QST 713) with a single-site fungicide (benzovindiflupyr) to reduce reliance on synthetic multisite fungicides (captan and mancozeb) for management of apple scab // Plant disease. 2021. № 105(11). P. 3545-3553.
119. Barska E. Optimization of cultivation conditions of *Bacillus* genus bacteria for proteolytic enzymes production // Problems of Environmental Biotechnology. 2014. № 4. [электронный ресурс] - Режим доступа <http://ecobio.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/5527>.
120. Barssoum R., Al Kassis G., Nassereddine R., Saad J., El Ghoul M., Abboud J., Awad M. K. Biochemical limitations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides production in a wheat bran culture medium // Research in microbiology. 2023. № 174(6). P. 104043.
121. Bayman P., Otero J.T. Microbial endophytes of orchid roots // Soil Biology. 2006. № 9. P. 153-177.
122. Berekaa M., Zaghoul T., Abdel-Fattah Y., Saeed H., Sifour M. Production of a novel glycerol inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5 // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2009. № 25. P. 287-294.
123. Berrie A., Xu X. Developing biopesticide-based programmes for managing powdery mildew in protected strawberries in the UK // Crop Protection. 2021. № 149. P. 105766. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105766>

124. Cambaza E. Comprehensive Description of *Fusarium graminearum* Pigments and Related Compounds // Foods. 2018. № 7. P. 165. <https://doi.org/10.3390/foods7100165>

125. Chen W., Wu C.H., Bernard S.H. Developing microbeplant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration // Microbial biotechnology. 2009. № 10. P. 1-13.

126. Chen W.-C., Juang R.-S., Wei Y.-H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms // Biochemical Engineering Journal. 2015. № 103. P. 158-169.

127. Dai-Fu Y., Zhou J.Y., Zhong J., Tan H. Inhibition property of a novel antifungal polypeptide, Jiean-peptide // Chinese Journal of Antibiotics. 2005. № 30(9). P. 516-520.

128. De Cal A., Larena I., Guijarro B., Melgarejo P. Use of biofungicides for controlling plant diseases to improve food availability // Agriculture. 2012. № 2. P. 109-124.

129. Dhiraj K.C., Shiv K.V., Aanand K.P., Dayaram Formulation and development of biofungicide // International Research Journal of Natural Sciences. 2014. № 2(2). P.14-22.

130. Djaenuddin N., Muis A. Effectiveness of *Bacillus subtilis* TM4 biopesticide formulation as biocontrol agent against maydis leaf blight disease on corn // In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2020. № 484(1). P. 012096.

131. do Nascimento Silva J., Mascarin G. M., de Castro R. P. V., Castilho L. R., Freire D.M.G. Novel combination of a biosurfactant with entomopathogenic fungi enhances efficacy against Bemisia whitefly // Pest management science. 2019. № 75(11). P. 2882-2891. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.5458>

132. do Nascimento Jn. D.R., Taberner A., Cabral Albuquerque E.C.d.M., Vieira de Melo S.A.B. Biopesticide Encapsulation Using Supercritical CO₂: A

Comprehensive Review and Potential Applications // *Molecules*. 2021. № 26. P. 4003. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26134003>

133. Dogsa I., Brloznic M., Stopar D., Mandic-Mulec I. Exopolymer diversity and the role of levan in *Bacillus subtilis* biofilms // *PLoS ONE*. 2013. № 8(4). 10 p. [электронный ресурс] – Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0062044>

134. Duque A.F., Hasan S.A., Bessa V.S., Carvalho M.F., Samin G., Janssen D.B., Castro P.M.L. Isolation and characterization of a *Rhodococcus* strain able to degrade 2-fluorophenol // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012. № 95. P. 511–520.

135. Enwemeka C. S., Baker T. L., Bumah V. V. The role of UV and blue light in photo-eradication of microorganisms // *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2021. №8. P. 100064. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpap.2021.100064>

136. Essiedu J. A., Adepoju F. O., Ivantsova M. N. Benefits and limitations in using biopesticides: A review // *In AIP Conference Proceedings*. 2020. № 2313(1). P. 080002 <https://doi.org/10.1063/5.0032223>

137. Falguni R. P., Sharma M.C. Optimization of production of alkaline phosphatase by a facultative alkaliphile *Bacillus flexus* FPB17 isolated from alkaline lake soils // *Journal of Agricultural Technology*. 2012. №8(5). P. 1605-1612.

138. Feldbaum R. A., Yaakov N., Mani K. A., Yossef E., Metbeev S., Zelinger E., Mechrez G. Single cell encapsulation in a Pickering emulsion stabilized by TiO₂ nanoparticles provides protection against UV radiation for a biopesticide // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021. № 206. P. 111958.

139. Fenibo E.O., Ijoma G.N., Matambo T.. Biopesticides in Sustainable Agriculture: Current Status and Future Prospects. In: Mandal, S.D., Ramkumar, G., Karthi, S., Jin, F. (eds) *New and Future Development in Biopesticide Research:*

Biotechnological Exploration. 2022. Springer, Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-16-3989-0_1

140. FiBL & IFOAM: The World of Organic Agriculture. Statistics & Emerging Trends 2015. Frick and Bonn. [электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.fibl.org/fileadmin/documents/shop/1663-organic-world-2015.pdf>

141. Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species // Journal of biotechnology. 2018. № 285. P. 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>

142. Gašić S., Tanović B. Biopesticide formulations, possibility of application and future trends // Pesticides And Phytomedicine. 2013. №28(2). P. 97-102.

143. Garcha S., Kansal R., Gosal S.K. Molasses growth medium for production of *Rhizobium* sp. based biofertilizer // Indian Journal of Biochemistry & Biophysics. 2019. № 56. P. 378-383.

144. Ghribi D., Ellouze-Chaabouni S. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration // Biotechnology Research International. 2011. № 2011. 6 p.

145. Goswami D., Thakker J.N., Dhandhukia P.C., Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review // Cogent Food Agric. 2016. № 2(1). P. 1– 19. DOI:10.1080/23311932.2015.1127500.

146. Grover M., Nain L., Singh S.B., Saxena A.K. Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24 // Current Microbiology. 010. № 60(2). P. 99-106.

147. Gauvry E., Mathot A. G., Couvert O., Leguérinel I., Coroller L. Effects of temperature, pH and water activity on the growth and the sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1 // International Journal of Food

Microbiology. 2020. № 337. P. 108915.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108915>

148. Gojgic-Cvijovic G. D., Jakovljevic D. M., Loncarevic B. D., Todorovic N. M., Pergal M. V., Ciric J., Loosc K., Beskoski V.P., Vrvic M. M. Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium // International journal of biological macromolecules. 2019. № 121. P. 142-151. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.019>

149. Hammon R., Berrada A. Evaluation of Kodiak (R) biological seed treatment to control seedling diseases of chickpea // C.S.U.C. Extension. 2001. P. 47.

150. Hashem A., Tabassum B., Fathi Abd Allah, E. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress // Saudi Journal of Biological Sciences. 2019. №. 26. P. 1291-1297. DOI:10.1016/j.sjbs.2019.05.004

151. He Z., Kisla D., Zhang L. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymixa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin // Applied and Environmental Microbiology. 2007. № 73(1). P. 168-178.

152. Hernández C.A., Sandoval N., Mallerma J., García-Pérez J.A., Farnet A.-M., Perraud-Gaime I., Alarcón E. Ethanol induction of laccase depends on nitrogen conditions of *Pycnoporus sanguineus* // Electronic Journal of Biotechnology. 2015. № 18. P. 327–332.

153. Horak I., Engelbrecht G., van Rensburg P.J. J., Claassens S. Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides // Journal of Applied Microbiology. 2019. № 127(2). P. 326-343. <https://doi.org/10.1111/jam.14218>

154. Hubbard M., Hynes R.K., Erlandson M., Bailey K.L. The biochemistry behind biopesticide efficacy // Sustainable Chemical Processes. 2014. № 2. P. 18.

155. Ibrahim A.S.S., El-Tayeb M. A., Elbadawi Y. B., Al-Salamah A. A. Effects of substrates and reaction conditions on production of cyclodextrins using cyclodextrin glucanotransferase from newly isolated *Bacillus agaradhaerens* KSU-A11 // Electronic Journal of Biotechnology. 2011. [Электронный ресурс] - Режим доступа:

<http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v14n5-4>.

156. Jalali E., Maghsoudi S. Noroozian E. A novel method for biosynthesis of different polymorphs of TiO₂ nanoparticles as a protector for *Bacillus thuringiensis* from Ultra Violet // Scientific Reports. 2020. № 10. P. 426. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57407-6>

157. Jemil N., Manresa A., Rabanal F., Ben Ayed H., Hmidet N., Nasri M. Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain // Journal of Chromatography B. 2017. № 1060. P. 374-386. DOI:10.1016/j.jchromb.2017.06.013

158. Ji X., Li J., Meng Z., Zhang S., Dong B., Qiao K. Synergistic effect of combined application of a new fungicide fluopimomide with a biocontrol agent *Bacillus methylotrophicus* TA-1 for management of gray mold in tomato // Plant disease. 2019. № 103(8). P. 1991-1997. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0143-RE>

159. Jørgensen P. S., Folke C., Henriksson P. J., Malmros K., Troell M., Zorzet A. Coevolutionary governance of antibiotic and pesticide resistance // Trends in ecology & evolution. 2020. № 35(6). P. 484-494.

160. Kazim A.R., Alden S.B. Antimicrobial effect of phospholipid produced from *Bacillus subtilis* // World Journal of Experimental Biosciences. 2014. № 2(2). P. 59-63.

161. Khadka S., Adhikari S., Thapa A., Panday R., Adhikari M., Sapkota S., Regmi R. S., Adhikari N. P., Proshad R., Koirala N. Screening and optimization of newly isolated thermotolerant *Lysinibacillus fusiformis* strain SK for protease

and antifungal activity // *Current Microbiology*. 2020. № 77. P. 1558-1568.
<https://doi.org/10.1007/s00284-020-01976-7>

162. Khater H.F. Prospects of botanical biopesticides in insect pest management // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012. №02(05). P. 244-259.

163. Khusro A., Barathikannan K., Aarti C., Agastia P. Optimization of thermo-alkali stable amylase production and biomass yield from *Bacillus* sp. under submerged cultivation // *Fermentation*. 2017. № 3(1). P. 7.
<https://doi.org/10.3390/fermentation3010007>

164. Kilani-Feki O. Khedher S. B., Dammak M., Kamoun A., Jabnoun-Khiareddine H., Daami-Remadi M., Tounsi Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease // *Biological Control*. 2016. № 95. P. 73-82.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.005>

165. King E.O., Ward M.K., Raney D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1954. № 44. P. 301-307.

166. Koumoutsi A., Chen X-H., Henne A. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42 // *J. Bacteriol.* 2004. №186(4). P.1084-1096.

167. Kruse S., Pierre F., Morlock G. Imaging high-performance thin-layer chromatography as powerful tool to visualize metabolite profiles of eight *Bacillus* candidates upon cultivation and growth behavior // *Journal of Chromatography A*. 2021. № 1640. P. 461929. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461929>

168. Kumar H., Singh A. K., Rajkumar B. V., Singh V., Sing B. Bio efficacy studies of Taegro (*Bacillus subtilis*) on root rot incidence, growth and yield attributing characters // *The Ecoscan: Special issue*. 2015. № 7. P. 301-304.

169. Kumar S., Singh A. Biopesticides: Present Status and the Future Prospects // Journal of Fertilizers and Pesticides. 2015. V. 6. P. 129. DOI:10.4172/jbfbp.1000e129

170. Lahlali R.L., Peng G., Gossen B.D., McGregor L., Yu F.Q., Hynes R.K., Hwang S.F., McDonald M.R., Boyetchko S.M. Evidence that the biofungicide Serenade® (*Bacillus subtilis*) suppresses clubroot on Canola via antibiosis and induced host resistance // Phytopathology. 2013. № 103(3). P. 245-254.

171. Leahy J. Biopesticide oversight and registration at the U.S. Environmental Protection Agency / J. Leahy, M. Mendelsohn, J. Kough, R. Jones, N. Berckes – In: Coats (ed.) Biopesticides: state of the art and future opportunities. ACS Symposium Series, American Chemical Society. 2014. 16 p.

172. Leisso R.S., Burrows M.E. Field evaluation of biological control and fungicide seed treatments for pre-emergence damping off of chickpeas // Pisum Genetics. 2007. № 39. P. 28-31.

173. Leng P., Zhang Z., Guangtang P., Zhao M. Applications and development trends in biopesticides // African Journal of Biotechnology. 2011. № 10(86). P. 19864-19873.

174. Licona-Juárez K. C., Bezerra A. V. S., Oliveira I. T., Massingue C. D., Medina H. R., Rangel D. E. Congo red induces trans-priming to UV-B radiation in *Metarhizium robertsii* // Fungal Biology. 2023. № 06. P. 21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.06.005>

175. Lin F., Mao Y., Zhao F., Idris A.L., Liu Q., Zou S., Guan X., Huang T. Towards Sustainable Green Adjuvants for Microbial Pesticides: Recent Progress, Upcoming Challenges, and Future Perspectives // Microorganisms. 2023. № 11. P. 364. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020364>

176. Liu X., Cao A., Yan D., Ouyang C., Wang Q., Li, Y. Overview of mechanisms and uses of biopesticides // International Journal of Pest Management. 2021. № 67(1). P. 65-72.

177. Mahde B. Y., Fayyadh M. A., Al-Luaibi, S. S. Evaluation of Biofungicide Formulation of *Trichoderma longibrachiatum* in Controlling of Tomato Seedling Damping-off Caused by *Rhizoctonia solani* // Basrah Journal of Agricultural Sciences. 2019. № 32(2). P. 135–149. DOI: <https://doi.org/10.37077/25200860.2019.204>

178. Mahmood A., Turgay O. C., Farooq M., Hayat R. Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review // FEMS Microbiology Ecology. 2016. V. 92. № 8. P. 112. DOI:10.1093/femsec/fiw112.

179. Mandelli F., Yamashita F., Pereira J.L., Mercadante A.Z. Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design // Brazilian Journal of Microbiology. 2012. № 43. P. 126-134.

180. Martin S.B., Abawi G.S., Hoch H.C. Biological control of soilborne pathogens with antagonists // Biological control in agricultural IPM systems. 1987. P. 433-454.

181. Mascarin G.M., Jackson M.A., Behle R.W., Kobori N.N., Júnior Í.D. Improved shelf life of dried *Beauveria bassiana* blastospores using convective drying and active packaging processes // Appl Microbiol Biotechnol. 2016. P. 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7597-2>

182. McGehee C. S., Raudales R. E., Elmer W. H., McAvoy R. J. Efficacy of biofungicides against root rot and damping-off of microgreens caused by *Pythium* spp // Crop Protection. 2019. № 121. P. 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.12.007>

183. Medeot D. B., Bertorello-Cuenca M., Liaudat J. P., Alvarez F., Flores-Cáceres M. L., Jofré E. Improvement of biomass and cyclic lipopeptides production in *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 by modifying carbon and nitrogen sources and ratios of the culture media // Biological control. 2017. № 115. P. 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.10.002>

184. Meena K. R., Sharma A., Kumar R., Kanwar S. S. Two factor at a time approach by response surface methodology to aggrandize the *Bacillus subtilis* KLP2015 surfactin lipopeptide to use as antifungal agent // Journal of King Saud University-Science. 2020. № 32(1). P. 337-348. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.025>
185. Mesnage R., Antoniou M. N. Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides // Frontiers in public health. 2018. № 5. P. 361. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00361>
186. Miljaković D., Marinković J., Balešević-Tubić S. The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops // Microorganisms. 2020. № 8. P. 1037. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
187. Mishra J. Biopesticides: Where We Stand? // N.K. Arora (ed.), Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets, 2015. P. 37-75.
188. Mishra J., Dutta V., Arora N.K. Biopesticides in India: technology and sustainability linkages // Biotech. 2020. № 10. P. 210. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02192-7>
189. Moghannem S. A., Farag M., Shehab A. M., Azab M. S. Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design // Brazilian Journal of Microbiology. 2018. № 49. P. 452-462. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.012>
190. Mohapatra S., Samantaray D.P., Samantaray S.M. Study on polyhydroxyalkanoates production using rhizospheric soil bacterial isolates of sweet potato // Indian Journal of Science and Technology. 2015. № 8(S7). P. 57-62.
191. Montealegre J.R., Reyes R., Perez L.M. Selection of antagonists to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato // Electronic Journal of Biotechnology. 2003. № 6(2). P. 116-127.

192. Ndao A., Kumar L. R., Tyagi R. D., Valéro J. Biopesticide and formulation processes based on starch industrial wastewater fortified with soybean medium // *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 2019. № 55(2). P. 115-126. DOI: <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1668225>
193. Ndolo D., Njuguna E., Adetunji C. O., Harbor C., Rowe A., Den A. Breeyen, Sangeetha J., Singh G., Szewczyk B., Anjorin T. S., Thangadurai D., Hospet R. Research and development of biopesticides: challenges and prospects // *Outlooks on Pest Management*. 2019. T. 30. №. 6. P. 267-276. https://doi.org/10.1564/v30_dec_08
194. Oyedele A. O., Ogunbanwo T. S. Antifungal activities of *Bacillus subtilis* isolated from some condiments and soil // *African Journal of Microbiology Research*. 2014. № 8(18). P. 1841-1849. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6162>
195. Ortiz A., Sansinenea E. *Bacillus thuringiensis* based biopesticides for integrated crop management // *Biopesticides*. Woodhead Publishing, 2022. P. 1-6.
196. Osman M.S., Ibrahim Z., Japper-Jaafar A., Shahir S. Biosurfactants and its prospective application in the petroleum industry // *Journal of Sustainability Science and Management*. 2019. № 14. P. 125-140.
197. Palazzini J. M., Alberione E., Torres A. Biological control of *Fusarium graminearum* sensu stricto, causal agent of *Fusarium* head blight of wheat, using formulated antagonists under field conditions in Argentina // *Biological control*. 2016. № 94. P. 56-61. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.12.009
198. Pant G., Prakash A., Pavani J. V. P., Bera S., Deviram G. V. N. S., Kumar A., Panchpuri M., Prasuna R. G. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis* // *Journal of Taibah University for Science*. 2015. № 9(1). P. 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.010>
199. Parthipan P., Preetham E., Machuca L. L., Rahman P. K. S. M., Murugan K., Rajasekar A. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1 // *Frontiers in Microbiology*. 2017. № 8. P. 193.

200. Pelaez V., Mizukawa G. Diversification strategies in the pesticide industry: from seeds to biopesticides // *Ciência Rural*, Santa Maria. 2017. № 47(2). e2016000. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160007>
201. Penha R. O., Vandenberghe L. P., Faulds C., Soccol V. T., Soccol C. R. *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations // *Planta*. 2020. № 251. P. 1-15.
202. Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management /Edited by M. Stoytcheva. InTech. 2011. 520 p.
203. Płaza G.A., Turek A., Król E., Szczygłowska R. Antifungal and antibacterial properties of surfactin isolated from *Bacillus subtilis* growing on molasses // *African Journal of Microbiology Research*. 2013. № 7(25). P. 3165-3170.
204. Preininger C., Sauer U., Bejarano A., Berninger T. Concepts and applications of foliar spray for microbial inoculants. *Applied microbiology and biotechnology*. 2018. № 102. P. 7265-7282. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9173-4>
205. Prince G., Chandler D. Susceptibility of *Myzus persicae*, *Brevicoryne brassicae* and *Nasonovia ribisnigri* to fungal biopesticides in laboratory and field experiments // *Insects*. 2020. № 11(1). P. 55.
206. Punja Z. K., Rodriguez G., Tirajoh A. Effects of *Bacillus subtilis* strain QST 713 and storage temperatures on post-harvest disease development on greenhouse tomatoes // *Crop Protection*. 2016. №. 84. P. 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.02.011>
207. Punja Z. K., Tirajoh A., Collyer D., Ni L. Efficacy of *Bacillus subtilis* strain QST 713 (Rhapsody) against four major diseases of greenhouse cucumbers // *Crop Protection*. 2019. №. 124. P. 104845. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104845>
208. Quimby P.C. Jr., Mercadier G., Meikle W. Enhancing biological control through superior formulations: a worthy goal but still a work in progress //

Enhancing biocontrol agents and handling risks. Amsterdam: IOS Press. 2001. P. 86-95.

209. Ravi A., Nandayipurath V. V. T., Rajan S., Salim S. A., Khalid N. K., Aravindakumar C. T., Krishnankutty R. E. Effect of zinc oxide nanoparticle supplementation on the enhanced production of surfactin and iturin lipopeptides of endophytic *Bacillus* sp. Fc11 and its ameliorated antifungal activity // Pest Management Science. 2021. № 77(2). P. 1035-1041. <https://doi.org/10.1002/ps.6118>

210. Raykova D. Peykov Sl., Dimov Sv. Growth kinetics and bacteriocin production by three enterococcus strains under low-temperature stress // Trakia Journal of Sciences. 2008. № 6(10). P. 49-53.

211. Reiss A., Jørgensen L. N. Biological control of yellow rust of wheat (*Puccinia striiformis*) with Serenade ® ASO (*Bacillus subtilis* strain QST713) // Crop Protection. 2017. № 93. 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.009>

212. Roeva O. Optimization of *E. coli* cultivation model parameters using firefly algorithm // International Journal Bioautomation. 2012. №16(1). P. 23-32.

213. Saberi F., Marzban R., Ardjmand M., Pajoum Shariati F., Tavakoli O. Optimization of the Culture Medium, Fermentation Process, and Effectiveness of a Biopesticide from an Iranian *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (BN2) // Journal of Agricultural Science and Technology. 2023. 25(2). 469-484.

214. Sachdev S., Singh R. P. Current challenges, constraints and future strategies for development of successful market for biopesticides. Climate Change and Environmental Sustainability. 2016;4(2):129-136. DOI: <https://doi.org/10.5958/2320-642X.2016.00014.4>

215. Sadouk-Hachaïchi Z., Tazerouti A., Hacene H. Growth kinetics study of a bacterial consortium producing biosurfactants, constructed with six strains isolated from an oily sludge // Advances in bioscience and biotechnology. 2014. № 5. P. 418-425.

216. Sahai P., Sinha V. B., Dutta R. Bioformulation and nanotechnology in pesticide and fertilizer delivery system for eco-friendly agriculture: a review // *Sci Agric*. 2019. № 3. P. 2-10. DOI: <https://doi.org/10.31080/ASAG.2019.03.0675>

217. Sagar A., Yadav S. S., Sayyed R. Z., Sharma S., Ramteke P. W. *Bacillus subtilis*: a multifarious plant growth promoter, biocontrol agent, and bioalleviator of abiotic stress. In *Bacilli in Agrobiotechnology: Plant Stress Tolerance, Bioremediation, and Bioprospecting*. 2022. Cham: Springer International Publishing. P. 561-580.

218. Saha S., Thosar R., Kabade S., Pawar K., Banerjee K. Biopesticides. In *Trajectory of 75 years of Indian Agriculture after Independence*. 2023. Singapore: Springer Nature Singapore. P. 675-703.

219. Salazar B., Ortiz A., Keswani C., Minkina T., Mandzhieva S., Pratap Singh S., Sansinenea E. *Bacillus* spp. as bio-factories for antifungal secondary metabolites: Innovation beyond whole organism formulations // *Microbial Ecology*. 2023. 86(1). P. 1-24.

220. Saleh H., Abdelrazak A., Elsayed A. Optimizing production of a biopesticide protectant by black yeast // *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 2018. № 28. P. 72. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0078-4>

221. Samada L. H., Tambunan U. S. F. Biopesticides as promising alternatives to chemical pesticides: A review of their current and future status // *Online J. Biol. Sci*. 2020. Vol. 20. №. 2. P. 66-76.

222. Santos M. S., Rodrigues T. F., Nogueira M. A., Hungria, M. The challenge of combining high yields with environmentally friendly bioproducts: A review on the compatibility of pesticides with microbial inoculants // *Agronomy*. (2021. Vol. 11. №5. P. 870.

223. Shafi J., Mingshan J., Zhiqiu Q., Xiuwei L., Zumin G., Xinghai L., Yang Z., Peiwen Q., Hongzhe T., Wunan C., Kai W. Optimization of *Bacillus aerius* strain JS-786 cell dry mass and its antifungal activity against *Botrytis*

cinerea using response surface methodology // Archives of Biological Sciences. 2017. Vol. 69. № 3. P. 469-480. <https://doi.org/10.2298/ABS160421122S>

224. Shafi J., Sun Z., Ji M., Gu Z., Ahmad W. ANN and RSM based modelling for optimization of cell dry mass of *Bacillus* sp. strain B67 and its antifungal activity against *Botrytis cinerea* // Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2018. Vol. 32. № 1. P. 58-68. DOI: 10.1080/13102818.2017.1379359

225. Sharma N., Singhvi R. Consumers perception and Behaviour towards organic food: A systematic review of literature // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2018. № 7(2). P. 2152-2155.

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

227. Singh A.K., Rautela R., Cameotra S.S. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus* sp strain AR2 // Microbial Cell Factories. 2014. №13. P. 67. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-67>

228. Sowanpreecha R., Remngsamran P. Biocontrol of orchidpathogenic mold, *Phytophthora palmivora*, by antifungal proteins from *Pseudomonas aeruginosa* RS1 // Mycobiology. 2018. Vol. 46. 2. P. 129-137. DOI: 10.1080/12298093.2018.1468055

229. Svetoch E.A., Stern N.J., Eruslanov B.V. Isolation of *wa* and *Paenibacillus polymixa* strains inhibitory to *Campilobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins // Journal of Food Protection. 2005. Vol. 68. P. 11-17.

230. Tabbene O., Ben Slimene I., Djebali K., Mangoni M.L., Urdaci M.C., Limam F. Optimization of medium composition for the production of antimicrobial activity by *Bacillus subtilis* B38 // Biotechnology Progress. 2009. Vol. 25. № 5. P. 1267-1274.

231. The Handbook of Microbial Bioresources (eds V.K Gupta et al.), V. K. Gupta, G. D. Sharma, M. G. Tuohy, R. Gaur. Publisher: CAB International. 2015. 656 p.
232. Tijjani A., Bashir K. A., Mohammed I., Muhammad A., Gambo A., Musa H. Biopesticides for pests control: A review // Journal of Biopesticides and Agriculture. 2016. Vol. 3. № 1. P. 6-13.
233. Toral L., Rodríguez M., Béjar V., Sampedro I. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea* // Frontiers in microbiology. 2018. № 9. P. 1315. doi: 10.3389/fmicb.2018.01315
234. Trejo M., Serrano-Carreón L., Patiño M., Allende R., Jurado C., Rayo E., Wong M. A., Galindo E., Balderas K., Isauro D., Gutiérrez C. R. The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study // Electronic Journal of Biotechnology. 2013. Vol. 16. №3. P. 1-23.
235. Tripathi Y. N., Divyanshu K., Kumar S., Jaiswal L. K., Khan A., Birla H., Upadhyay R. S. Biopesticides: current status and future prospects in India // Bioeconomy for sustainable development. 2020. P. 79-109.
236. Tsitsigiannis D.I., Dimakopoulou M., Antoniou P.P., Tjamos E.C. Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops // Phytopathologia Mediterranea. 2012. Vol. 51. №1. P. 158-174.
237. Tumbarski Y., Petkov E., Denkova Z. Study on the influence of the cultural conditions and the composition of the culture medium on the antimicrobial activity of *Bacillus methylotrophicus* BM47 against some fungal phytopathogens // Journal of Global Biosciences. 2015. Vol. 4. №. 8. P. 2990-2996.
238. Twizeyimana M., Hartman G. L. Effect of selected biopesticides in reducing soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) development // Plant disease. 2019. Vol. 103. № 9. P. 2460-2466. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0384-RE>

239. Vanhaelewyn L., Van Der Straeten D., De Coninck B., Vandebussche F. Ultraviolet Radiation From a Plant Perspective: The Plant-Microorganism Context // *Frontiers in Plant Science*. 2020. № 11. 597642. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.597642>

240. Vejan P., Abdullah R., Khadiran T., Ismail S., Nasrulhaq B.A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability // Review. *Molecules*. 2016. Vol. 21. № 5. 17 p. [электронный ресурс] <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/573/pdf>

241. Villa-Rodríguez E., Parra-Cota F., Castro-Longoria E., López-Cervantes J., Santos-Villalobos S. *Bacillus subtilis* TE3: A promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) // *Biological Control*. 2019. Vol. 132. P. 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.012>.

242. Volova T., Kiselev E., Vinogradova O., Nikolaeva E., Chistyakov A., Sukovaty A., Shishatskaya E. A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus euthrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent phas // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9. № 2. 15 p.

243. Wachowska U., Kucharska K., Jkdryczka M., Jobik N. Microorganisms as biological control agents against *Fusarium* pathogens in winter wheat // *Polish Journal of Environmental Studies*. 2013. Vol. 22. № 2. P. 591-597.

244. Wegulo S.N., Bockus W.W., Nopsa J.H., Wolf E.D., Eskridge K.M., Peiris K. H.S., Dowell F.E. Effects of integrating cultivar resistance and fungicide application on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in winter wheat // *Plant Disease*. 2011. Vol. 95. № 5. P. 554-560.

245. Willer H., Lernoud J. The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends // *Research Institute of Organic Agriculture FiBL and IFOAM Organics International*. 2019. P. 1-336.

246. Xu Y., Cai D., Zhang H., Gao L., Ang Y., Gao J., Yanga Y., Gaoe J., Lib Y., Yangb C., Jid Z., Yub J., Chen S. Enhanced production of iturin A in

Bacillus amyloliquefaciens by genetic engineering and medium optimization // Process Biochemistry. 2020. №. 90. P. 50-57.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.017>

247. Yue H., Zhong J., Li Z., Zhou J., Yang J., Wei H., Shu D., Luo D., Tan H. Optimization of iturin A production from *Bacillus subtilis* ZK-H2 in submerge fermentation by response surface methodology // Biotechnology. – 2021. № 11. P. 36 <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02540-7>

248. Yoon S., Sanford R.A., Löffler F.E. Nitrite control over dissimilatory nitrate/nitrite reduction pathways in *Shewanella loihica* strain PV-4 // Applied and Environmental Microbiology. 2015. Vol. 81. №10. P. 3510-3517.

249. Zadoks J. C., Chang T. T., Konzak D. F. A decimal code for the growth stages of cereals // Weed Res. 1974. № 14. P. 415-421.

250. Zhang X., Zhou J., Fu W., Li Z., Zhong J., Yang J., Xiao L., Tan H. Response surface methodology used for statistical optimization of jian-peptide production by *Bacillus subtilis* // Electronic Journal of Biotechnology. 2010. Vol. 13. № 4. P.1-8.

251. Zhao J., Liang D., Li W., Yan X., Qiao J., Caiyin Q. Research Progress on the Synthetic Biology of Botanical Biopesticides // Bioengineering. 2022. Vol. 9. №. 5. P. 207. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9050207>

252. Zhao X., Han Y., Tan X. Q., Wang J., Zhou Z. J. Optimization of antifungal lipopeptide production from *Bacillus* sp. BH072 by response surface methodology // Journal of Microbiology. 2014. Vol. 52. № 4. P. 324-332.

253. Zhong J., Zhang X., Ren Y., Yang J., Tan H., Zhou J. Optimization of *Bacillus subtilis* cell growth effecting jian-peptide production in fed batch fermentation using central composite design // Electronic Journal of Biotechnology. 2014. Vol. 17. P. 132-136.

ПРИЛОЖЕНИЯ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2022622985

**Бактерии-антагонисты фитопатогенов из Биоресурсной
коллекции «Государственная коллекция
энтомоакарифагов и микроорганизмов» ФГБНУ
ФНЦБЗР**

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологической защиты растений» (RU)*

Авторы: *Асатурова Анжела Михайловна (RU), Жевнова Наталья Андреевна (RU), Дубяга Валентина Михайловна (RU), Томашевич Наталья Сергеевна (RU), Павлова Марина Дмитриевна (RU), Хомяк Анна Игоревна (RU), Козицын Александр Евгеньевич (RU), Сидоров Никита Михайлович (RU), Астахов Михаил Михайлович (RU)*

Заявка № 2022622612

Дата поступления 24 октября 2022 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 21 ноября 2022 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат: 68b80077e14e10f0a94e6bd24145d5c7
Выданы: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 24.03.2022 по 26.05.2023

Ю.С. Зубов

Таблица 1 – Статистика погоды за период проведения полевых испытаний, метеостанция «Круглик», г. Краснодар

Показатели	2012 г.			2013 г.			2014 г.			2015 г.		
	среднее значение за год	минимальное значение /дата	максимальное значение /дата	среднее значение за год	минимальное значение /дата	максимальное значение /дата	среднее значение за год	минимальное значение /дата	максимальное значение /дата	среднее значение за год	минимальное значение /дата	максимальное значение /дата
Температура воздуха, °С	+ 13,5	-20,6 (08.02.)	+38,0 (24.07)	+ 13,2	-11,6 (13.12)	+36,2 (17.08)	+13,4	-17,9 (01.02)	+39,4 (15.08)	+13,9	-21,6 (09.01)	+38,1 (31.07)
Относительная влажность воздуха, %	66	13 (04.05.2012)	-	67	14 (08 и 15.03)	-	66	13 (03 - 04.08)	-	64	10 (10.08)	-
Количество осадков, мм/ количество дней с осадками	175 / 26	-	70,0 (04.11)	686/ 139	-	55,0 (02.10)	644/ 130	-	42,0 (12.06)	791/ 138	-	78,0 (24.06)

Таблица 2 – Метеорологические условия вегетационного периода, метеостанция «Круглик», г. Краснодар

Месяц	2012-2013 гг.			2013-2014 гг.			2014-2015 гг.		
	температура воздуха, °С	относительная влажность воздуха, %	количество осадков, мм	температура воздуха, °С	относительная влажность воздуха, %	количество осадков, мм	температура воздуха, °С	относительная влажность воздуха, %	количество осадков, мм
Октябрь	16,8	68,8	0,3	11,3	76,5	74,6	10,9	65,3	77,0
Ноябрь	8,4	79,8	100,7	9,0	73,6	35,4	4,7	75,2	17,0
Декабрь	2,5	78,3	74,2	0,9	80,4	71,1	4,4	78,3	65,9
Январь	4,5	76,1	40,8	0,8	79,2	95,9	2,2	77,3	88,5
Февраль	5,7	75,2	33,0	2,7	73,6	15,1	3,4	70,9	24,5
Март	7,6	65,6	80,2	8,4	66,4	92,5	7,5	67,2	43,9
Апрель	14,0	59,3	19,3	13,1	58,7	18,5	11,1	59,4	68,5
Май	21,8	53,8	17,3	20,2	65,4	45,2	18,5	57,1	71,4
Июнь	23,5	59,1	82,3	22,0	62,9	129,2	23,0	64,1	144,4
Июль	24,9	56,6	93,0	25,4	58,6	49,8	25,2	56,4	67,2
Средние показатели	12,1	67,3	541,1	11,4	69,5	627,3	11,1	67,1	668,3

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты
растений»
(ФГБНУ ВНИИБЗР)

Для служебного пользования.
УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВНИИБЗР



В.Д. Надыкта

личная подпись

«10» июля 2015 г.

Технические условия
ТУ 9291-001-00494002-2015

Комплексный биопрепарат на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g

Дата введения в действие – 10.07.2015 г

РАЗРАБОТАНО
ФГБНУ ВНИИБЗР
Зав. лабораторией создания
микробиологических средств
защиты растений и коллекции
микроорганизмов, канд.биол.наук


личная подпись

А.М. Асатулова

Младший научный сотрудник


личная подпись

А.И. Хомяк

Краснодар 2015

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты
растений»
(ФГБНУ ВНИИБЗР)

Для служебного пользования.
УТВЕРЖДАЮ



Директор ФГБНУ ВНИИБЗР

В.Д. Надыкта

личная подпись

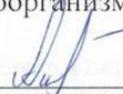
«10» июля 2015 г.

Технические условия
ТУ 9291-002-00494002-2015

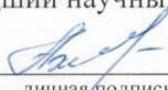
Комплексный биопрепарат на основе штамма *B. subtilis* BZR 517

Дата введения в действие – 10.07.2015 г

РАЗРАБОТАНО
ФГБНУ ВНИИБЗР
Зав. лабораторией создания
микробиологических средств
защиты растений и коллекции
микроорганизмов, канд.биол.наук


_____ А.М. Асатурова
личная подпись

Младший научный сотрудник


_____ А.И. Хомяк
личная подпись

Краснодар 2015

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ТОКСИКОЛОГИИ И ГИГИЕНИЧЕСКОЙ РЕГУМЕНТАЦИИ
БИОПРЕПАРАТОВ ФЕДЕРАЛЬНОГО
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА РОССИИ
(ФГБУН «НИЦ ТБП ФМБА РОССИИ»)



STATE FEDERAL BUDGET ENTERPRISE FOR SCIENCE
"RESEARCH CENTER FOR TOXICOLOGY AND HYGIENE
REGULATION OF BIOPREPARATIONS"
AT FEDERAL MEDICO-BIOLOGICAL AGENCY OF RUSSIA
(SFBS "RCT & HRB of FMBA of RUSSIA")

142253 РОССИЯ, Московская область, Серпуховский р-н, с/п.г. Давыдовское, Пискаревский пр. 102А
Тел./факс (4967)399738 код из Москвы -27 E-mail: toxic@online.stock.net

102А, Lenin str. Serpukhov, Moscow, Region 142253, Russia
Tel./Fax (4967)399738 code from Moscow -27 E-mail: toxic@online.stock.net

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУН «НИЦ ТБП
ФМБА России»
Доктор мед. наук, профессор



Н.Р. Дядищев

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

о патогенности штамма *Bacillus subtilis* BZR 336g для теплокровных животных

В соответствии с методическими указаниями Минздрава СССР № 4263-87, № 2620 – 82, методическими рекомендациями РГМУ «Критерии оценки патогенных свойств патогенных штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологического синтеза» (1992г.) и с учетом рекомендаций ВОЗ (бюлл. ВОЗ, 1981, №6, стр.20-27) изучены вирулентность, диссеминация, токсичность и токсигенность штамма *Bacillus subtilis* BZR 336g на беспородных белых крысах и беспородных белых мышах.

Вирулентность штамма *Bacillus subtilis* BZR 336g изучали при однократном внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении суточной агаровой культуры в физиологическом растворе. Белым крысам внутрибрюшинно и внутрижелудочно - по 10^7 , 10^8 , 10^9 микробных клеток на животное. Белым мышам внутрибрюшинно - по 10^6 , 10^7 , 10^8 ; внутрижелудочно - по 10^7 , 10^8 и 10^9 микробных клеток на животное. В опыте использовали по 6 животных на дозу при каждом введении. В период наблюдения клинических симптомов заболевания у животных не наблюдалось, гибель отсутствовала.

ЛД₅₀ для крыс при внутрижелудочном введении превышает 10^9 микробных клеток, при внутрибрюшинном введении - 10^8 . Для мышей ЛД₅₀ при внутрижелудочном введении превышает 10^9 , при внутрибрюшинном - 10^7 микробных клеток. Таким образом, испытанный штамм не является вирулентным.

Для изучения диссеминации через 30 суток после введения культуры штамма *Bacillus subtilis* BZR 336g делали посев методом отпечатков из внутренних органов белых мышей (сердца, легких, печени, почек и селезенки) на чашки Петри с агаризованной средой. Рост культуры *Bacillus subtilis* BZR 336g в высевах из органов животных при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении не обнаружен. Таким образом, испытанный штамм не способен к диссеминации и не вызывает бактериального поражения органов.

Токсичность штамма *Bacillus subtilis* BZR 336g оценивали путем внутрибрюшинного введения мышам взвеси агаровой культуры микроорганизмов, приготовленной на стерильном физиологическом растворе и инактивированной нагреванием при 70° С в течение 30 минут, в концентрациях 10^8 и 10^9 микробных клеток на животное (по 6 особей на дозу). В течение срока наблюдения -15 суток - гибели мышей не было. Таким образом, компоненты бактериальной клетки испытуемого штамма не являются токсичными для лабораторных животных.

Токсигенность штамма *Bacillus subtilis* BZR 336g изучали на мышах при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении стерильного фильтрата культуральной жидкости 3-х и 7-и суточных культур. Фильтрат 3-х суточной культуры вводили по 1,0; 1,6 и 2,0мл внутрижелудочно; внутрибрюшинно - по 0,5; 1,0 и 1,6 мл. Фильтрат 7-и суточной культуры - внутрижелудочно по 0,8; 1,4 и 1,8 мл; внутрибрюшинно - по 0,3; 0,8 и 1,4 мл. Контрольным животным вводили стерильную питательную среду в таких же объемах. На протяжении всего срока наблюдения (15 суток) клинических симптомов заболевания и гибели животных не было. При внутрижелудочном введении ЛД₅₀ для 3-х суточной культуры превышает 2,0 мл; при внутрибрюшинном - 1,6 мл на животное. Для 7-и суточной культуры при внутрижелудочном введении ЛД₅₀ превышает 1,8 мл, при внутрибрюшинном - 1,4 мл.

Таким образом, по показателям вирулентности, диссеминации, токсичности и токсигенности штамм *Bacillus subtilis* BZR 336g не является патогенным для теплокровных животных.

Руководитель исследования,
начальник отдела аэрозольной токсикометрии

А.В. Воробьев


17.05.2013

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ "НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ТОКСИКОЛОГИИ И ГИГИЕНИЧЕСКОЙ РЕГУЛАЦИИ
БИОПРЕПАРАТОВ ФЕДЕРАЛЬНОГО
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА РОССИИ
(ФГБУН «НИЦ ТБП ФМБА РОССИИ»)



STATE FEDERAL BUDGET ENTERPRISE FOR SCIENCE
"RESEARCH CENTER FOR TOXICOLOGY AND HYGIENE
REGULATION OF BIOPREPARATIONS"
AT FEDERAL MEDICO-BIOLOGICAL AGENCY of RUSSIA
(SFBS "RCT&HRB of FMBA of RUSSIA")

142253 РОССИЯ Московская область Серпуховский р-н с/п. Доловова ул. Ленин 102А
тел./факс (4967)399738 код из Москвы +27 E-mail: toxic.@online.stock.net

RCT&HRB

102A, Lenin str. Serpukhov, Moscow Region, 142253 Russia
Tel./Fax (4967)399738, Code from Moscow +27 E-mail: toxic.@online.stock.net

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУН «НИЦ ТБП
ФМБА России»
Доктор мед. наук, профессор

Н.Р.Дядищев

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

о патогенности штамма *Bacillus subtilis* BZR 517 для теплокровных животных

В соответствии с методическими указаниями Минздрава СССР № 4263-87, № 2620 – 82, методическими рекомендациями РГМУ «Критерии оценки патогенных свойств патогенных штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологического синтеза» (1992г.) и с учетом рекомендаций ВОЗ (бюлл. ВОЗ, 1981, №6, стр.20-27) изучены вирулентность, диссеминация, токсичность и токсигенность штамма *Bacillus subtilis* BZR 517 на беспородных белых крысах и беспородных белых мышах.

Вирулентность штамма изучали при однократном внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении суточной агаровой культуры в физиологическом растворе. Белым крысам - внутрибрюшинно и внутрижелудочно по 10^7 , 10^8 и 10^9 микробных клеток на животное. Белым мышам внутрибрюшинно - по 10^6 , 10^7 , 10^8 ; внутрижелудочно - по 10^7 , 10^8 и 10^9 микробных клеток на животное. В опыте использовали по 6 животных на дозу при каждом введении. В период наблюдения клинических симптомов заболевания у животных не наблюдалось, гибель отсутствовала.

ЛД₅₀ для крыс при внутрижелудочном введении превышает 10^9 микробных клеток, при внутрибрюшинном введении - 10^8 . Для мышей ЛД₅₀ при внутрижелудочном введении превышает 10^9 , при внутрибрюшинном - 10^7 микробных клеток. Таким образом, испытанный штамм не является вирулентным.

Для изучения **диссеминации** через 30 суток после введения культуры штамма *Bacillus subtilis* BZR 517 делали посев методом отпечатков из внутренних органов белых мышей (сердца, легких, печени, почек и селезенки) на чашки Петри с агаризованной средой. Рост культуры *Bacillus subtilis* BZR 517 в высевах из органов животных при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении не обнаружен. Таким образом, испытанный штамм не способен к диссеминации и не вызывает бактериального поражения органов.

Токсичность штамма *Bacillus subtilis* BZR 517 оценивали путем внутрибрюшинного введения мышам взвеси агаровой культуры микроорганизмов, приготовленной на стерильном физиологическом растворе и инактивированной нагреванием при 70°C в течение 30 минут, в концентрациях 10^8 и 10^9 микробных клеток на животное (по 6 особей на дозу). В течение срока наблюдения -15 суток - гибели мышей не было. Таким образом, компоненты бактериальной клетки испытуемого штамма не являются токсичными для лабораторных животных.

Токсигенность штамма изучали на мышах при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении стерильного фильтрата культуральной жидкости 3-х и 7-и суточных культур. Фильтрат 3-х суточной культуры вводили по 1,0; 1,6 и 2,0мл внутрижелудочно; внутрибрюшинно - по 0,5; 1,0 и 1,6 мл. Фильтрат 7-и суточной культуры - внутрижелудочно по 0,8; 1,4 и 1,8 мл; внутрибрюшинно - по 0,3; 0,8 и 1,4 мл. Контрольным животным вводили стерильную питательную среду в таких же объемах. На протяжении всего срока наблюдения (15 суток) клинических симптомов заболевания и гибели животных не было. При внутрижелудочном введении ЛД₅₀ для 3-х суточной культуры превышает 2,0 мл; при внутрибрюшинном - 1,6 мл на животное. Для 7-и суточной культуры при внутрижелудочном введении ЛД₅₀ превышает 1,8 мл, при внутрибрюшинном - 1,4 мл.

Таким образом, по показателям вирулентности, диссеминации, токсичности и токсигенности штамм *Bacillus subtilis* BZR 517 не является патогенным для теплокровных животных.

Руководитель исследования,
начальник отдела аэрозольной токсикометрии

А.В.Воробьев

17.05.2013

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2621356

**БИОФУНГИЦИД ДЛЯ ЗАЩИТЫ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР ОТ БОЛЕЗНЕЙ
И ПОВЫШЕНИЯ УРОЖАЙНОСТИ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Всероссийский научно-
исследовательский институт биологической защиты
растений" (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2015151901

Приоритет изобретения 03 декабря 2015 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 02 июня 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 03 декабря 2035 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев

Федеральное агентство научных организаций
 Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
 «Всероссийский научно-исследовательский институт
 биологической защиты растений»
 (ФГБНУ ВНИИБЗР ФАНО)

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор института,
 д-р техн. наук, проф.,
 академик РАН



В.Д. Надькта

«30» июня 2015 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ
 производства биопрепарата на основе штамма *Bacillus subtilis* BZR 336g в
 препаративной форме жидкая культура

Разработчики:

Зав. лабораторией создания
 микробиологических средств
 защиты растений и коллекции
 микроорганизмов, к. б. н.

 А.М. Асатунова

Младший научный сотрудник

 А.И. Хомяк

Краснодар 2015

Федеральное агентство научных организаций
 Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
 «Всероссийский научно-исследовательский институт
 биологической защиты растений»
 (ФГБНУ ВНИИБЗР ФАНО)



«УТВЕРЖДАЮ»
 Директор института,
 д-р техн. наук, проф.,
 академик РАН


 В.Д. Надикта

«30» июня 2015 г.

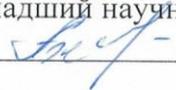
ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ
 производства биопрепарата на основе штамма *Bacillus subtilis* BZR 517 в
 препаративной форме жидкая культура

Разработчики:

Зав. лабораторией создания
 микробиологических средств
 защиты растений и коллекции
 микроорганизмов, к. б. н.

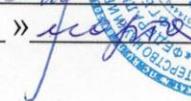

 А.М. Асатулова

Младший научный сотрудник


 А.И. Хомяк

Краснодар 2015

Утверждаю (исполнитель)
Директор ФГБНУ ФНЦБЗР
А.М. Асатурова


« 1 »  2024 г.


Утверждаю
Заместитель генерального
директора
ООО «Биотехагро»
Е.В. Бабарыкин


« 1 »  2024 г.


АКТ

**внедрения лабораторного регламента
«Производство биопрепарата на основе штамма *Bacillus subtilis* BZR 336g
в препаративной форме жидкая культура»
и технических условий
«Комплексный биопрепарат на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g»**

Краткое описание: лабораторный регламент включает характеристику биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g, технологическую схему производства, аппаратную схему производства и спецификацию оборудования, характеристику сырья и вспомогательных материалов, изложение технологического процесса, контроля и безопасной эксплуатации производства. Технические условия включают информацию о составе и физико-химических свойствах биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g, идентификацию опасности продукции, правила хранения и транспортировки, информацию о токсичности продукции для человека и окружающей среды, меры предосторожности при использовании продукции и информация о средствах индивидуальной защиты.

Место проведения работ: Краснодарский край, г. Тимашевск, ООО «Биотехагро»

Время проведения работ: 15.03.2023-22.05.2023 г.

Разработчик: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологической защиты растений»

Исполнители: Асатурова А.М., Хомяк А.И.

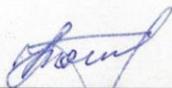
Основание выполнения: диссертационные исследования на тему «Биологическое обоснование создания и применения новых биопрепаратов на основе штаммов бактерий рода *Bacillus* для защиты пшеницы озимой от фузариозной корневой гнили»

Сведения о внедрении: лабораторный регламент «Производство биопрепарата на основе штамма *Bacillus subtilis* BZR 336g в препаративной форме жидкая культура» от 30.06.2015 и технические условия «Комплексный биопрепарат на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g» № ТУ 9291-001-00494002-2015 от 10.07.2015 проверены на технологическом оборудовании ООО «Биотехагро» в рамках научного сопровождения технологии производства биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g для защиты сельскохозяйственных культур.

Сведения об эффективности внедрения: проверка на оборудовании ООО «Биотехагро» подтверждает возможность промышленного производства биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g с титром не менее 1×10^8 КОЕ/мл в соответствии с лабораторным регламентом и техническими условиями.

ОТ ФГБНУ ФНЦБЗР:

Заместитель директора
по научной работе, к.с.-х.н.



подпись

Н.С. Томашевич

ОТ ООО «Биотехагро»:

Учредитель, к.с.-х.н.



подпись

А.И. Калашников

Утверждаю (исполнитель)
Директор ФГБНУ ФНЦБЗР
А.М. Асатурова


« 1 »  2024 г.

Утверждаю
Заместитель генерального
директора
ООО «Биотехагро»
Е.В. Бабарыкин


« 15 »  2024 г.

АКТ

**внедрения лабораторного регламента
«Производство биопрепарата на основе штамма *Bacillus subtilis* BZR 517
в препаративной форме жидкая культура»
и технических условий
«Комплексный биопрепарат на основе штамма *B. subtilis* BZR 517»**

Краткое описание: лабораторный регламент включает характеристику биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 517, технологическую схему производства, аппаратную схему производства и спецификацию оборудования, характеристику сырья и вспомогательных материалов, изложение технологического процесса, контроля и безопасной эксплуатации производства. Технические условия включают информацию о составе и физико-химических свойствах биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 517, идентификацию опасности продукции, правила хранения и транспортировки, информацию о токсичности продукции для человека и окружающей среды, меры предосторожности при использовании продукции и информация о средствах индивидуальной защиты.

Место проведения работ: Краснодарский край, г. Тимашевск, ООО «Биотехагро»

Время проведения работ: 15.03.2023-22.05.2023 г.

Разработчик: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологической защиты растений»

Исполнители: Асатурова А.М., Хомяк А.И.

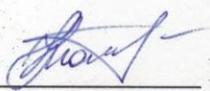
Основание выполнения: диссертационные исследования на тему «Биологическое обоснование создания и применения новых биопрепаратов на основе штаммов бактерий рода *Bacillus* для защиты пшеницы озимой от фузариозной корневой гнили»

Сведения о внедрении: лабораторный регламент «Производство биопрепарата на основе штамма *Bacillus subtilis* BZR 517 в препаративной форме жидкая культура» от 30.06.2015 и технические условия «Комплексный биопрепарат на основе штамма *B. subtilis* BZR 517» № ТУ 9291-002-00494002-2015 от 10.07.2015 проверены на технологическом оборудовании ООО «Биотехагро» в рамках научного сопровождения технологии производства биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 517 для защиты сельскохозяйственных культур.

Сведения об эффективности внедрения: проверка на оборудовании ООО «Биотехагро» подтверждает возможность промышленного производства биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 517 с титром не менее 1×10^8 КОЕ/мл в соответствии с лабораторным регламентом и техническими условиями.

ОТ ФГБНУ ФНЦБЗР:

Заместитель директора
по научной работе, к.с.-х.н.



подпись

Н.С. Томашевич

ОТ ООО «Биотехагро»:

Учредитель, к.с.-х.н.



подпись

А.И. Калашников