

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

На правах рукописи



Хомяк Анна Игоревна

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

4.1.3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
канд. биол. наук
Асатурова Анжела Михайловна

Краснодар – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Биопрепараты для защиты растений на основе бактерий-антагонистов в России и в мире.....	11
1.2 Эффективность применения биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов в защите растений.....	17
1.3 Условия культивирования.....	20
1.4 Динамика роста штаммов-продуцентов биопрепаратов.....	31
1.5 Оптимизация условий культивирования и разработка технологии получения биопрепаратов.....	34
1.6 Добавки, обеспечивающие увеличение эффективности применения биопрепаратов в сельском хозяйстве.....	37
2. МЕСТО, ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	41
2.1 Определение культурально-морфологических признаков штаммов бактерий-антагонистов.....	41
2.2 Определение ростстимулирующей активности штаммов бактерий-антагонистов.....	42
2.3 Определение оптимальных условий культивирования штаммов бактерий-антагонистов.....	43
2.4 Выделение, хроматографический анализ, анализ антифунгальной активности бактериальных метаболитов.....	46
2.5 Биологическая эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов бактерий-антагонистов на фоне искусственного заражения пшеницы озимой <i>F. graminearum</i> BZR F-4 в условиях климатической камеры.....	47
2.6 Эффективность применения лабораторных образцов биопрепаратов на фоне естественного поражения корневой гнилью фузариозной этиологии в условиях полевого мелкоделяночного опыта.....	49
2.7 Оценка влияния коммерческих прилипателей на эффективность лабораторных образцов биопрепаратов с целью создания комплексной системы защиты растений от корневых гнилей фузариозной этиологии.....	53
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	56

3.1 Культурально-морфологические признаки и идентификация штаммов бактерий-антагонистов.....	56
3.2 Ростстимулирующая активность штаммов бактерий-антагонистов....	58
3.3 Оптимизация условий культивирования штаммов бактерий-антагонистов и разработка состава питательной среды для получения лабораторных образцов биопрепаратов на их основе.....	60
3.4 Биологическая эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на основе 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.....	92
3.5 Разработка технических условий и лабораторных регламентов производства биопрепаратов на основе штаммов бактерий-антагонистов.....	97
3.6 Эффективность применения лабораторных образцов биопрепаратов на фоне естественного поражения корневой гнилью фузариозной этиологии в условиях полевого мелкоделяночного опыта.....	101
3.7 Оценка влияния коммерческих прилипателей на эффективность лабораторных образцов биопрепаратов с целью создания комплексной системы защиты растений от корневых гнилей фузариозной этиологии.....	105
ЗАКЛЮЧЕНИЯ.....	114
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	116
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	152
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	153
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	155
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	157
ПРИЛОЖЕНИЕ Д.....	159
ПРИЛОЖЕНИЕ Е.....	160
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж.....	162
ПРИЛОЖЕНИЕ И.....	164

ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

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

Цель и задачи исследования.

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

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

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

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

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

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

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

Теоретическая значимость. Получены новые знания о физиолого-биохимических свойствах штаммов бактерий *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 из Биоресурсной коллекции ФГБНУ ФНЦБЗР «Государственная коллекция

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

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

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

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

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

Положения, выносимые на защиту:

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

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

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

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

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

Результаты исследований докладывались на X Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 120-летию И. С. Косенко, г. Краснодар, 26-30 ноября 2016 г.; Международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2018, г. Уфа, 13-17 июня 2018 г.; IV Международной научной конференции «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки», г. Ялта, 9-13 сентября 2019; 9-й Международной научно-практической конференции «Защита растений от вредных организмов», г. Краснодар, 17-21 июня 2019 г.; Международной научно-практической конференции с элементами школы молодых ученых «Научные приоритеты адаптивной интенсификации сельскохозяйственного производства», г. Краснодар, пос.

Белозерный, 3-5 июля 2019 г; XI Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты», г. Минск, р. Беларусь, 3-6 июня 2019 г; XI Международной научно-практической конференции «Защита растений от вредных организмов», г. Краснодар, 19-23 июня 2023 г.; Международном форуме «Агробиотехнологии: достижения и перспективы развития», г. Москва 28-31 августа 2023 г.; Международной конференции «Innovations in Sustainable Agriculture 4.0 ISAS-2025» г. Ставрополь, 10-11 апреля 2025 г.

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

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

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

Структура и объём диссертации

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

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю, канд. биол. наук, вед. научному сотруднику лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ФНЦБЗР Асатуровой А. М. за научно-методическое руководство и помощь в выполнении диссертационной работы, а также сотрудникам лаборатории микробиологической защиты растений за оказанную помощь. За ценные советы и замечания – сотрудникам ФГБНУ ФНЦБЗР: канд. биол. наук Исмаилову В. Я., зам. директора по научной работе ФГБНУ ФНЦБЗР, к.с.-х.н. Томашевич Н.С., рук. отдела интеллектуальной собственности и инновационного развития, канд. с.-х. наук. Ермоленко С. А., менеджеру отдела интеллектуальной собственности и инновационного развития Олейниковой А.А., начальнику отдела аспирантуры Вертий Е. А., ученому секретарю Есауленко Е. А.

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* [Бактерии родов *Advenella*...., 2018; Козлова А.С., Шпатова Т.В., Штерншис М.В., 2021; Ortiz A., Sansinenea E., 2022]. При этом бактерии вида *Bacillus subtilis* являются наиболее продуктивными и перспективными представителями рода *Bacillus* в микробиологической промышленности [Эффективность использования биопрепаратов...., 2019; Twizeyimana M., Hartman G. L., 2019; Djaenuddin N., Suriani, Muis A., 2020; Optimizing the Integration of a Biopesticide...., 2021; Гиченкова О. Г., Лаптина Ю. А., 2023].

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

- высокая антифунгальная активность [Role of plant growth promoting rhizobacteria...., 2016; Астапчук И. Л., Якуба Г. В., Насонов А. И., 2021; Антифунгальная активность бактерий...., 2021; *Bacillus* spp. as bio-factories...., 2023];

- быстрый антагонистический эффект [Formulation and development of biofungicide...., 2014; *Bacillus subtilis* TE3...., 2019];

- способность бацилл к колонизации различных частей растения и образование биопленок в ризосфере и на листовой поверхности [Павлюшин В. А., Новикова И. И., Бойкова И. В., 2020; *Bacillus* lipopeptides as powerful pest....., 2020; *Bacillus subtilis* biofilm formation...., 2021; *Bacillus subtilis*: a multifarious plant...., 2022];

- отсутствие устойчивости у патогенов к бациллам и продуцируемым ими соединениям [Маслова М. В., Грошева Е. В., 2020; Coevolutionary Governance of Antibiotic..., 2020];

- возможность использования на различных стадиях развития растений, для обработки семян и почвы [Высоцкая Е. А., Крекотень М. А., 2015];

- совместимость с химическими препаратами [Synergistic effect of combined application..., 2019; Наумов Т. Н. 2021; The challenge of combining high....., 2021].

Но необходимо учитывать, что действующим началом биопрепаратов являются живые клетки микроорганизмов и/или их метаболиты. В связи с этим существует ряд особенностей [Эндофитные бактерии как агенты..., 2018; Essiedu J. A., Adepoju F. O., Ivantsova M. N., 2020; Biopesticides: current status..., 2020; Потапенко Д. Ю., Рзаева В. В., 2023]:

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

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 N., Singhvi R., 2018; Willer H., Lernoud J., 2019].

Динамичное развитие индустрии органики способствует переориентации бизнеса на производство востребованной экологически безопасной продукции, и как следствие, на развитие ассортимента биологических средств защиты растений [Yadav R., 2022; Догадина М. А., Правдюк А. И., Криворотова Е. И., 2024].

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%. Ожидается, что мировой рынок биопестицидов вырастет с 6,51 млрд долларов в 2022 году до 18,15 млрд долларов к 2029 году при среднегодовом темпе роста 15,77% [Microbial bio-control agents....., 2024].

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 [Biopesticide oversight and registration....., 2014; Pelaez V., Mizukawa G., 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 S., 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 [Pesticides in the Modern World....., 2011; The biochemistry behind biopesticide....., 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 биопестицидов находится на начальном этапе развития. По данным Союза органического земледелия в реальную практику биологическая система защиты растений внедрена на 2%

сельхозугодий РФ [Темралеева А.Д., 2024]. Одна из основных причин такого отставания от Запада – отсутствие на российском рынке широкого ассортимента биологических средств защиты растений [Терентьев С. Е., Ковалева А. Е., 2018; Ванюшина О. И., 2019]. Полному внедрению биопестицидов препятствует нехватка средств защиты растений для удовлетворения потребностей сельхозтоваропроизводителей [Overview of mechanisms and uses of biopesticides....., 2021; Мезюха А. Н., Гайзатулин А. С., Яценко С. Н., 2022].

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 A.M., et al., 2012; Antimicrobial activity of *Bacillus circulans*....., 2014; Штерншис М.В., и др., 2016; Antifungal activity of lipopeptides....., 2018]. Однако вопросы технологии производства биопрепаратов и требования к их конечным характеристикам не столь проработаны [The challenges of introducing a new....., 2013; Microorganisms as biological control....., 2013].

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 г. 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..., 2023].

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....., 2014].

В России основными производителями биологических средств защиты растений являются ПО «Сиббиофарм», НВП «БашИнком», ЗАО «Агробιοтехнология», 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 Л. Ю., 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 Н. И., Фомин А. А., 2018].

В 2025 году на территории Российской Федерации были разрешены для применения следующие микробиологические препараты на основе *B. subtilis*: Бактерра, Баксис, Алирин Б, Бисолбицид, Бактофит, Гамаир, Витаплан, -Фунгимен, Фитоспорин-М, [Государственный каталог....., 2025]. Такой небольшой ассортимент связан, в том числе и с слабо проработанными современными стандартами получения биопестицидов [Леонтьева Т. Н., Кузина Е. В., Логинов О. Н., 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 М.В., 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 Г. И., 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 А. А., Дятлова О. Г., 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 Е. С., Шпанев А. М., 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 О. О., 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 Л. М., Кудрявцев Н. А., 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 % [Эффективность биопестицидов и регуляторов роста...., 2012].

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

Обработка Бактофитом растений картофеля обеспечила биологическую эффективность в отношении фитофтороза картофеля на уровне 61% и способствовала получению 37% дополнительного урожая [Черников И. А., 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 М. В., Грошева Е. В., 2020].

Обработка Алирином-Б растений земляники садовой обеспечила биологическую эффективность против пятнистостей до 91,4 %, против серой гнили до 45,0 % [Холод Н. А., 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 И. И., 2019]. На растениях груши Алирин-Б снизил распространение *Entomosporium maculatum* в два раза по сравнению с контролем [Танделова А. В., 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 Фитоспорино-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 [Повышение адаптивного потенциала посевов...., 2015].

Эффективность Фитоспорино-М против серой гнили на землянике садовой составила 62–63 %, дополнительный урожай составил 2,5 т/га за счет увеличения размера ягод [Табакоева И. Д., Чухина О. В., 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 Е. В., 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 Н. П., Галиуллин А. А., 2022].

Также в научной литературе имеются данные о применении биопрепаратов для защиты растений за рубежом [Leisso R.S., Burrows M.E., 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 R., Berrada A., 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 [Evidence that the biofungicide Serenade..., 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% [Bio efficacy studies of Taegro..., 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% [Efficacy of *Bacillus subtilis*..., 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 Z. K., Rodriguez G., Tirajoh A., 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 BA в зависимости от культуры [Efficacy of biofungicides against root..., 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 pH 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 С.Д., 1978; Мосичев М.С., и др., 1982; Biochemical limitations of *Bacillus thuringiensis*..., 2023; Optimization of the culture medium....., 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 H.F., 2012; Gašić S., Tanović B., 2013; Биопрепараты для защиты растений....., 2018; Федоренко В. Ф., 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 pH 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 [Fermentation factors influencing..., 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 [Применение бактериальных термостабильных липолитических..., 2018]. В то же время понижение температуры может способствовать уплотнению мембранных липидов и, как следствие, снижению активности ферментов и растворимости растворимых молекул [ANN and RSM based modelling..., 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 Е. С., Сидорова Н. А., 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 A.R., Alden S.B., 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 КОЕ превышает контроль на 88,9% [Влияние температуры культивирования....., 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 Ф. Р., Джафарова У. Д., 2012; Evaluation of biomass production....., 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 R., Rerngsamran P., 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 С.Д., 1978].

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

1.3.2 pH

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

Значение pH 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 флоккуляция 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 С.Д., 1978].

Многие бактериальные организмы, образующие антибиотики, лучше развиваются при нейтральном значении исходной активной pH среды – при pH около 7,0, а некоторые, например, молочнокислые бактерии – при pH 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 pH 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 pH [Рост и развитие продуцента бактокулицида..., 2013].

Для некоторых штаммов отмечается более широкий диапазон pH среды. Для штамма *Bacillus sp.* P1, выделенного из ризосферы сладкого картофеля, отмечены незначительные колебания КОЕ при культивировании на средах с pH 6-9 (5,0-8,4 x 10⁵ КОЕ/мл) [Mohapatra S., Samantaray D.P., Samantaray S.M., 2015]. Штамм *Bacillus sp.* 3, являющийся действующим агентом биофунгицида «Бацизулин», обнаруживает способность к росту в диапазоне pH от 5,0 до 9,0 с максимумом фунгистатической активности при pH 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 pH [Хайбуллин А.И., 2000].

В ходе развития организмов pH среды не остается постоянным, а зависит как от состава субстрата, так и от физиологических особенностей культивируемых

микроорганизмов [Емельяненко В. А., Королук А. М., 2010]. *B. thuringiensis* B-10, основной компонент комплексного микробного инсектицидного препарата «Бактофунгин», способен подщелачивать среду в процессе роста культуры до pH 5,8 при начальном 5,0 и 6,7 при начальном 6,0 [Дрегваль О. А., Черевач Н. В., Винников А. И., 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 Н.С., 2004].

Таким образом, pH 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 pH, температура, ионная сила среды и недостаточное содержание в среде микроэлементов [Antifungal and antibacterial properties....., 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 С.Д., 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 D., Ellouze-Chaabouni S., 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 pH и, как следствие, снижению *B. subtilis* производства сурфактина [Chen W.-C., Juang R.-S., Wei Y.-H., 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 [Оптимизация бактериальных питательных сред...., 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 [Isolation and characterization of a *Rhodococcus*...., 2012; Improvement of biomass and cyclic lipopeptides...., 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 [Exopolymer diversity and the role...., 2013]. Замена глюкозы на сахарозу в питательной среде для культивирования штамма *B. methylotrophicus* BM47

способствовала увеличению антифунгальной активности исследуемого штамма в отношении *F. oxysporum* в три раза [Tumbarski Y., Petkov E., Denkova Z., 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 М. Г., Олейникова Е. А., 2012].

Часто в промышленном производстве в качестве источника углерода используются крахмал и крахмалсодержащие субстраты (кукурузная, соевая мука и т.д.) [Biosurfactant production by *Bacillus subtilis*..., 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 [Optimization of thermo-alkali stable..., 2017].

По данным литературы, уровень накопления биомассы не всегда коррелирует с показателями спорообразования, которое репрессируется, в частности, высоким содержанием сахаров [Хилько Т.В., 2004; Мулюкин А.Л., Луста К.А., Грязнова М.Н., 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 З. Ю., Захарова Н. Г., Ильинская О. Н., 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 [Production of surfactin from *Bacillus subtilis*..., 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 [Разработка и изучение влияния состава..., 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 [Ethanol induction of laccase..., 2015].

Различными микроорганизмами могут быть использованы очень многие источники азота, включая неорганические и органические его формы [Yoon S., Sanford R.A., Löffler F.E., 2015]. Так, неорганические источники азота (NH_4NO_3 , NaNO_3) обеспечивали более интенсивную продукцию сурфактина штаммом *B. subtilis* BBk1 (2-2,5 г/л), чем органические (мочевина, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина), при использовании которых выход сурфактина составил 0,5-1 г/л [Abushady H. M., Bashandy A. S., Ibrahim H. M. M., 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 [Бурова Ю. А., Ибрагимова С. А., Ревин В. В., 2012].

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 цефалоспорино-С, оказывающего выраженный

антибактериальный эффект [Antimicrobial activity of *Bacillus circulans*...., 2014]. Добавление в питательную среду для культивирования *B. subtilis* ZK-H2 L-аспарагина, L-глутамина, и L-пролина способствовало увеличению синтеза итурин А на 32,81% по сравнению с контролем [Optimization of iturin A....., 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 С.Д., 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 E.A., Stern N.J., Eruslanov B.V., 2005; He Z., Kislá D., Zhang L., 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 E., 2014].

При промышленном производстве биопрепаратов в качестве источника азота используются натуральные продукты растительного и животного происхождения [Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis*, 2018]. Часто это продукты вторичной переработки, гидролизаты и автолизаты, богатые витаминами, микроэлементами и органическим азотом [Влияние состава питательных сред...., 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* ЕА 4 [Леонтьева Т. Н., Кузина Е. В., Логинов О. Н., 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 С. П., Асабина Е. А., Логинов О. Н., 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 [Production of a novel glycerol inducible...., 2009].

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 Z., Tazerouti A., Hacene H., 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 А. А., 2012].

Продолжительность лаг-фазы может увеличиваться при изменении температуры культивирования [Raykova D., Peykov Sl., Dimov Sv., 2008; Зимина М. И., Газиева А. Ф., 2017] или при повышении концентрации желатина в питательной среде [Optimization of *Bacillus aerius* strain..., 2017]. На продолжительность лаг-фазы может оказать существенное влияние объем посевного материала [Abushady H. M., Bashandy A. S., Ibrahim H. M. M., 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 [A glucose-utilizing strain..., 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 итурина 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 итурина А возрастает и достигает своего максимума – $(2013,4 \pm 32,8$ мг/л) к 72 ч культивирования [Xu Y., 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 M 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 M (среднее время генерации = 1,3 сут) и S5 (среднее время генерации = 3,1 сут). Штамм U отличается максимальным выходом биомассы, а E3 – минимальным [Кинетические параметры роста бактерий...., 2012].

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 Ю. Л., Ивашкин Ю. А., Гордеев Л. С., 2011; Roeva O., 2012; ANN and RSM based modelling...., 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 [Inhibition property of a novel antifungal polypeptide...., 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 ОПС, содержащей 24 % соевого гидролизата и 0,38 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, увеличился на 41 % по сравнению с контролем и составил $371,3 \pm 32,7$ мг/л [A new bioorganic fertilizer..., 2011; Optimization of *Bacillus subtilis* cell...., 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 % [Оптимизация производства липопептидов...., 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 [Четвериков С. П., Асабина Е. А., Логинов О. Н., 2006].

Исследования, проведенные в целях повышения антибиотической активности штамма *B. subtilis* B38, показали, что лактоза, сукцинат аммония и MnSO_4 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 [Optimization of medium composition...., 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, И. Ю. Рой А. А., Курдиш И. К., 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 KH_2PO_4 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 Т. Н., Кузина Е. В., Логинов О. Н., 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 R., Antoniou M. N., 2018].

Уникальность каждого микробного агента создает дополнительные сложности при рассмотрении конкурирующих ингредиентов, процессов и составов препарата [Biopesticides for pests control...., 2016; Хужаназарова М. К., Муродова С. С., 2022]. Так, культуры, которые являются гидрофобными, нуждаются в тщательном подборе соответствующих поверхностно-активных веществ, легко смешивающихся с водой для распыления [Novel combination of a biosurfactant...., 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 S., Singh R. P., 2016; Павлюшин В. А., Новикова И. И., Бойкова И. В., 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 [Concepts and applications...., 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 N., Kungulovski D., 2018]. Эти агенты обычно состоят из натуральных (углеводные, белковые или другие полимеры) или синтетических химических вещества (этоксилированные фенокси спирты, латексный полимер) [Epiphanies of well-known..., 2020]. Механизм защиты обеспечивается молекулами, которые являются гидрофобными или полимеризуются с образованием нерастворимого в воде остатка для эффективного захвата микробного агента [Sahai P., Sinha V. B., Dutta R., 2019]. Так, добавление в питательную среду ксантановой камеди и патоки улучшает адгезию клеток *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* к кутикуле еловой листовертки *Choristoneura fumiferana* на 55% [Biopesticide and formulation processes...., 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 [Evaluation of biofungicide formulation...., 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 [Evaluating the efficacy of potential..., 2021]. На сегодняшний день прилипатели развиваются в сторону многофункциональных добавок с характеристиками, которые делают их трудосберегающими, легко разлагаемыми и низкотоксичными [Towards sustainable green....., 2023]. Комбинация препарата Vertalec (*Akanthomyces dipterigenus*) с прилипателем на основе растительного масла повысила смертность капустной тли *Brevicoryne brassicae* в полевых условиях на 86 % [Prince G., Chandler D., 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 X., 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 A., Jørgensen L. N., 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 [Ultraviolet Radiation From...., 2020; Enwemeka Ch. S., Baker T. L., Bumah V. V., 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 [Biopesticide Encapsulation Using Supercritical CO₂...., 2021].

В составы для фотопротекции включают хромофоры и пигменты. Так, установлено, что конго красный делает устойчивыми к УФ-излучению конидии *M. robertsii* [Congo red induces trans-priming...., 2023]. Черный меланин, продуцируемый

штаммом дрожжей *Hortaea werneckii* EGYNDA08, защищает штамм *B. thuringiensis* subsp. *aegypti* Bt-C18 от дезактивации солнечным светом и увеличивает его биологическую эффективность в отношении личинок хлопкового листового червя *Spodoptera littoralis* в девять раз [Saleh H., Abdelrazak A., Elsayed A., 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 [The effect of mixtures of *Bacillus*....., 2022].

В отличие от химических добавок, способных только поглощать УФ-лучи, физические добавки способны отражать и рассеивать УФ-лучи [Single cell encapsulation in a Pickering....., 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 E., Maghsoudi S., Noroozian E., 2020]. Иммобилизация *T. viride* и *B. bassiana* на гранулах полимочевины способствовала защите от УФ-излучения и выживаемости 90% клеток [Новая форма биопрепаратов....., 2018; Хомяк А.И., Асатунова А.М., 2024].

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

2.1 Определение культурально-морфологических признаков штаммов бактерий-антагонистов

Культурально-морфологические признаки штаммов-продуцентов изучали на 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 [Лабораторный практикум...., 2004; Практикум по микробиологии...., 2005].

2.2 Определение ростстимулирующей активности штаммов бактерий-антагонистов

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 высевали 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. 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 синтетическую среду Чапека для бактерий (среда собственного приготовления, все компоненты российского производства) [Скворцова И. Н., 1981]. Для определения оптимальной температуры культивирования штаммы выращивали при температурах 20,0; 25,0; 30,0 и 35,0 °C. Для определения оптимальной pH среды добавлением молочной кислоты или щелочи (4 Н раствор NaOH) реакцию среды устанавливали в пределах 3,0; 6,0; 8,0 и 10,0. pH определяли при помощи pH-метра Sartorius PB-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 КОЕ. Антибиотическую активность штаммов определяли модифицированным методом последовательных разведений [Егоров Н.С., 2004; Optimization of laboratory cultivation conditions....., 2020]. Для очистки от клеток бактерий культуральную жидкость центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5810R (Германия) в течение 30 мин (10 000 об./мин) при 15°C и пропускали через мембранный фильтр марки «Millipore» с диаметром пор 0,22 мкм. Далее культуральную жидкость вносили в ЧП по 1,0 мл. В ЧП добавляли по 9 мл охлажденной до + 37,0 - + 40,0 °C агаризованной ОПС 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 стерильной ОПС. Учеты проводили ежедневно.

Степень ингибирования роста мицелия патогена определяли по формуле [Montealegre J.R., Reyes R., Perez L.M., 2003]:

$$И = (1 - (A / B)) \times 100, \quad (1)$$

где И – ингибирование роста мицелия патогена, %;

А – рост гриба в варианте, мм;

В – рост гриба в контроле, мм.

ЖК биопрепаратов, полученные на ОПС, подвергались исследованию по критерию антагонистической активности. В качестве контролей использовали жидкую питательную среду КВ (среда собственного приготовления, все компоненты российского производства) [King E.O., Ward M.K., Raney D.E., 1954] и КГС. Повторность в каждом опыте – трехкратная.

Определение антагонистической активности исследуемых штаммов проводили методом двойных (встречных) культур [Ваксман З. А., 1947; Егоров Н.С., 1957] на КГА, среде КВ и агаризованной ОПС (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. Антифунгальную активность определяли по вышеупомянутой формуле расчета степени ингибирования роста мицелия патогена.

Для всех опытов ЖК 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 А.М., 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:

$$T = \frac{a \times 10^n}{V}, \quad (2)$$

где 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, 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:

- 1) свежеприготовленная смесь 0,1М FeCl_3 и 0,1М феррицианида калия (1:1);
- 2) 20 % раствор Na_2CO_3 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 [Выделение и характеристика антигрибных метаболитов...., 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 лабораторных образцов биопрепаратов на основе 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 проавтоклавированном 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 (триконазол 20 г/л + прохлораз 60 г/л) с нормой применения 2,5 л/т, в качестве биологического эталона – биопрепарат Фитоспорин – М, Ж (*B. subtilis*, 26Д) с нормой применения 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 семена, 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 [Методические указания...., 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 [Методические указания...., 2009]:

$$R = \frac{\sum(a \times b) \times 100}{N \times K}, \quad (3)$$

где 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:

$$P = \frac{n}{N} \times 100, \quad (4)$$

где P - распространенность болезни, %

n - число больных растений в варианте;

N - общее число растений в варианте.

Биологическую эффективность рассчитывали по формуле Эббота:

$$C = \frac{100 \times (P - p)}{P}, \quad (5)$$

где 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 согласно методике полевого опыта [Доспехов, Б. А., 2011].

Территория, согласно агроклиматическом районированию, относится к центральной зоне Краснодарского края. Почвенный покров этой зоны представлен черноземом, выщелоченным сверхмощным слабогумусным на лессовидных суглинках [Кириченко К.С., 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 [Структурно-функциональные характеристики...., 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 [Структурно-функциональные характеристики...., 2015].

Среднегодовая температура составляла от +13,2 до +13,9 °С, низкие показатели температур были отмечены в декабре - феврале, высокие – в июне и июле. Суммарное количество осадков за год составляло от 175 до 791 мм, количество дней с выпавшими осадками – от 16 до 159. Среднегодовая влажность воздуха составляла от 64 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 Б, таблица 1). Анализ метеорологических условий по данным метеостанции «Круглик» за период проведения исследований по диссертационной работе (2012-2015 гг.) представлен в приложении 2, таблица 2.

В 2012 г. посев осуществляли в первой декаде октября, в 2013 г. – во второй декаде октября, в 2014 г. – в третьей декаде октября.

Схема мелкоделяночного опыта, 2012-2013 гг.

1. Контроль – посев семян, обработанных водой
2. Химический эталон – Раксил, КС (обработка семян, норма применения препарата – 0,5 л/га) + Альто Супер, КЭ (обработка растений, норма применения препарата – 0,5 л/га)
3. BZR 336g *B. subtilis* (норма применения препарата 3,0 л/т)
4. BZR 517 *B. subtilis* (норма применения препарата 2,0 л/т) [Эффективность инокуляции семян...., 2019].

Схема мелкоделяночного опыта, 2013-2014 гг.

1. Контроль – посев семян, обработанных водой

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

Схема мелкоделяночного опыта, 2014-2015 гг.

1. Контроль – посев семян, обработанных водой
2. Химический эталон – Раксил, КС (обработка семян, норма применения препарата – 0,5 л/га) + Альто Супер, КЭ (обработка растений, норма применения препарата – 0,5 л/га)
3. Биологический эталон – Фитоспорин-М, Ж (норма применения препарата 1,0 л/т)
4. *B. subtilis* BZR 336g (норма применения препарата 3,0 л/т)
5. *B. subtilis* BZR 517 (норма применения 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 применения препарата 0,5 л/т, в качестве биологического эталона – Фитоспорин - М, Ж (*B. subtilis* 26 Д) с нормой применения препарата 1,0 л/т.

Посев осуществляли спустя сутки после обработки с помощью механической сеялки СЗ-3,6. Площадь одной делянки составляла 25 м², норма высева – 5 млн. всхожих семян на 1 га., ширина междурядья – 15 см. Опытные участки располагали по предшественнику люцерна. Глубина заделки семян 4-5 см.

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 J. C., Chang T. T., Konzak D. F., 1974]. Кратность обработок обусловлена зоной проведения опыта и степенью развития патогена. Нормы применения 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). В течение опыта осуществляли мониторинг и идентификацию возбудителя корневой гнили до рода.

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 и распространенность болезни [Методические указания..., 2009]. Биологическую эффективность рассчитывали по формуле Эббота. Массу 1000 зерен определяли по ГОСТ 12042-80.

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).

Уборку урожая в 2013 году осуществляли во второй декаде июня, в 2014 году – в первой декаде июля, в 2015 г. – во второй декаде июля. Уборку проводили селекционным комбайном Nege 125 с последующим приведением к стандартной влажности [ГОСТ 13586.5-2015].

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: Адью, Ж (этоксилат изодецилового спирта), Липосам, Г (композиция биополимеров природного происхождения с прилипающими свойствами), Хайгер, Ж (этоксилат изодецилового спирта), Сильвет Голд, Ж (трисилоксан алкоксилат), Панэм, Ж (ксилаты жирных кислот), Полидон Бонд, Ж (композиция 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 [Маслиенко Л.В., 1999]. 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 КОЕ и антифунгальную активность ЖК штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 смешивали с прилипателями в соотношении, рекомендованном производителем.

КОЕ определяли методом Коха [Практикум по микробиологии...., 2005]. Исследование антифунгальной активности проводили методом двойных (встречных) культур [Ваксман З. А., 1947]. Антифунгальную активность

определяли по вышеупомянутой формуле расчета степени ингибирования роста мицелия патогена.

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 IKA 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 [Выделение и характеристика антигрибных метаболитов..., 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 [Методические указания..., 2009].

По результатам балльной оценки пораженных растений определяли развитие и распространенность болезни [Методические указания...., 2009]. Биологическую эффективность рассчитывали по формуле Эббота.

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

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Культурально-морфологические признаки и идентификация штаммов бактерий-антагонистов

Клетки палочковидные с закругленными концами, одиночные или соединены попарно, клетки подвижны. Размеры клеток у штамма *B. subtilis* BZR 336g 0,46-0,75 x 1,42-1,92 мкм, у штамма *B. subtilis* BZR 517 – 0,49-0,76 x 2,07-3,30 мкм. Имеются споры. Окраска по Граму положительная (таблица 1).

Таблица 1 – Морфологические признаки клеток штаммов бактерий-антагонистов, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2012 г.

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, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2012 г.

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

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 Т. А., Зими́на Т. В., 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 D., Thakker J.N., Dhandhukia P.C., 2016]. Косвенный механизм осуществляется за счет усиления системной устойчивости и антибиоза [Hashem A., Tabassum B., Fathi Abd Allah E., 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 D., Marinković J., Balešević-Tubić S., 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 бактерий-антагонистов на биометрические показатели растений пшеницы озимой сорт Батько в динамике, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2012 г.

Длина побега, увеличение в %				Масса побега, увеличение 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, увеличение в %				Масса корня, увеличение 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 F. A., Ahmad I., Pichtel J., 2019].

На третьи-четвертые сутки для контроля отмечено статистически достоверное снижение интенсивности развития биомассы растений [Штаммы бактерий из Биоресурсной коллекции....., 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 [Влияние ауксинпродуцирующих и фосфатмобилизующих бактерий....., 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 и разработка состава питательной среды для получения лабораторных образцов биопрепаратов на их основе

При культивировании микроорганизмов р. *Bacillus* большое значение для спорообразования, синтеза ферментов и накопления их в ЖК имеют источники углеродного и азотного питания [Влияние состава питательных сред..., 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 S., Kansal R., Gosal S.K., 2019; Production of levan by *Bacillus licheniformis*..., 2019; Оптимизация состава среды для культивирования..., 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 бактерий-антагонистов (периодическое культивирование), ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013 г.

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 Н.С., 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) [Биологическая защита

растений....., 2004]. Они продуцируют широкий круг антибактериальных и антифунгальных веществ как рибосомальной природы (субтилин, субтилозин, тасА и субланцин), так и не рибосомальной (хлоротетайн, микобациклин, ризатацин, бациллин, диффицидин, липопроотеиды сурфактин, итурин, фенгицин) [Смирнов В. В., Василевская И. А., Резник С. Р., 1985; Martin S.B., Abawi G.S., Hoch H.C., 1987; Koumoutsis A., Chen X-H., Henne A., 2004; Structural characterization and identification....., 2017].

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 бактерий-антагонистов в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от источника углеродного питания (периодическое культивирование), ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013 г.

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								

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 A. O., Ogunbanwo T. S., 2014].

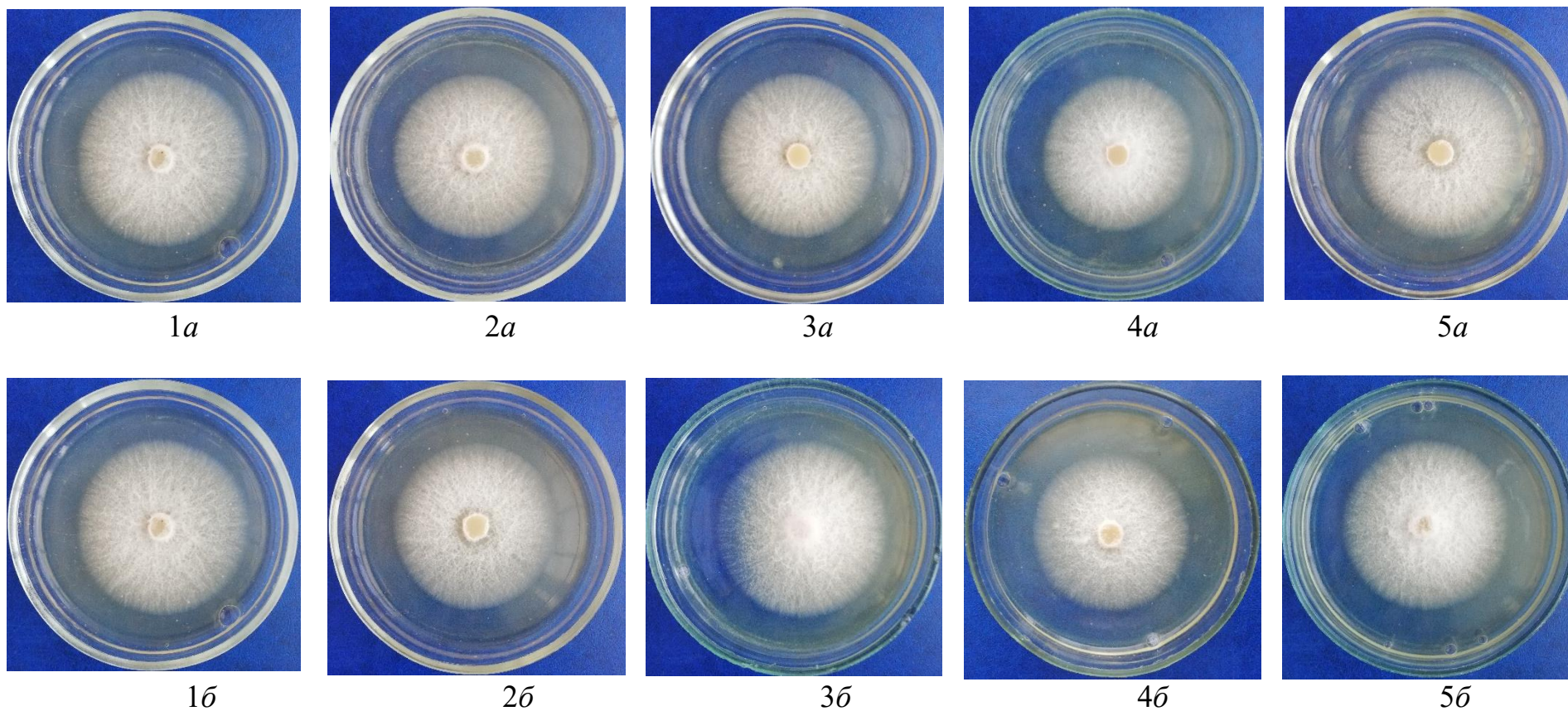


Рисунок 1 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от источника углеродного питания (периодическое культивирование), (ориг.)

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

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

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 S., Pierre F., Morlock G., 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 фенгидина 0,10-0,13, для итурина А — 0,20-0,31, для сурфактина — 0,70-0,73. При этом фенгидин, сурфактин и их гомологи подавляют рост гриба частично (фунгитоксичность), тогда как итурин А и его гомологи полностью ингибируют рост гриба (фунгицидность).

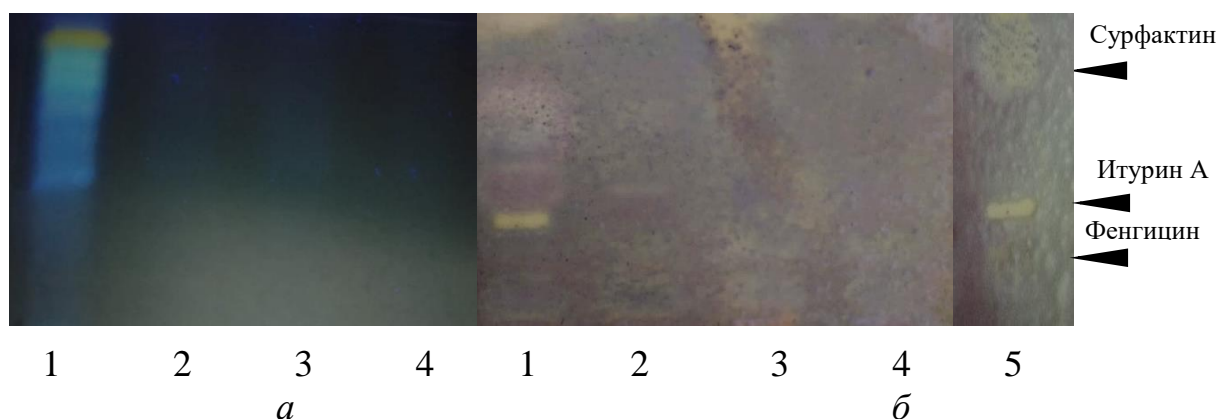


Рисунок 2 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 336g (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

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

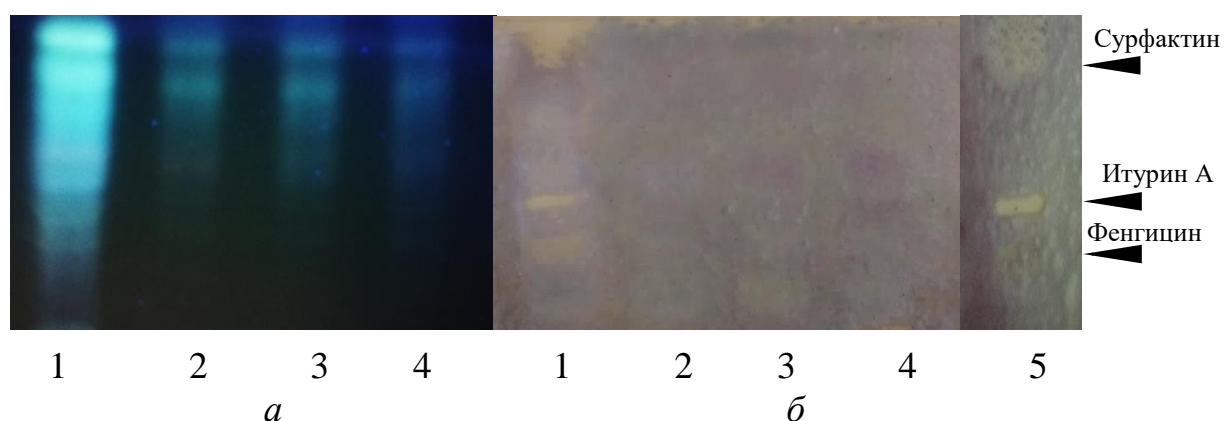


Рисунок 3 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

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 A.K., Rautela R., Cameotra S.S., 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 бактерий-антагонистов (периодическое культивирование), ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013 г.

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% [Effect of zinc oxide nanoparticle..., 2021]. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 максимальное ингибирование *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 отмечалось на среде с добавлением пептона – 19,1 %. Но, поскольку пептон является дорогостоящим компонентом питательной среды, для дальнейшей разработки ОПС в качестве источника азота выбран кукурузный экстракт.

Таблица 7 – Антибиотическая активность штаммов бактерий-антагонистов в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от источника азотного питания (периодическое культивирование), ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013 г.

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).

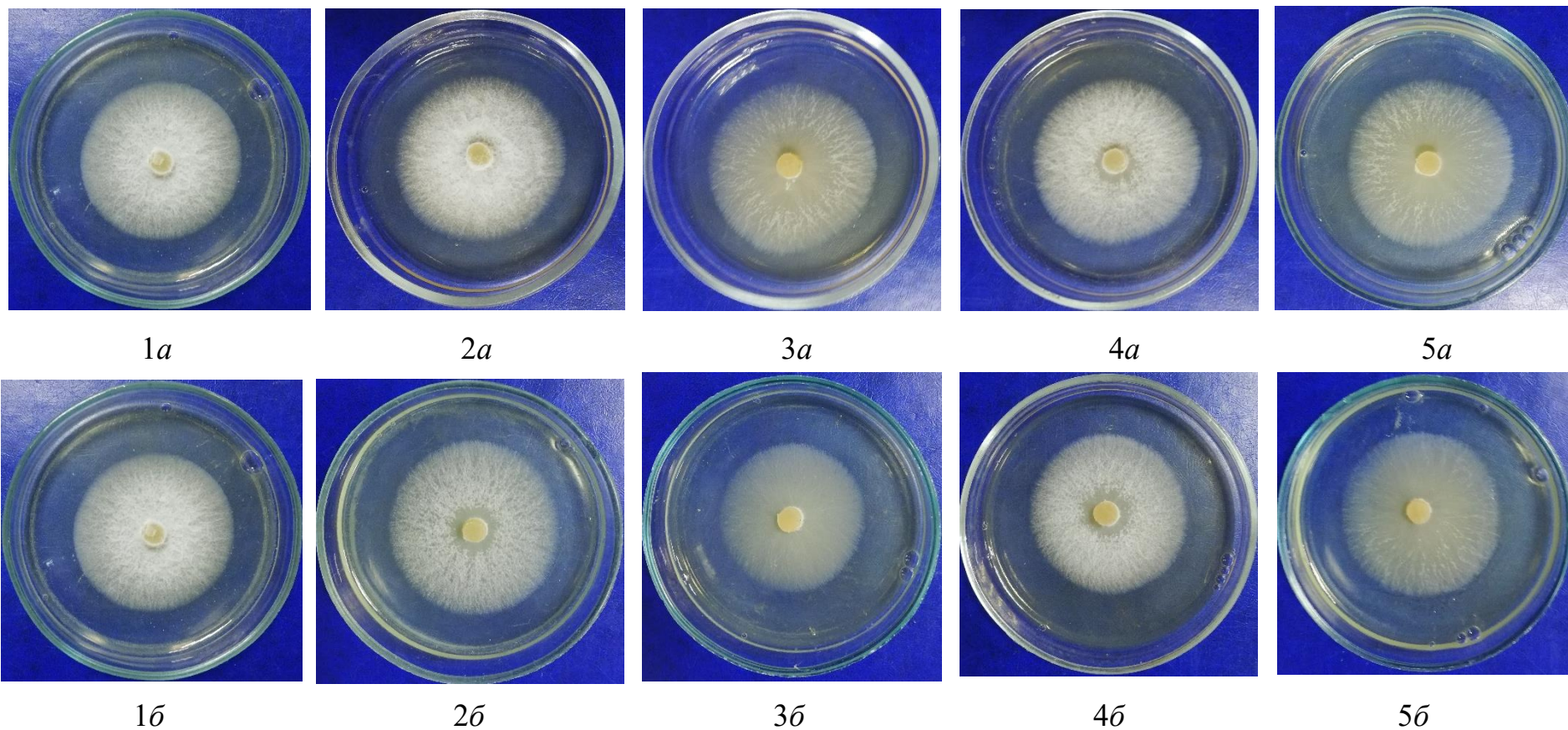


Рисунок 4 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от источника азотного питания (периодическое культивирование), (ориг.)

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 Хи 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 [Хи Y., et al., 2020].

Хроматографический анализ выявил увеличение количества полос с «усложнением» состава источника азота (рисунок 5, 6). 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.

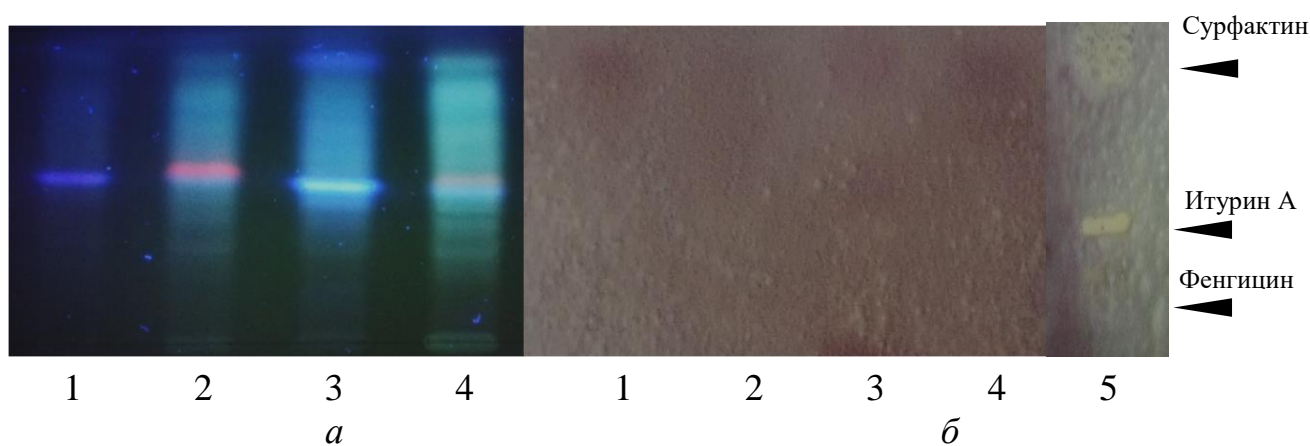


Рисунок 5 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 336g (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

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

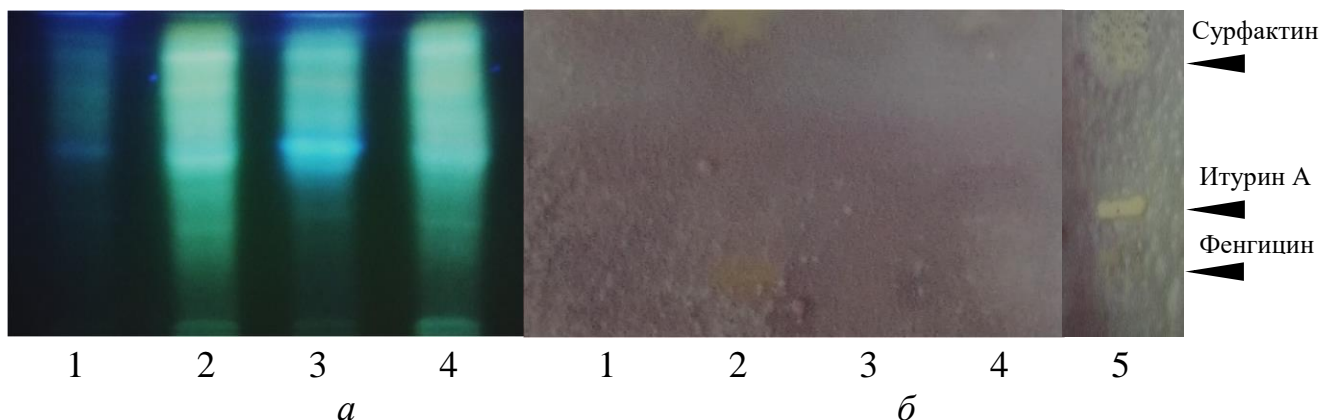


Рисунок 6 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

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 [Biosurfactant and degradative enzymes..., 2017; Biosurfactants and its prospective..., 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 [Production, optimization and partial..., 2015; Screening and optimization of newly..., 2020; Effects of temperature, pH..., 2020]. В ходе

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 З. Ю., Захарова Н. Г., Ильинская О. Н., 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 [Antimicrobial activity of *Bacillus circulans*...., 2014]. 30,0°С также оказалась предпочтительной для синтеза штаммом *B. subtilis* KLP2015 липопептидов, активных в отношении *Mucor sp.* и *A. niger* [Two factor at a time approach...., 2020].

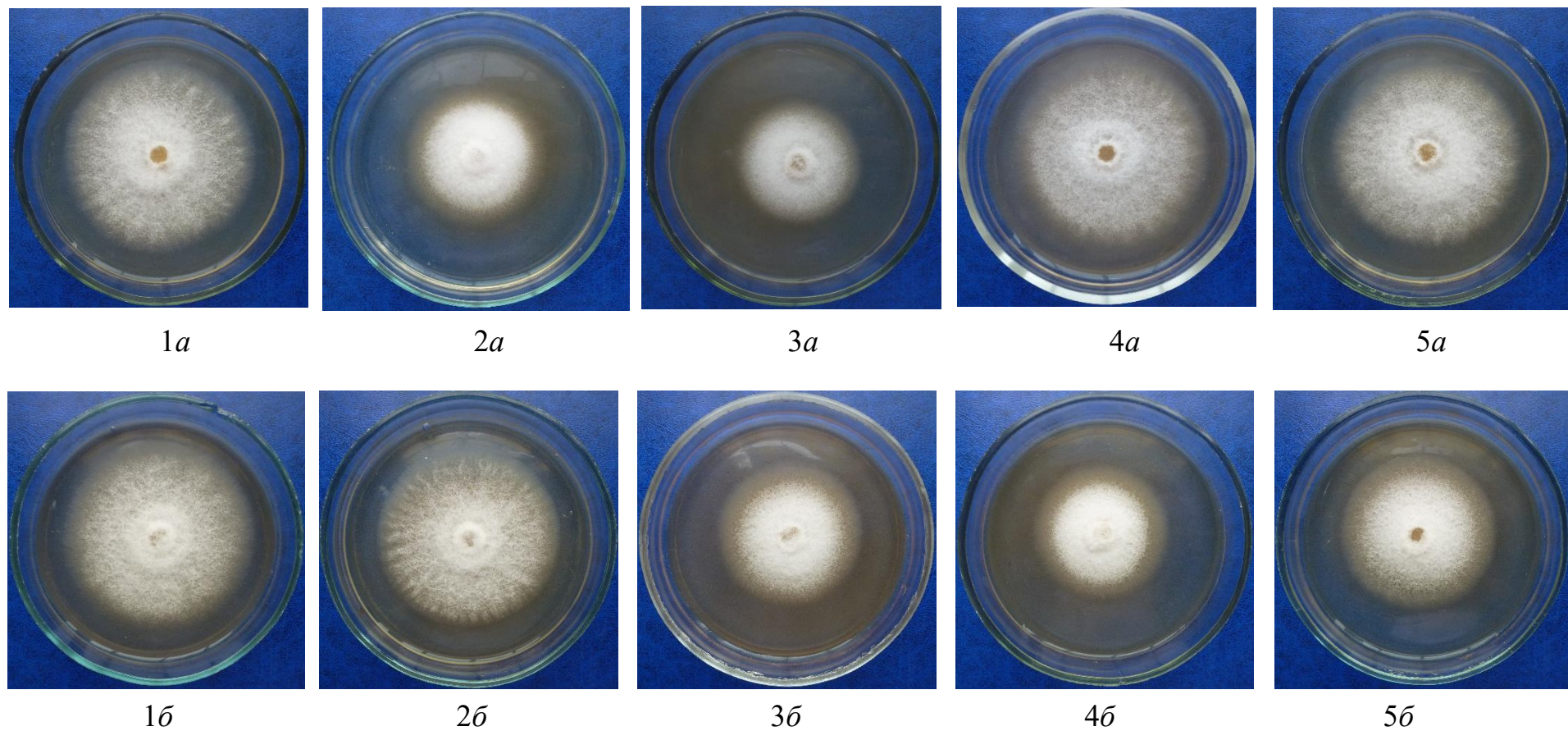


Рисунок 7 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от температуры культивирования (периодическое культивирование), (ориг.)

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.

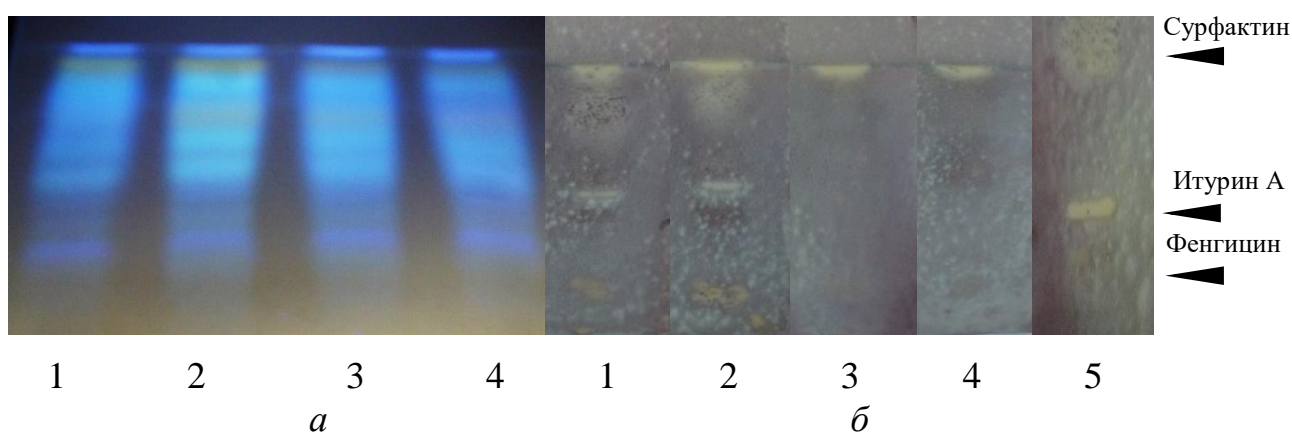


Рисунок 8 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 336g (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

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.

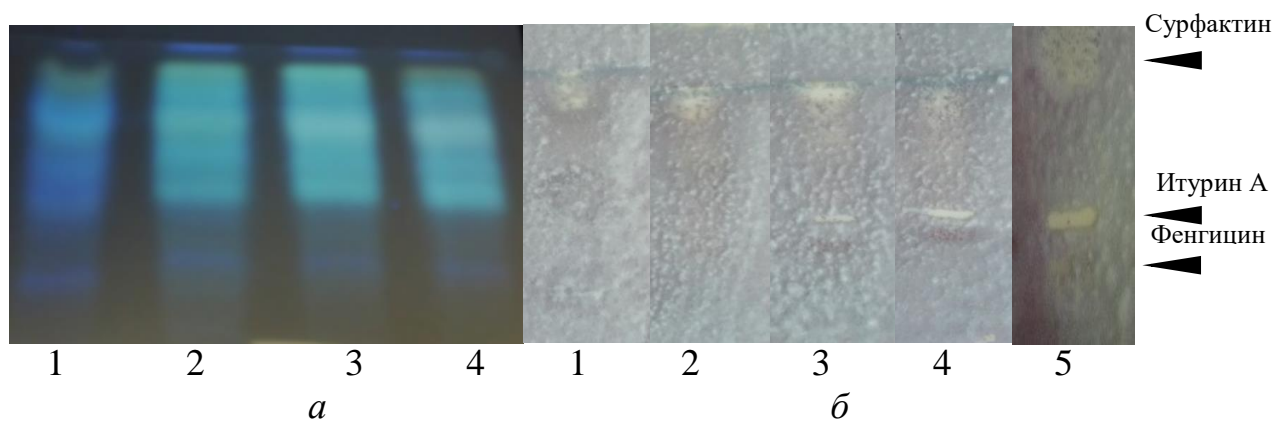


Рисунок 9 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

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 [Хомяк А. И., Асатурова А. М., Сидорова Т. М, 2019; Optimization of laboratory cultivation conditions...., 2020].

Существенное значение при культивировании микроорганизмов имеет pH 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 pH 8,0 для штамма *B. subtilis* BZR 336g. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 высокие значения титра $(9,8 \pm 0,2) \times 10^8$ и $(9,9 \pm 0,2) \times 10^8$ КОЕ/мл в сочетании с максимальной

антифунгальной активностью (47,5 % и 41,8% соответственно) отмечены при pH 6,0 и 8,0 (таблица 10).

Таблица 10 – Влияние рН на рост штаммов бактерий-антагонистов
(периодическое культивирование), ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013 г.

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 бактерий-антагонистов в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от pH (периодическое культивирование), ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013 г.

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 pH 3,0. При пониженной pH 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 pH среды и достигает максимума при pH 10,0 – 6,3 мг. При этом, отмечено, что доля γ -циклодекстринов была выше при слабокислой-нейтральной среде (pH 6,0-7,0) [Effects of substrates and reaction...., 2011]. Для штамма *B. flexus* FPB17, выделенного из щелочной почвы Северного Гуджарата (Индия), щелочная среда также оказалась более предпочтительной. Установлено, что оптимум pH для роста клеток – 10,0, а для активного производства щелочной фосфатазы – 9,0 [Falguni R.P., Sharma M.C., 2012].

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

Результаты хроматографических и биоавтографических исследований антибиотической активности исследуемых штаммов в зависимости от pH 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 pH 3,0 отмечено отсутствие роста мицелия патогена. Вероятно, это обусловлено чувствительностью *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 к пониженной pH среды.

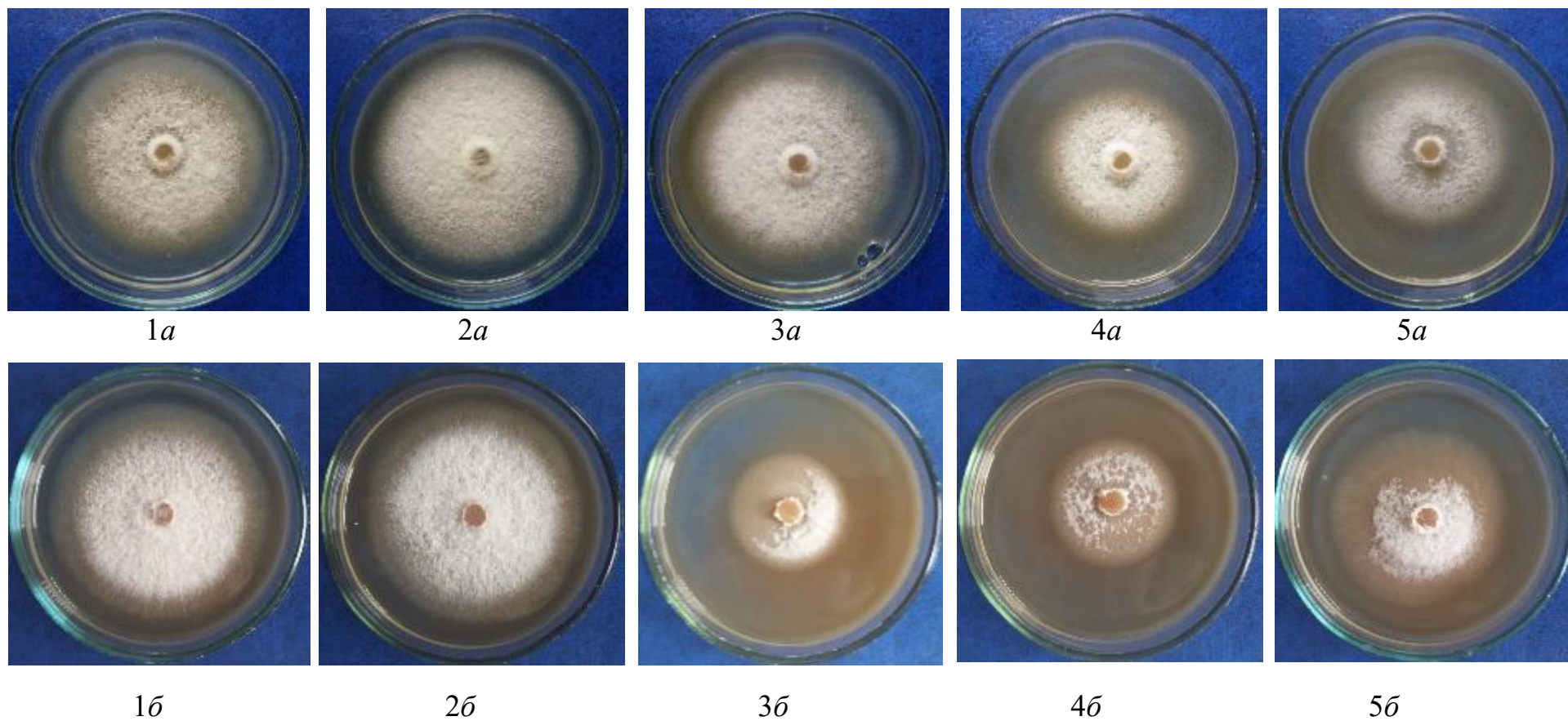


Рисунок 10 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от pH (периодическое культивирование) (ориг.)

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

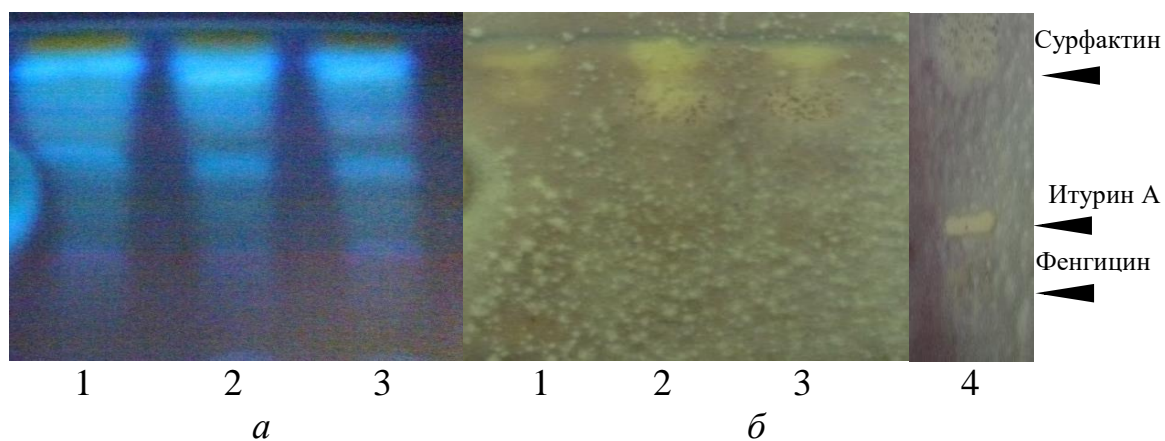


Рисунок 11 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 336g (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

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

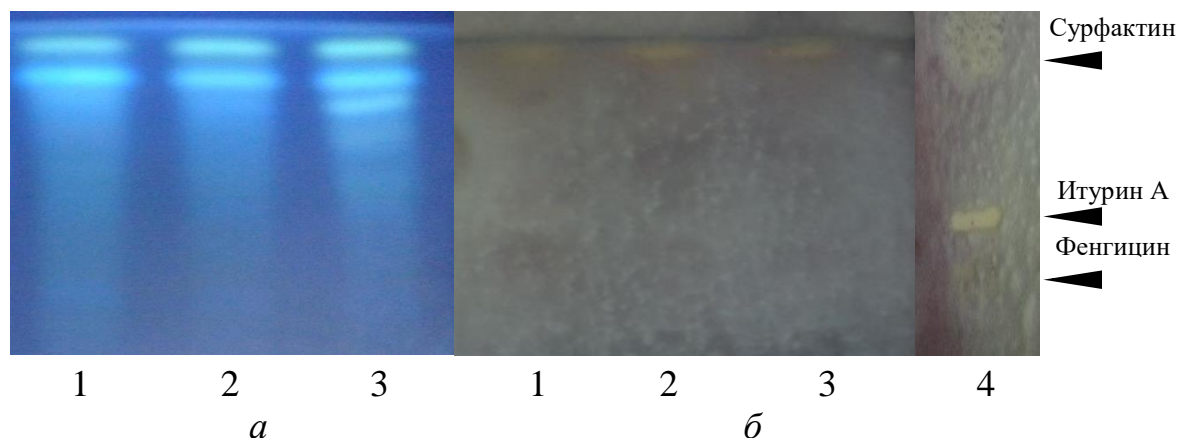


Рисунок 12 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

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 [Optimization of laboratory cultivation conditions....., 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 [Bayman P., Otero J.T., 2006; Чеботарь В. К., Завалин А. А., Кипрушкина Е. И., 2007; Chen W., Wu C.H., Bernard S.H., 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.

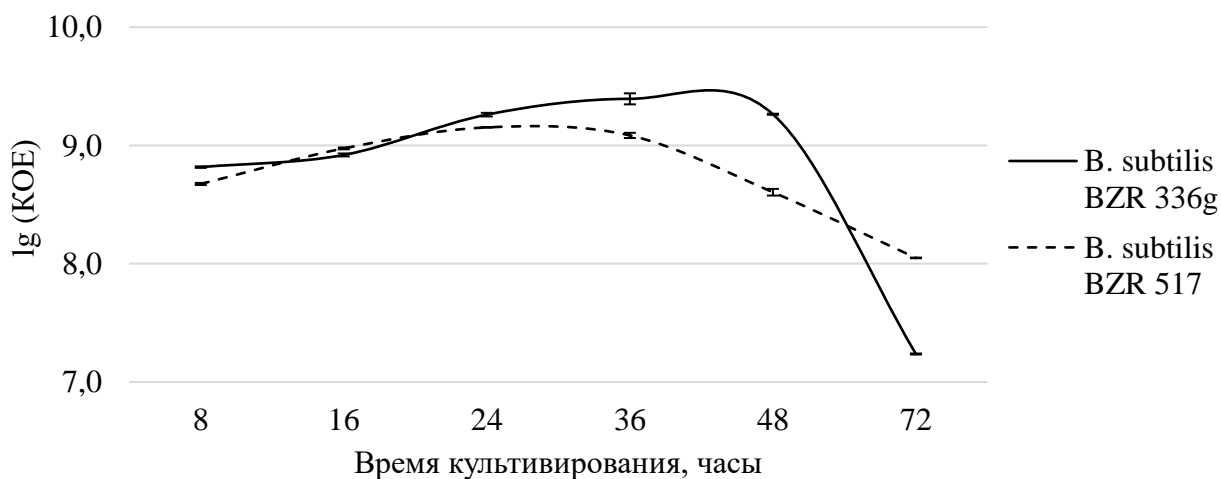


Рисунок 13 – Динамика роста штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 (периодическое культивирование)

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 [Изучение антифунгальной активности штаммов..., 2020].

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 [Biological control of plant pathogens....., 2018].

Таблица 12 – Антибиотическая активность штаммов бактерий-антагонистов в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от времени культивирования (периодическое культивирование), ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013 г.

Время культивирования, ч	Ингибирование патогена, %, 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.

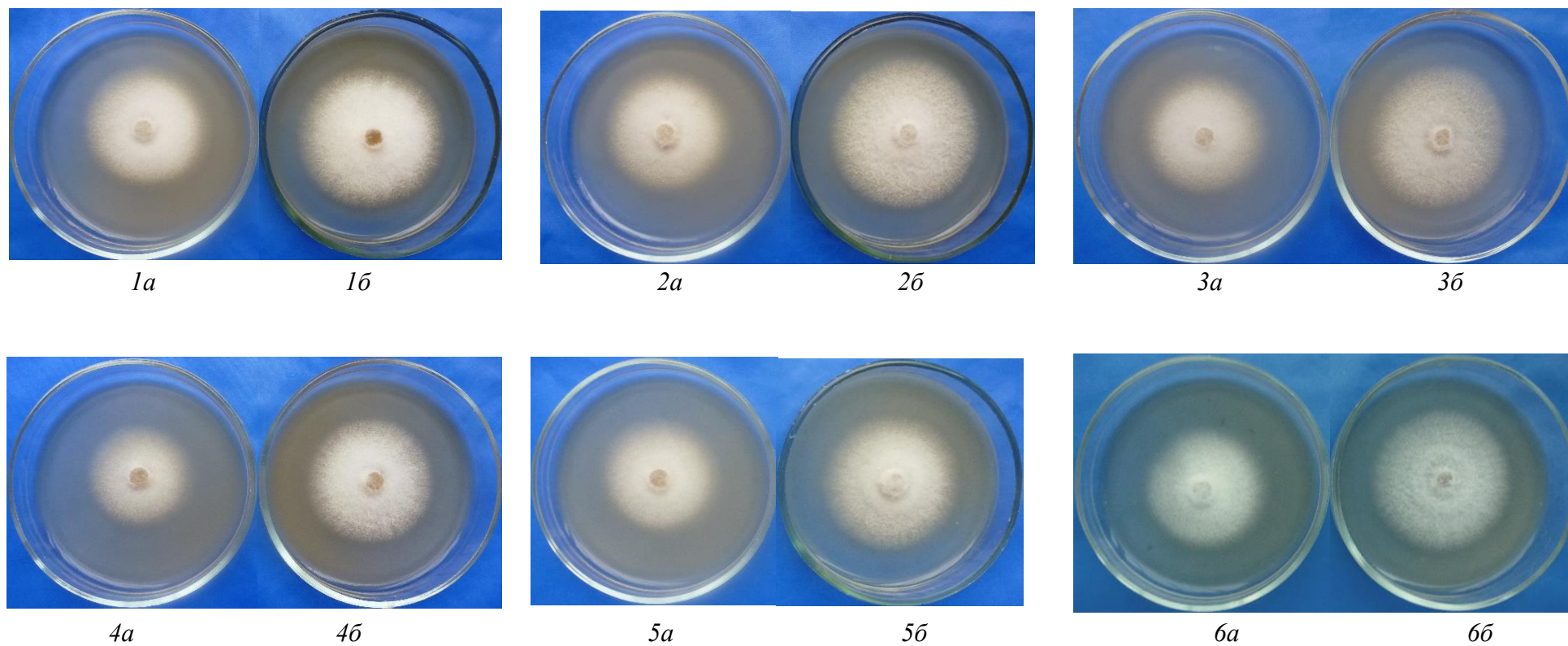


Рисунок 14 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 336g в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6 в зависимости от времени (периодическое культивирование) (ориг.)
 1 – 8 часов; 2 – 16 часов; 3 – 24 часа; 4 – 36 часов; 5 – 48 часов; 6 – 72 часа;
a – штамм *B. subtilis* BZR 336g;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

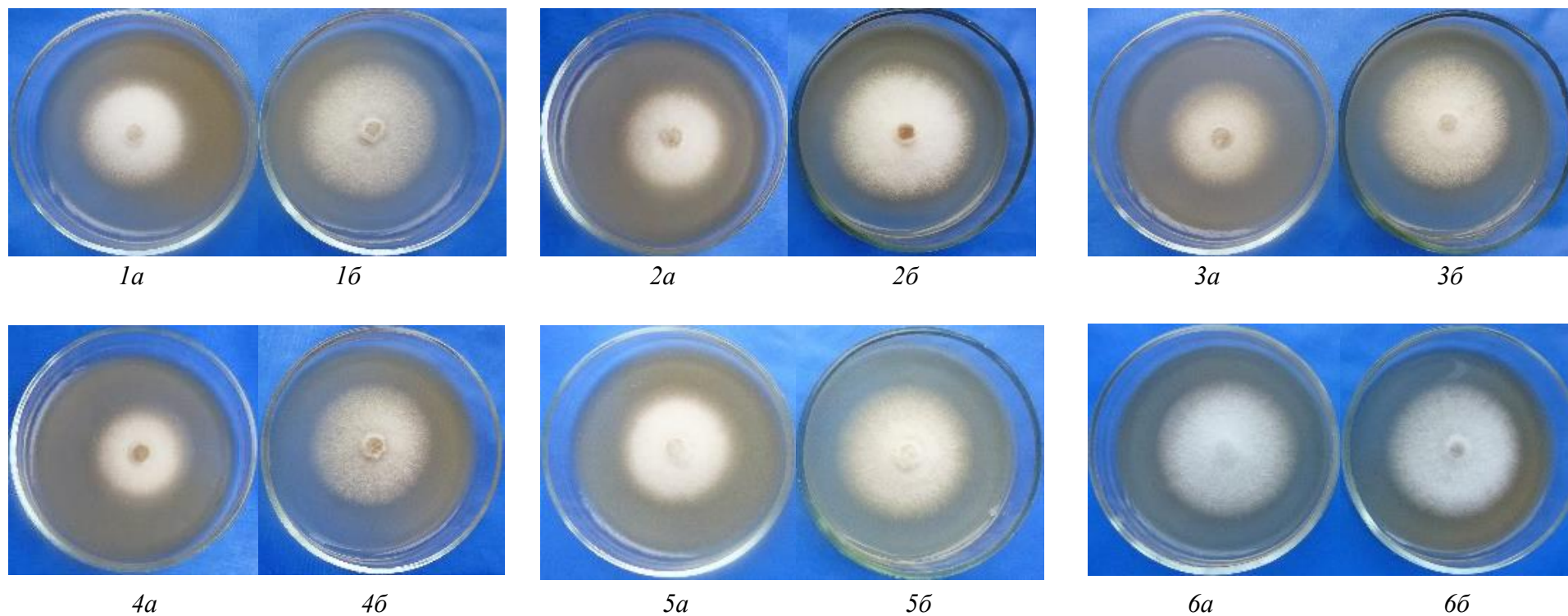


Рисунок 15 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras*

BZR F-6 в зависимости от времени (периодическое культивирование) (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.

На основании полученных данных была разработана оригинальная ОПС. 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 КОЕ ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g на ОПС 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) [Хомяк А. И., Асатунова А. М., Сидорова Т. М., 2019].

Сотрудниками Казанского федерального университета установлено, что при выращивании *Bacillus sp.* 3 на КГС 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 З. Ю., Захарова Н. Г., Ильинская О. Н., 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 [Optimization of antifungal lipopeptide...., 2014; Improvement of antifungal metabolites...., 2016; Microbial metabolomics: essential definitions...., 2019].

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

Степень ингибирования *F. graminearum* BZR F-4 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 % [Хомяк А.И., Жевнова Н.А., Асатурова А.М., 2021].

Таблица 13 – Рост и антифунгальная активность штаммов бактерий-антагонистов на различных питательных средах (периодическое культивирование), ФГБНУ ФНЦБЗР, 2013 г.

Питательная среда	Титр ЖК, КОЕ/мл	Ингибирование мицелия патогена, %			
		инкубация, сут.			
		5	10	15	20
<i>B. subtilis</i> 336g					
КГА	(1,1±0,03) x 10 ⁸ ^b	60,1 ^c	64,0 ^b	59,2 ^b	53,5 ^b
КБ	(2,7±0,2) x 10 ⁶ ^a	46,1 ^b	61,2 ^b	61,1 ^b	61,1 ^b
ОПС	(2,4±0,2) x 10 ⁹ ^c	90,0 ^d	83,6 ^c	78,2 ^c	75,9 ^c
<i>B. subtilis</i> 517					
КГА	(2,4±0,3) x 10 ⁶ ^a	55,8 ^b	62,6 ^b	57,8 ^b	54,0 ^c
КБ	(3,3±0,2) x 10 ⁶ ^a	46,8 ^b	63,6 ^b	64,0 ^b	63,5 ^c
ОПС	(4,1±0,2) x 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.) [Ху Y., et al., 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 Г. Д., Глинушкин А. П., 2017].

При этом важно отметить, что только на ОПС 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 хитинолитических ферментов (хитиназы, протеазы), способных разрушать клеточные стенки и лизировать гифы грибов [Стимулирующие рост растений бактерии...., 2015].

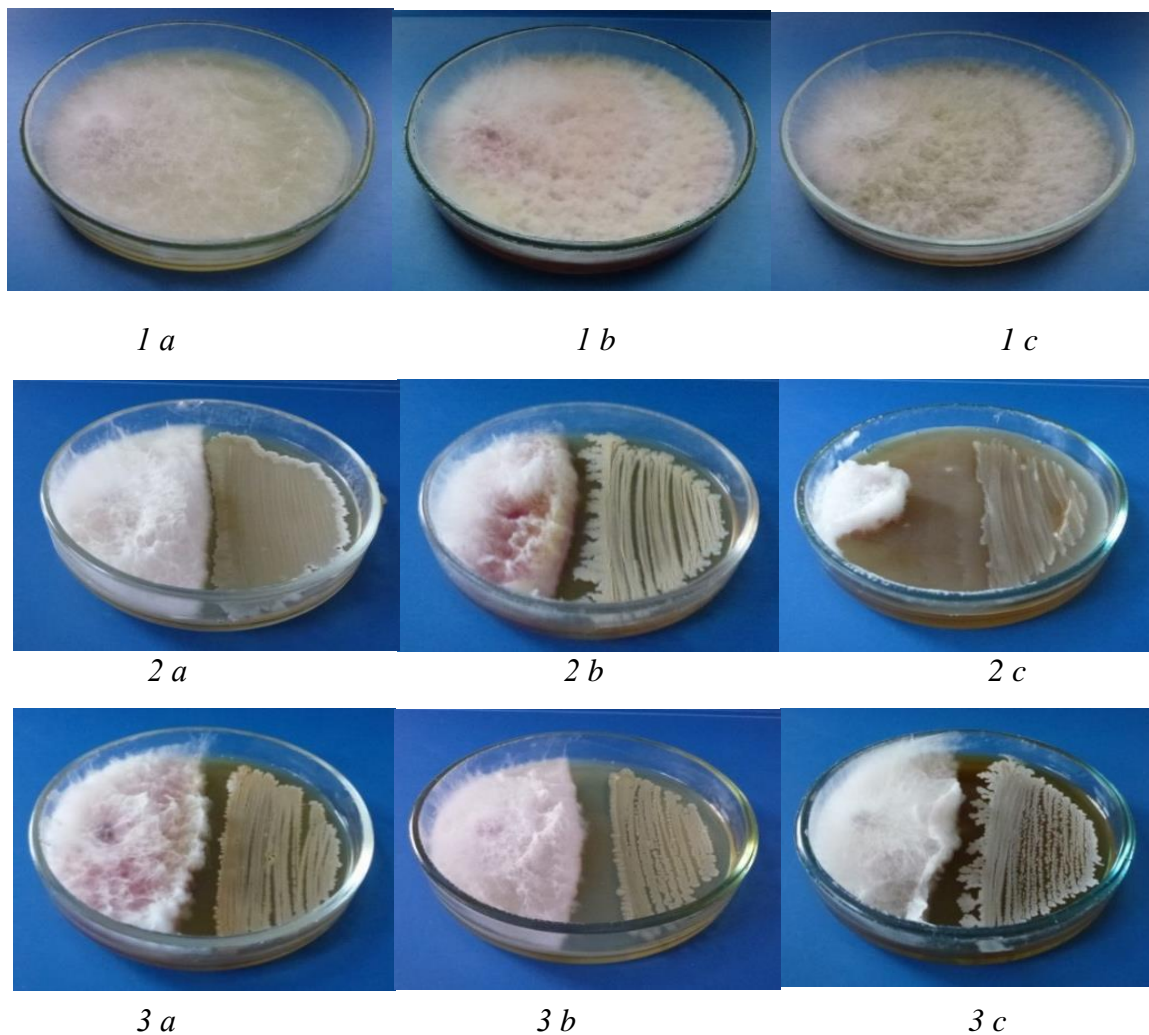


Рисунок 16 – Антифунгальная активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. graminearum* BZR F-4 на различных питательных средах (ориг.)

a – KB; *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.

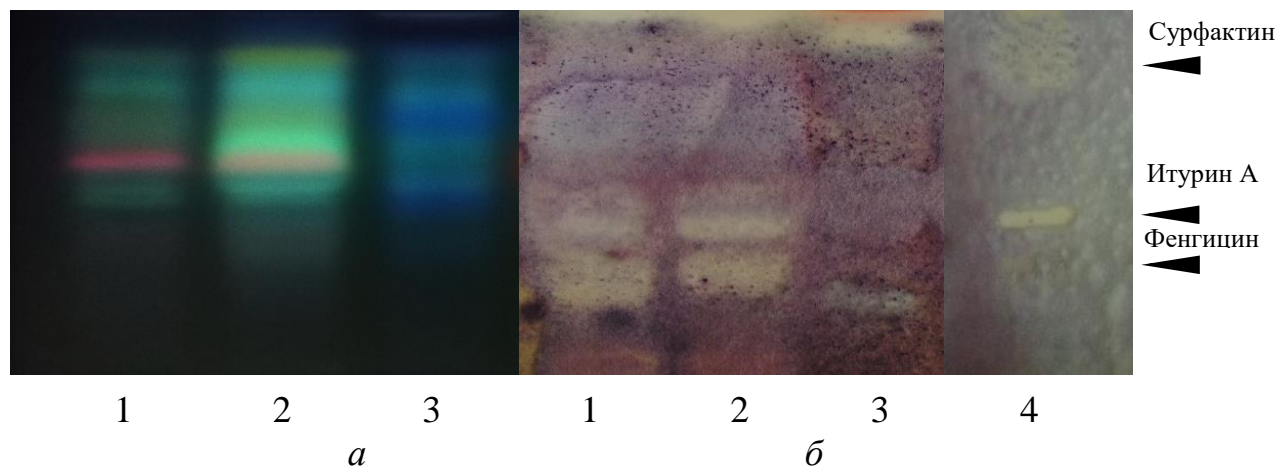


Рисунок 17 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 336g (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

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.

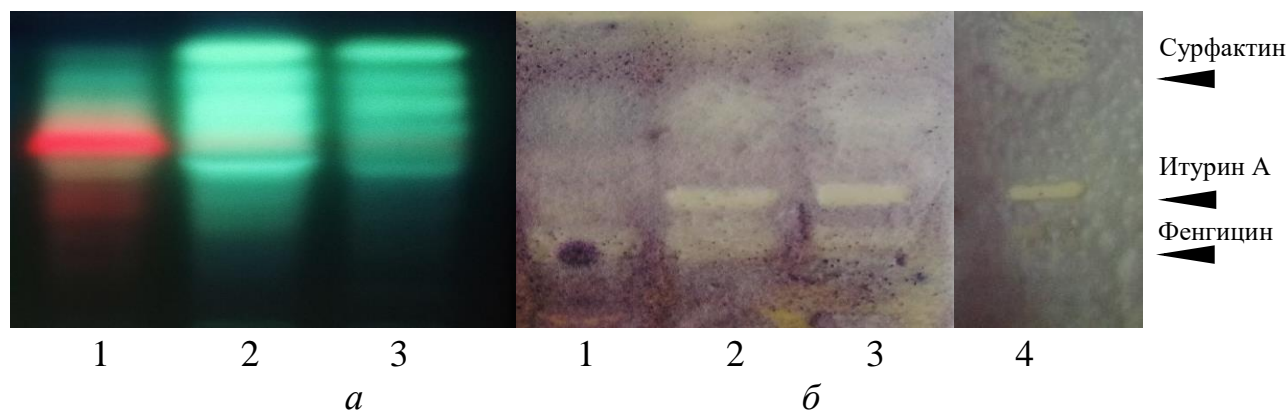


Рисунок 18 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F-6) (ориг.)

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 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 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 применения препарата, обеспечить равномерное распределение пестицида по обрабатываемой поверхности, продлить сроки его действия [Новикова И. И., 2019]. Наибольшее распространение на современном рынке биопрепаратов получила жидкая форма, представляющая собой ЖК с клетками агента установленного титра. Такая форма наименее трудо- и энергозатратна [Леконцева Т. А., Лыбенко Е. С., 2021].

Лабораторные образцы биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 представляют собой ЖК, 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).

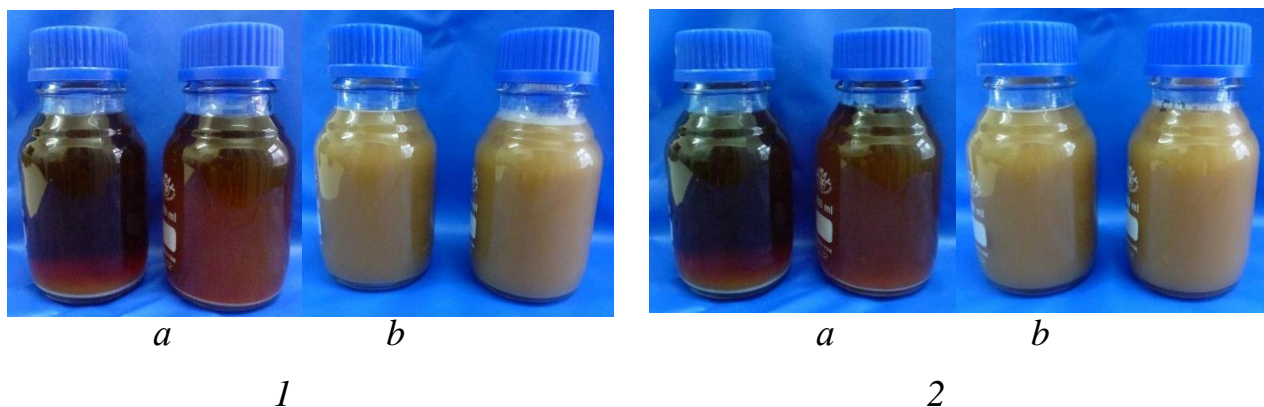


Рисунок 19 – Лабораторные образцы биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 (ориг.)

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.

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

Многими авторами отмечено положительное влияние предпосевной обработки семян препаратами на основе бактерий рода *Bacillus* [Seed biopriming with plant growth...., 2016; Effect of seed bacterization...., 2019]. Мы провели оценку лабораторных образцов биопрепаратов, полученных на стандартных средах и ОПС, на фоне искусственного заражения *F. graminearum* BZR F-4 в условиях климатической камеры, на растениях пшеницы озимой сорт Батко (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-антагонистов, полученных с применением различных питательных сред, на фоне искусственного заражения растений пшеницы озимой грибом *F. graminearum* BZR F-4, климатическая камера, сорт Батько, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2014 г.

Вариант, норма применения, л/т	Всхожесть, %	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, 1,0	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. 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 А.М., и др., 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 [Эффективность применения новых биопрепаратов..., 2016] (таблица 15, рисунок 20). 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 [Стимулирующие рост растений бактерии..., 2015].

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,-ФГБНУ ФНЦБЗР, 2014 г.

Вариант, норма применения, л/т	увеличение массы побега, %	увеличение массы корня, %	увеличение длины побега, %	увеличение длины корня, %
Кинто Дуо, КС, химический эталон, 2,5	0 ^a	15,5 ^a	0 ^a	20,8 ^{ab}
Фитоспорин-М, Ж, биологический эталон, 1,0	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				

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

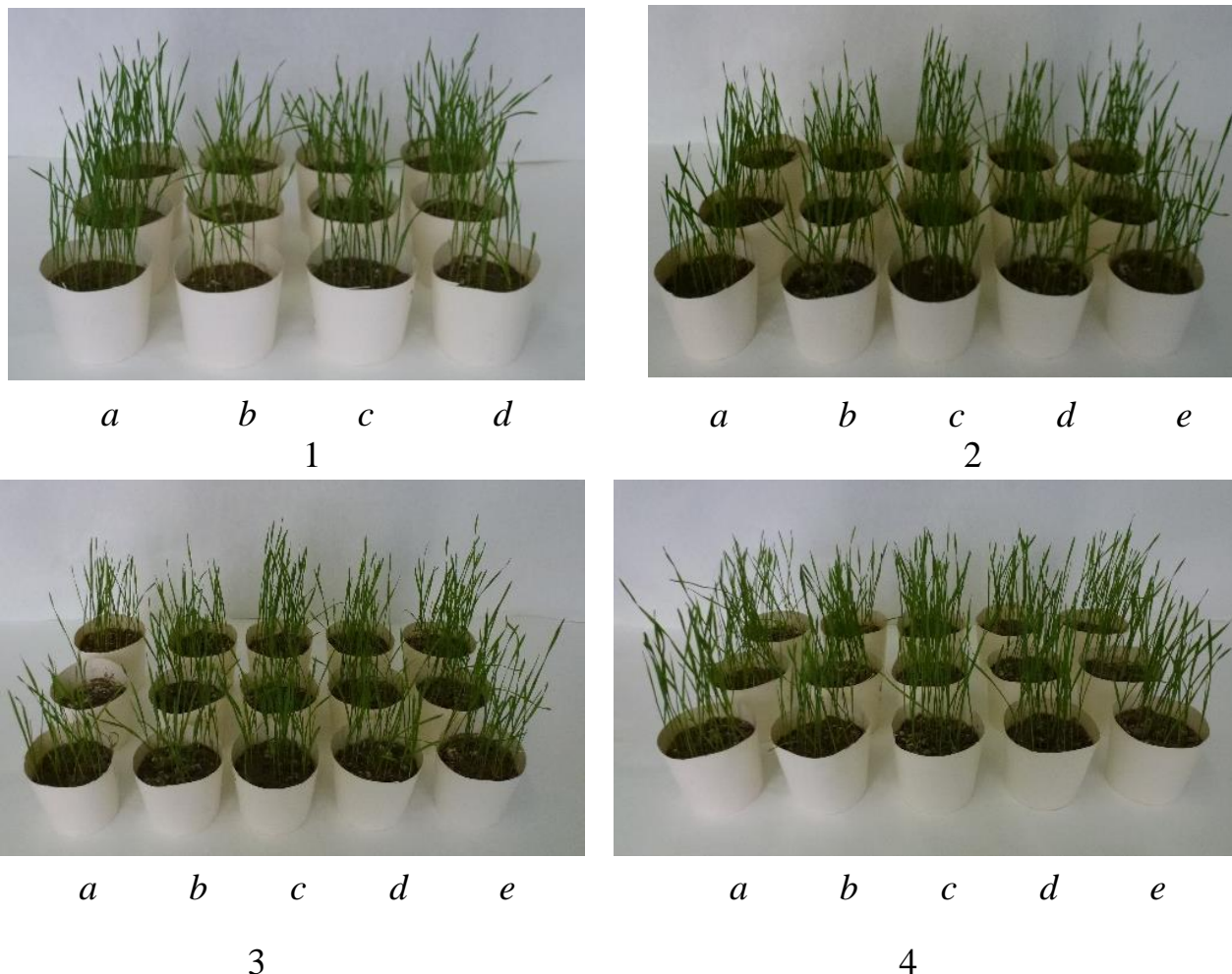


Рисунок 20 – Влияние ЖК штаммов на рост и развитие растений пшеницы озимой на фоне искусственного заражения грибом *F. graminearum* BZR F-4 с применением различных питательных сред (ориг.)

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 (3,0 л/т + 2,0 л/т); d – *B. subtilis* BZR 336g + *B. subtilis* BZR 517 (2,0 л/т + 1,0 л/т); e – *B. subtilis* BZR 336g + *B. subtilis* BZR 517 (1,0 л/т + 1,0 л/т)

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 КОЕ 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.

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

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

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 В).

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 (RCAM) от 5 декабря 2012 г. Штамм депонирован под регистрационным номером RCAM01729;

- 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 Г).

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

- справка о депонировании культуры микроорганизмов в ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии (RCAM) от 5 декабря 2012 г. Штамм депонирован под регистрационным номером RCAM01728;

- 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 Г).

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

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): МПА – 41,5, вода дистиллированная – 1000.

Для получения комплексных бактериальных биопрепаратов на основе *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 используют оригинальную ОПС следующего состава: хлористый калий, магний сернокислый, 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 ОПС 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 ОПС 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 Е).

Полученные экспериментальные данные в рамках лабораторных регламентов и ТУ прошли апробацию в ООО «Биотехагро» и предложены для промышленного производства (Приложение Ж). Кроме того, полученные результаты внедрены в учебный процесс ФГБНУ ФНЦБЗР 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» (Приложение И). 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.

3.6 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 2012 по 2015 гг. на экспериментальной базе ФГБНУ ФНЦБЗР. Для закладки опыта была использована мягкая пшеница озимая сорта Калым.

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 21).

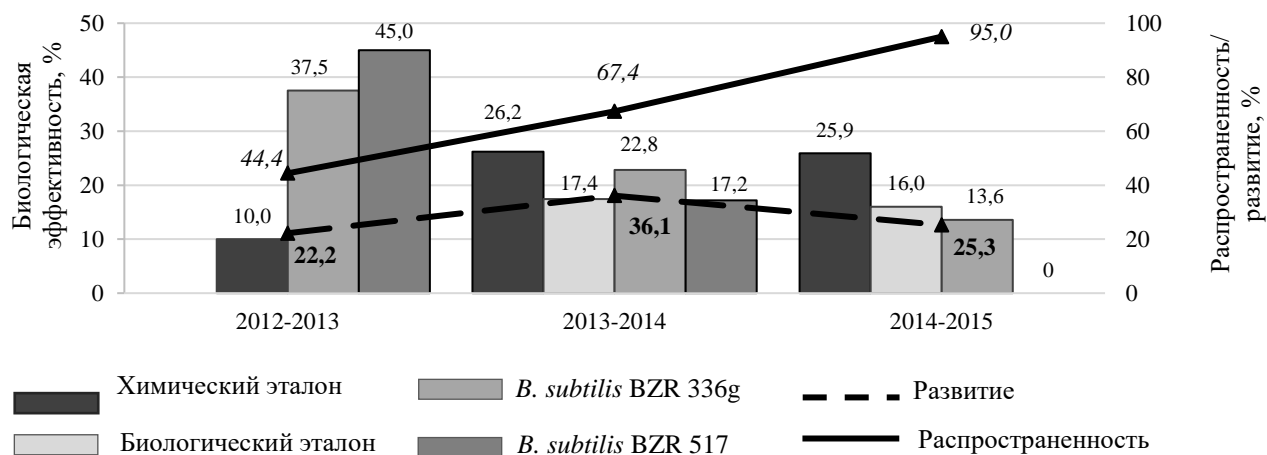


Рисунок 21 – Биологическая эффективность лабораторных образцов биопрепаратов против фузариозных корневых гнилей пшеницы озимой в условиях полевого мелкоделяночного опыта, сорт Калым, ФГБНУ ФНЦБЗР 2012-2015 гг.

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 [Evaluation of *Bacillus velezensis*, 2022].

Таблица 16 – Хозяйственная эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на растениях пшеницы озимой в условиях полевого мелкоделяночного опыта, сорт Калым, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2012-2015 гг.

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

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

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.

3.7 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 22).

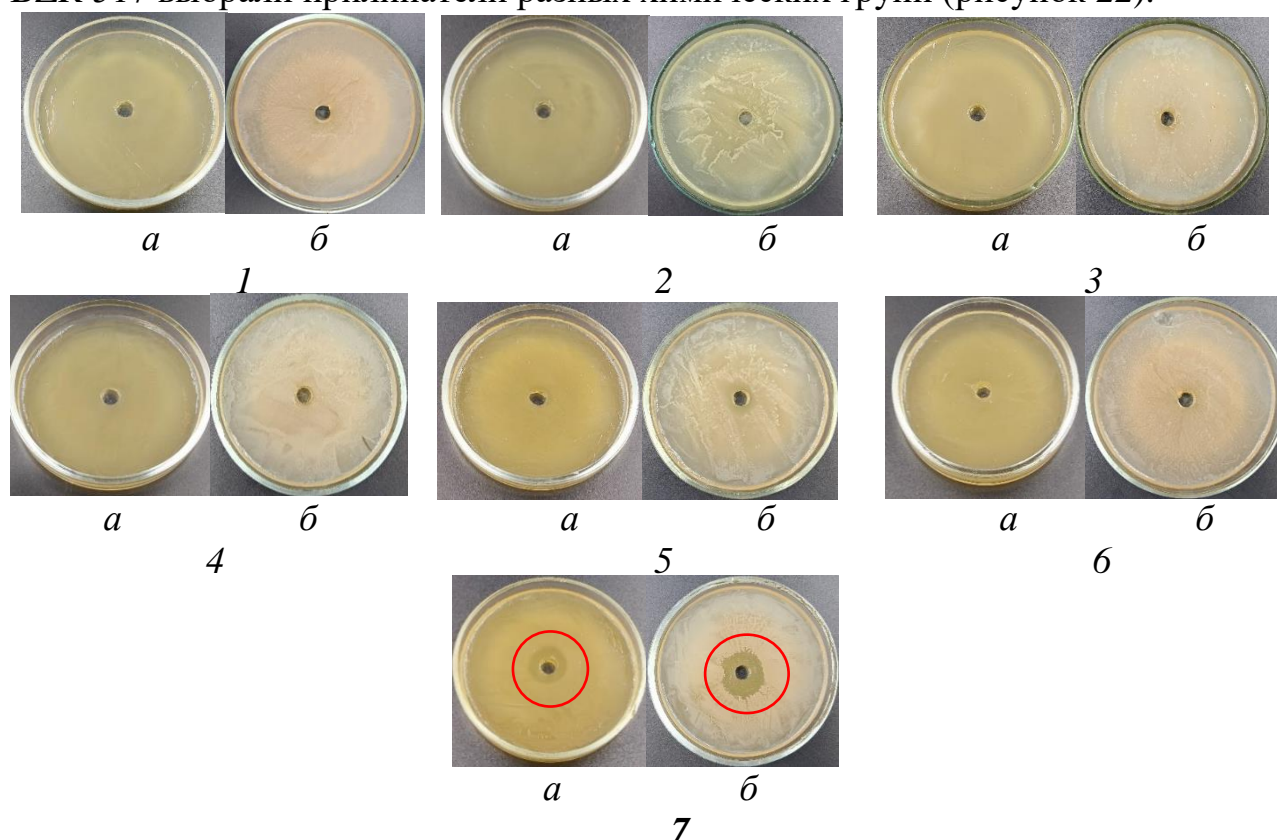


Рисунок 22 – Совместное культивирование штаммов-продуцентов лабораторных образцов *B. subtilis* BZR 336g (a) и *B. subtilis* BZR 517 (б) с прилипателями (ориг.): 1 – контроль, 2 – Адю, 3 – Липосам, 4 – Хайгер, 5 – Сильвет Голд, 6 – Полидон Бонд, 7 – Панэм

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 КОЕ 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 23). 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 КОЕ с $2,7 \times 10^8$ до $2,0-2,1 \times 10^8$ КОЕ/мл.

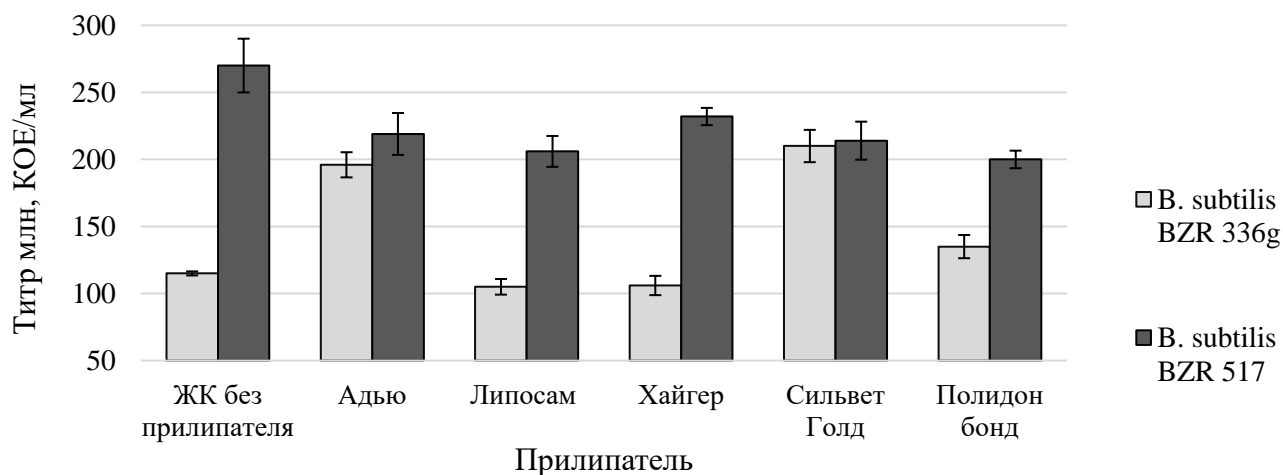


Рисунок 23 – Влияние прилипателей на КОЕ в одном мл лабораторного образца биопрепарата на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

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

Таблица 17 – Антифунгальная активность лабораторных образцов биопрепаратов в отношении *F. graminearum* BZR F-4 в зависимости от прилипателя, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2023 г.

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

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 Адью на пятые сутки инкубирования статистически значимо не отличалось от лабораторного образца – 76,3 %. Но к 10-м суткам антифунгальная активность в варианте с применением Адью начала снижаться и к 20-м суткам было отмечено отсутствие ингибирования мицелия патогена [Хомяк А. И., Жевнова Н. А., Асатунова А. М., 2023].

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 25).

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 E., 2018] (рисунок 24).

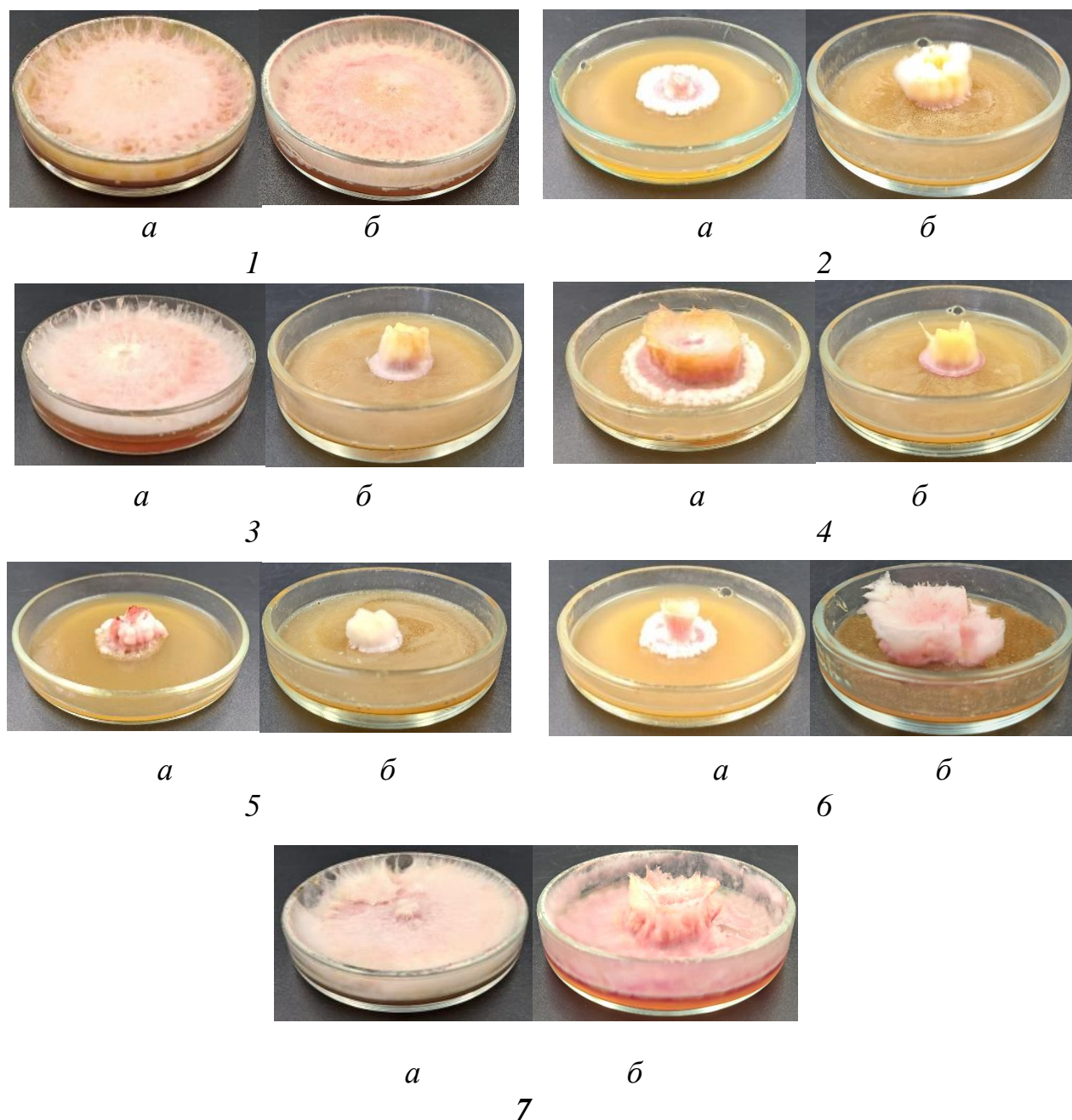


Рисунок 24 – Влияние прилипателей на антифунгальную активность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336 g (a) и *B. subtilis* BZR 517 (б) (ориг.)

1 – контроль, 2 – ЖК без прилипателя, 3 – Адьо, 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 25). 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 Адью 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.

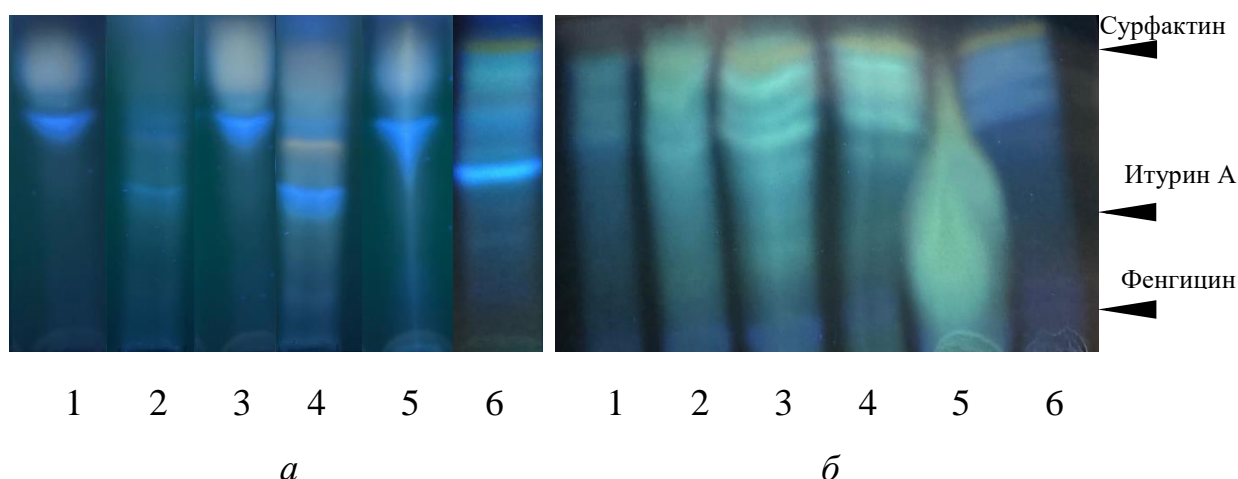


Рисунок 25 – Хроматограмма метаболитов лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g (а) и *B. subtilis* BZR 517 (б) с различными прилипателями в составе под ультрафиолетом 366 нм (ориг.)

1 – Хайгер, 2 – Адью, 3 – Полидон Бонд, 4 – Липосам, 5 – Сильвет голд, 6 – ЖК 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, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2023 г.

Вариант, норма применения, мл/га	Всхожесть, %	Биологическая эффективность, %*
ЖК <i>B. subtilis</i> BZR 336g + прилипатель		
Контроль без инфекции	100 ^c	-
Контроль с инфекцией*	62 ^a	58,9/100
Адью, Ж, 3	51,7 ^{ab}	0 ^a
Липосам, Г, 6	43,3 ^b	0 ^a
Хайгер, Ж, 4,5	53,3 ^{ab}	15,2 ^b
Сильвет Голд, Ж, 3	48,3 ^{ab}	13,5 ^b
Полидон Бонд, Ж, 4,5	53,3 ^{ab}	0 ^a
ЖК без прилипателя	63 ^a	15,3 ^b
ЖК <i>B. subtilis</i> BZR 517 + прилипатель		
Контроль без инфекции	84,4 ^a	-
Контроль с инфекцией	82,2 ^a	26,7/97
Адью, 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
ЖК 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 Адю, 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 [Подбор прилипателей для совместного применения...., 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, ФГБНУ ФНЦБЗР, 2023 г.

Вариант, норма применения, мл/га	увеличение массы побега, %	увеличение массы корня, %	увеличение длины побега, %	увеличение длины корня, %
ЖК <i>B. subtilis</i> BZR 336g + прилипате				
Адю, Ж, 3	0 ^a	0 ^a	8,5 ^{ab}	0 ^a
Липосам, Г, 6	30,4 ^{abc}	0 ^a	36,8 ^{bc}	16,3 ^a
Хайгер, Ж, 4,5	0 ^{ab}	0 ^a	0,3 ^a	7,3 ^a
Сильвет Голд, Ж, 3	0 ^a	0 ^a	0,3 ^a	5,9 ^a
Полидон Бонд, Ж, 4,5	37,6 ^{abc}	7,3 ^a	35,9 ^{bc}	40,6 ^a
ЖК без прилипателя *	0,0157 ^{abc}	0,0079 ^a	9,2 ^a	1,2 ^a
ЖК <i>B. subtilis</i> BZR 517 + прилипате				
Адю, Ж, 3	0 ^a	0 ^a	5 ^d	0,9 ^a
Липосам, Г, 6	0 ^a	0 ^a	0 ^{bc}	8,7 ^a
Хайгер, Ж, 4,5	0 ^a	0 ^a	0 ^{abc}	0 ^b
Сильвет Голд, Ж, 3	0 ^a	0 ^a	0 ^{ab}	0 ^b
Полидон Бонд, Ж, 4,5	0 ^a	0 ^a	0 ^a	4,8 ^a
ЖК 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 [Potential biocontrol agents for *Fusarium*..., 2016; Кабашникова Л. Ф., 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 Адю.

ЗАКЛЮЧЕНИЯ

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

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

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

4. Установлено, что предпосевная обработка семян и опрыскивание вегетирующих растений пшеницы озимой лабораторными образцами биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в условиях центральной зоны Краснодарского края обеспечили биологическую эффективность против корневой гнили фузариозной этиологии от 37,5 до 45,0 % на

фоне развития болезни 22,2 %, распространенности – 44,4 %, величина сохраненного урожая составила до 3,9 т/га.

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

СПИСОК 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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ рынка биопрепаратов для защиты растений и инокулянтов в 2024 году – Текст : электронный / Агентство промышленных и потребительских рынков. – URL: <https://aipr-rf.ru/list/udobreniya-mi5/?ysclid=lseaisaii5687495721>
2. Антифунгальная активность бактерий рода *Bacillus* по отношению к фитопатогену *Alternaria* sp / А. В. Малкова, А. Н. Иркитова, Д. Е. Дудник [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2021. – № 11(205). – С. 40-43. – DOI 10.53083/1996-4277-2021-205-11-40-43. – EDN CZTSVB.
3. Асатулова, А. М. Изучение кинетики роста штаммов бактерий-антагонистов возбудителей фузариоза при периодическом культивировании / А. М. Асатулова // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2008. – № 1(138). – С. 79-81. – EDN KLRVMD.
4. Ассоциированные с пшеницей микромицеты и их значимость как возбудителей болезней в России / Ф. Б. Ганнибал, Т. Ю. Гагкаева, М. М. Гомжина [и др.] // Вестник защиты растений. – 2022. – Т. 105, № 4. – С. 164-180. – DOI 10.31993/2308-6459-2022-105-4-15508. – EDN KLHPMB.
5. Астапчук, И. Л. Антифунгальная активность биологических препаратов по отношению к возбудителям корневой гнили и гнили сердцевинки плодов яблони из рода *Fusarium* Link / И. Л. Астапчук, Г. В. Якуба, А. И. Насонов // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2021. – № 71(5). – С. 219-233. – DOI 10.30679/2219-5335-2021-5-71-219-233. – EDN XZRAVR.
6. Ахмедова, Ф. Р. Изучение распространения пигментообразующих бактерий в различных субстратах / Ф. Р. Ахмедова, У. Д. Джафарова // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2012. – № 12. – С. 26-29. – EDN PVNКУZ.
7. Бактерии родов *Advenella*, *Bacillus* и *Pseudomonas* - перспективная основа биопрепаратов для растениеводства / Л. Ю. Кузьмина, Т. Н. Архипова, Г. Э. Актуганов [и др.] // Биомика. – 2018. – Т. 10, № 1. – С. 016-019. – EDN XRLWPB.

8. Белошапкина, О. О. Биопрепараты в защите садовых растений против фитопатогенных грибов / О. О. Белошапкина // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем, Краснодар, 20-22 сентября 2016 года / ФНБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений", Федеральное агентство научных организаций России, Российская академия наук, Российский фонд фундаментальных исследований, Министерство образования, науки и молодежной политики администрации Краснодарского края. Том Выпуск 9. – Краснодар: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений», 2016. – С. 533-537.

9. Биологическая защита растений : учеб. для студентов вузов по специальности 310400 "Защита растений" / [М. В. Штерншис и др.] ; под ред. М. В. Штерншис. – Москва : КолосС, 2004. – (Учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений). – ISBN 5-9532-0126-5. – EDN QKWKNJ.

10. Маслиенко, Л.В. Биологический метод защиты подсолнечника и других сельскохозяйственных культур от болезней / Л.В. Маслиенко //Агро XXI. – 1999. – № 8. – С. 9.

11. Биопрепараты для защиты растений: оценка качества и эффективности / О. М. Минаева, Е. Е. Акимова, Т. И. Зюбанова, Н. Н. Терещенко. – Томск : Национальный исследовательский Томский государственный университет, 2018. – 130 с. – ISBN 978-5-94621-751-4. – EDN YSROZF.

12. Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus* для управления здоровьем растений / М. В. Штерншис, А. А. Беляев, В. П. Цветкова [и др.]. – Новосибирск : Издательство Сибирского отделения РАН, 2016. – 233 с. – ISBN 978-5-7692-1496-7. – EDN XBZXBV.

13. Бурова, Ю. А. Получение бактериальной суспензии *Pseudomonas aureofaciens* 2006 на мелассе и изучение некоторых ее свойств / Ю. А. Бурова, С. А. Ибрагимова, В. В. Ревин // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012. – № 10(146). – С. 61-65. – EDN OHXDHP.

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 / О. И. Ванюшина // Актуальные вопросы развития современного общества : сборник научных статей 9-ой Международной научно-практической конференции, Курск, 11–12 апреля 2019 года. – Курск: Юго-Западный государственный университет, 2019. – С. 72-75. – EDN ZDSFNR.
16. Влияние ауксинпродуцирующих и фосфатмобилизующих бактерий на подвижность почвенного фосфора, скорость роста растений пшеницы и усвоение ими фосфора / Г. Р. Кудоярова, Л. Б. Высоцкая, Т. Н. Архипова [и др.] // Агрохимия. – 2016. – № 5. – С. 28-34. – EDN WBDYPI.
17. Влияние состава питательных сред на протеолитическую активность глубинных культур *Bacillus subtilis* ВКПМ и *Bacillus licheniformis* ВКПМ 2336 / М. Г. Щербаков, А. А. Ильязов, М. Ю. Шапошникова [и др.] // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2014. – № 1(49). – С. 36-39. – EDN SSXZFP.
18. Влияние температуры культивирования и активной кислотности соево-кукурузного субстрата на динамику роста бактерии *Bacillus subtilis* / В. С. Усанов, А. А. Пензин, В. В. Шишкин [и др.] // Дальневосточный аграрный вестник. – 2020. – № 3(55). – С. 117-124. – DOI 10.22450/1999-6837-2020-3-117-124. – EDN TDUUHG.
19. Выделение и характеристика антигрибных метаболитов штаммов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus subtilis* BZR 517 модифицированным методом биоавтографии / Т. М. Сидорова, А. М. Асатунова, А. И. Хомяк [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т. 54, № 1. – С. 178-185. – DOI 10.15389/agrobiology.2019.1.178rus. – EDN VWEHMZ.
20. Высоцкая, Е. А. Анализ технологических приемов и технических средств предпосевной обработки семян биопрепаратами / Е. А. Высоцкая, М. А. Кречотень // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2015. – № 4-2(47). – С. 100-104. – EDN VNTSTJ.

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

22. Гиченкова, О. Г. Влияние биопрепаратов на основе *Trichoderma* и *Bacillus subtilis* на продуктивность картофеля в условиях орошаемого земледелия Волгоградской области / О. Г. Гиченкова, Ю. А. Лаптина // Аграрная Россия. – 2023. – № 7. – С. 17-23. – DOI 10.30906/1999-5636-2023-7-17-23. – EDN BBINIB.

23. Гордеева, Ю. Л. Алгоритмы расчета показателей процесса микробиологического синтеза в периодических условиях культивирования / Ю. Л. Гордеева, Ю. А. Ивашкин, Л. С. Гордеев // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Управление, вычислительная техника и информатика. – 2011. – № 2. – С. 7-14. – EDN NWDPWT.

24. ГОСТ 13586.5-2015. Зерно. Метод определения влажности = Grain. Method of moisture content determination : межгосударственный стандарт : издание официальное : принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 августа 2015 г. N 79-П) : дата введения 2016-07-01 / разработан Федеральным государственным бюджетным научным учреждением "Всероссийский научно-исследовательский институт зерна и продуктов его переработки" (ФГБНУ "ВНИИЗ"). – М.: Стандартинформ. 2019. – 12 с.

25. ГОСТ 2.114-95. Единая система конструкторской документации. Технические условия : межгосударственный стандарт : издание официальное : принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 7 от 26 апреля 1995 г.) : дата введения 1996-07-01 / разработан Всероссийским научно-исследовательским институтом стандартизации и сертификации в машиностроении (ВНИИНМАШ) Госстандарта России. –

Минск.: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2008. – 16 с.

26. ГОСТ Р 54763-2011 Средства лекарственные для ветеринарии. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения : национальный стандарт: издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. № 1391-ст. – М.: Стандартинформ. 2013. – 45 с.

27. ГОСТ 12042-80 Семена сельскохозяйственных культур методы определения массы 1000 семян. – Введ. 1981-07-01. – М.: Стандартинформ. 2006. – 10 с.

28. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Ч.1. М.: Министерство сельского хозяйства. 2025. 957 с.

29. Догадина, М. А. Вызовы и тренды рынка биопестицидов / М. А. Догадина, А. И. Правдюк, Е. И. Криворотова // Вестник аграрной науки. – 2024. – № 2(107). – С. 40-48. – DOI 10.17238/issn2587-666X.2024.2.40. – EDN EYINVB.

30. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта: (с основами статистической обработки результатов исследований): учебник для студентов высших сельскохозяйственных учебных заведений по агрономическим специальностям. Изд. 6-е, стер., перепеч. с 5-го изд. 1985 г. Москва: Изд-во Альянс, 2011. ISBN 978-5-903034-96-3.

31. Дрегваль, О. А. Подбор оптимальных режимов кислотности среды и аэрации при глубинном культивировании *Bacillus thuringiensis* и *Beauveria bassiana* / О. А. Дрегваль, Н. В. Черевач, А. И. Винников // Вестник Днепропетровского университета. Биология, экология. – 2010. – № 18-1. – С. 15-19. – EDN PXZGHN.

32. 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.

33. Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках : учеб. для студентов вузов, обучающихся по направлению 510600 "Биология", специальностям 011699 "Биология", 012300 "Биохимия, 012400 "Микробиология" / Н. С. Егоров ; Н. С. Егоров. – 6-е изд., перераб. и доп. – Москва : Изд-во Моск. ун-та, 2004. – (Классический университетский учебник / Моск. ун-т им. М. В. Ломоносова). – ISBN 5-211-04669-2. – EDN QKNBWR.

34. Емельяненко, В. А. Зависимость жизнедеятельности бифидобактерий от кислотности среды культивирования / В. А. Емельяненко, А. М. Королук // Наука и современность. – 2010. – № 2-1. – С. 23-28. – EDN RSLKWB.

35. Захарова, Л. М. Биофунгицид Витаплан на посевах льна / Л. М. Захарова, Н. А. Кудрявцев // Защита и карантин растений. – 2015. – № 4. – С. 26-28. – EDN TOMDCJ.

36. Зимина, М. И. Исследование процесса синтеза бактериоцинов / М. И. Зимина, А. Ф. Газиева // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2017. – № 3-1. – С. 27-30. – EDN XWNIMB.

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

38. Кабашникова, Л. Ф. Прайминг защитных реакций в растениях при патогенезе: приобретенный иммунитет / Л. Ф. Кабашникова // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. – 2020. – № 4. – С. 19-29. – DOI 10.46646/2521-683X/2020-4-19-29. – EDN VFFLSM.

39. Кинетические параметры роста бактерий, ассоциированных с подземными органами *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo (Orchidaceae) / Н. В. Шеховцова, К. А. Первушина, О. А. Маракаев [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 3-3. – С. 542-544. – EDN PAZBTJ.

40. Кириченко, К.С. Почвы Краснодарского края / К.С. Кириченко. - Краснодар: Крайгосиздат, 1953. – 236 с.

41. Козлова, А. С. Оценка биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* в отношении грибных болезней смородины / А. С. Козлова, Т. В. Шпатова, М. В. Штерншис // Теория и практика современной аграрной науки : Сборник IV национальной (всероссийской) научной конференции с международным участием, Новосибирск, 26 февраля 2021 года / Новосибирский государственный аграрный университет. – Новосибирск: Издательский центр Новосибирского государственного аграрного университета "Золотой колос", 2021. – С. 115-118. – EDN PIYDUF.

42. Коноваленко, Л. Ю. Биологические средства защиты растений для органического земледелия / Л. Ю. Коноваленко // Итоги и перспективы развития агропромышленного комплекса : Сборник материалов Международной научно-практической конференции, с. Соленое Займище, 18–19 июля 2018 года / Составители Н.А. Щербакова, А.П. Селиверстова. – Соленое Займище: Прикаспийский научно-исследовательский институт аридного земледелия, 2018. – С. 26-36. – EDN YRDYUP.

43. Костерина, Н. А. Анализ современного состояния проблемы фузариоза колоса и зерна пшеницы в Российской Федерации / Н. А. Костерина // Аграрный вестник Урала. – 2023. – Т. 23, № 5. – С. 49-60. – DOI 10.32417/1997-4868-2023-234-05-49-60. – EDN LQLAOZ.

44. Лабораторный практикум по общей микробиологии / Н. Б. Градова, Е. С. Бабусенко, И. Б. Горнова, Н. А. Гусарова. – Москва : Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, 1999. – 130 с. – EDN VTCNJZ.

45. Леконцева, Т. А. Лыбенко Е. С. Использование биопрепаратов на льне-долгунце / Т. А. Леконцева, Е. С. Лыбенко // Вестник Вятского ГАТУ. – 2021. – №. 4. – С. 10.

46. Леонтьева, Т. Н. Оптимизация состава питательной среды для производства биоудобрения "Азолен" / Т. Н. Леонтьева, Е. В. Кузина, О. Н. Логинов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2013. – № 3. – С. 49-52. – EDN RDIKKL.

47. Лысак, Л. В. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий : Учеб. пособие для студентов вузов, специализирующихся в обл. почв. биологии, микробиологии, почвоведения, экологии по специальности 01.30.00 "Почвоведение" / Л. В. Лысак, И. Н. Скворцова, Т. Г. Добровольская ; Л. В. Лысак, Т. Г. Добровольская, И. Н. Скворцова ; Моск. гос. ун-т им. М. В. Ломоносова. – Москва : МАКС пресс, 2003. – 120 с. – ISBN 5-317-00902-2. – EDN QKVXAJ.

48. Майоров, А. А. Анализ параметров существования и размножения микроорганизмов / А. А. Майоров // Техника и технология пищевых производств. – 2012. – № 3(26). – С. 57-61. – EDN TFRXYB.

49. Маслова, М. В. Эффективность биопрепаратов ризоплан и алирин-б в борьбе с грибными патогенами перца сладкого / М. В. Маслова, Е. В. Грошева // Наука и Образование. – 2020. – Т. 3, № 4. – С. 293. – EDN HDSPEM.

50. 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 / Е. В. Матвиенко // Ученые записки Тамбовского отделения РоСМУ. – 2015. – № 3. – С. 162-166. – EDN TIQAON.

51. Мезюха, А. Н. Биопрепараты и проблемы их использования в сельском хозяйстве (аналитический обзор) / А. Н. Мезюха, А. С. Гайзатулин, С. Н. Ященко // Успехи молодежной науки в агропромышленном комплексе : Сборник трудов LVII Студенческой научно-практической конференции, Тюмень, 30 ноября 2022 года. – Тюмень: Государственный аграрный университет Северного Зауралья, 2022. – С. 98-107. – EDN VABENZ.

52. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации российская академия сельскохозяйственных наук государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений. – Санкт-Петербург : Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений РАСХН, 2009. – 379 с. – EDN WERHOZ.

53. Мосичев, М.С. Общая технология микробиологических производств / М.С. Мосичев, А.А. Складнев, В.Б. Котов – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 264 с.
54. Мулюкин, А.Л. Образование покоящихся форм *Bacillus cereus* и *Micrococcus luteus* / А.Л. Мулюкин, К.А. Луста, М.Н. Грязнова // Микробиология. – 2006. – № 6. – С. 782-789.
55. Наумов, Т. Н. Анализ эффективности применения биологических пестицидов в возделывании гороха (*Pisum sativum* L.) / Т. Н. Наумов // Агроэкологические аспекты устойчивого развития АПК : Материалы XVIII международной научной конференции, Брянск, 24–25 мая 2021 года. Том Часть IV. – Брянск: Брянский государственный аграрный университет, 2021. – С. 77-82. – EDN GTKTEN.
56. Новая форма биопрепаратов – микроконтейнеры из полимерного биоразлагаемого материала / Н. С. Жемчужина, А. О. Фокин, С. А. Елизарова [и др.] // Лаборатория и производство. – 2018. – № 1(1). – С. 138-141. – EDN VSMOZE.
57. Новикова, И. И. Полифункциональные биопрепараты для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем в биологическом земледелии / И. И. Новикова // АгроЭкоИнженерия. – 2019. – №2 (99). – С. 183-194.
58. Обухова, Е. С. Физиологическая характеристика ахромо-генных видов рода *Pseudomonas* в условиях динамики термического режима культивирования / Е. С. Обухова, Н. А. Сидорова // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. – 2013. – № 6(135). – С. 19-21. – EDN RCFYWT.
59. Оптимизация бактериальных питательных сред экстрактом *Ungernia victoris* / Т. П. Перерва, А. Ю. Мирюта, А. С. Дворник [и др.] // Биотехнология. – 2011. – Т. 4, № 4. – С. 059-063. – EDN PWMDCF.
60. Оптимизация производства липопептидов, синтезируемых *Bacillus amyloliquefaciens* B15, методом анализа на поверхности отклика / Фань С., Чжу Х., Го Д. [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 1(29). – С. 51-58. – EDN UCTCRT.

61. Оптимизация состава среды для культивирования штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из донных отложений пресноводных водоемов / Д. С. Борисовец, Е. С. Журавлева, Т. А. Зуйкевич [и др.] // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2020. – № 2. – С. 3-12. – EDN ZKAUHI.

62. Павлюшин, В. А. Микробиологическая защита растений в технологиях фитосанитарной оптимизации агроэкосистем: теория и практика (обзор) / В. А. Павлюшин, И. И. Новикова, И. В. Бойкова // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55, № 3. – С. 421-438. – DOI 10.15389/agrobiology.2020.3.421rus. – EDN FEAOFР.

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

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

65. Подбор прилипателей для совместного применения с лабораторным образцом биопрепарата в сельском хозяйстве / А. И. Хомяк, Н. А. Жевнова, В. В. Аллахвердян [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2023. – Т. 37, № 8. – С. 53-58. – DOI 10.53859/02352451_2023_37_8_53. – EDN JFQSZG.

66. Потапенко, Д. Ю. Значение биологических препаратов при возделывании сельскохозяйственных культур / Д. Ю. Потапенко, В. В. Рзаева // Достижения молодежной науки для агропромышленного комплекса : Сборник трудов LVII научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных, Тюмень, 27 февраля – 03 2023 года. Том Часть 6. – Тюмень: Государственный аграрный университет Северного Зауралья, 2023. – С. 80-82. – EDN FOQISD.

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

68. Применение бактериальных термостабильных липолитических ферментов в современных биотехнологических процессах: обзор / Ю. В. Самойлова, К. Н. Сорокина, А. В. Пилигаев [и др.] // Катализ в промышленности. – 2018. – № 6. – С. 61-73. – DOI 10.18412/1816-0387-2018-6-61-73. – EDN HVNZID.

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

70. Разработка и изучение влияния состава питательной среды и условий культивирования *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* на биосинтез белка 6-эндотоксина / И. Е. Парамонова, Н. И. Некрасова, К. С. Хамзина [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 4. – С. 20-24. – EDN VOMQQZ.

71. Резанова, Г. И. Роль биопрепаратов при возделывании озимой пшеницы / Г. И. Резанова // Научно-агрономический журнал. – 2013. – № 1(92). – С. 20-22. – EDN WEBGID.

72. Рогожникова, Е. С. Эффективность применения биофунгицида Витаплан на яровом ячмене в условиях северо-запада Нечерноземной зоны / Е. С. Рогожникова, А. М. Шпанев // Вестник защиты растений. – 2016. – № 3(89). – С. 140-142. – EDN WYRDUD.

73. Российский рынок биологических средств защиты растений / статья подготовлена Research Techart. – Текст : электронный // Современный фермер – 2014. – № 6-7. – URL: <http://techart.ru/files/publications/publication-674.pdf>.

74. Рост и развитие продуцента бактокулицида в зависимости от pH среды / А. И. Осадчая, В. С. Подгорский, С. Ф. Прокопченко [и др.] // Микробиол. журн. – 1990. – Т. 52, № 1. – С. 24-27. EDN: YXCXUN

75. Рубанов, Н. И. Рынок биопродуктов в растениеводстве / Н. И. Рубанов, А. А. Фомин // Московский экономический журнал. – 2018. – № 3. – С. 2. – EDN YHKJYD.

76. Рябчинская, Т. А. Средства, регулирующие рост и развитие растений, в агротехнологиях современного растениеводства / Т. А. Рябчинская, Т. В. Зимина

// Агрохимия. – 2017. – № 12. – С. 62-92. – DOI 10.7868/S0002188117120092. – EDN ZUCFVV.

77. Саубенова, М. Г. Влияние состава среды на антагонистическую активность молочнокислых микроорганизмов / М. Г. Саубенова, Е. А. Олейникова // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. с № 3. – С. 83-86. – EDN VLMFJV.

78. Сафроновская, Г. Биопестициды – перспективный сегмент рынка средств защиты растений / Г. Сафроновская // Наше сельское хозяйство. – 2021. – № 1(249). – С. 28-35. – EDN OKXYHL.

79. Сираева, З. Ю. Технология получения и оценка стабильности при хранении жидкой препаративной формы биофунгицида Бацизулин / З. Ю. Сираева, Н. Г. Захарова, О. Н. Ильинская // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2010. – Т. 152, № 4. – С. 169-178. – EDN NDLDDB.

80. Скворцова, И. Н. Методы идентификации и выделения почвенных бактерий рода *Pseudomonas* / И. Н. Скворцова – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981. – 78 с.

81. 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.

82. Соболева, О. М. Роль ризосферных бактерий в повышении экологизации агроценозов / О. М. Соболева // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32, № 5. – С. 19-22. – DOI 10.24411/0235-2451-2018-10504. – EDN XROGWT.

83. Соколова, Г. Д. Антагонисты фитопатогенного гриба *Fusarium graminearum* / Г. Д. Соколова, А. П. Глинушкин // Микология и фитопатология. – 2017. – Т. 51, № 4. – С. 191-201. – EDN ZCPZJD.

84. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам / И. В. Максимов, С. В. Веселова, Т. В. Нужная [и др.] // Физиология растений. – 2015. – Т. 62, № 6. – С. 763-775. – DOI 10.7868/S0015330315060111. – EDN UIMFKT.

85. Структурно-функциональные характеристики гуминовых кислот почвы Краснодарского края / В. Г. Лобанов, А. В. Александрова, К. Н. Шурай [и др.] // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – № 109. – С. 1016-1025. – EDN TWGNNV.

86. Табакова, И. Д. Сравнительная оценка действия фунгицидов химической и биологической природы на выход и качество ягод *Fragaria ananassa* / И. Д. Табакова, О. В. Чухина // Вестник Северного (Арктического) федерального университета. Серия: Естественные науки. – 2015. – № 1. – С. 95-101. – EDN TMKSDR.

87. Танделова, А. В. Биологическая эффективность применения фунгицидов против болезней груши / А. В. Танделова // Научные труды студентов Горского государственного аграрного университета "Студенческая наука - агропромышленному комплексу" : Научные труды студентов Горского государственного аграрного университета, Владикавказ, 04–05 апреля 2019 года. Том 56/3. – Владикавказ: Горский государственный аграрный университет, 2019. – С. 116-117. – EDN TLFILX.

88. Темралеева, А. Д. Современные биотехнологии в растениеводстве: достижения и тренды развития / А.Д. Темралеева // *Biologia et Biotechnologia*. – 2024. – №. 1. – Р. 3-21. – DOI 10.61847/pbcras.bbt.2024.1.1.. – EDN ASEVGO.

89. Терентьев, С. Е. Развитие органического сельского хозяйства в Российской Федерации / С. Е. Терентьев, А. Е. Ковалева // Научное обеспечение устойчивого развития агропромышленного комплекса горных и предгорных территорий : Материалы Международной научно-практической конференции, посвящённой 100-летию Горского ГАУ, Владикавказ, 29–30 ноября 2018 года. Том 2. – Владикавказ: Горский государственный аграрный университет, 2018. – С. 161-164. – EDN YRKNXN.

90. 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. – EDN XXPNML.

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

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

93. Холод, Н. А. Оптимизация применения микробиологических препаратов для управления патосистемами в агроценозе земляники / Н. А. Холод // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2014. – № 29(5). – С. 126-137. – EDN SMGFTJ.

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

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

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

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

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

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

100. Хужаназарова, М. К. Технология получения биопрепарата на основе ризобактерий, иммобилизированных флокулянтот Гипан / М. К. Хужаназарова, С. С. Муродова // Научное обозрение. Биологические науки. – 2022. – № 3. – С. 34-38. – DOI 10.17513/srbs.1281. – EDN NBEZDY.

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

102. Чеботарь, В. К. Эффективность применения биопрепарата Экстрасол / В. К. Чеботарь, А. А. Завалин, Е. И. Кипрушкина ; Российская академия сельскохозяйственных наук, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Всероссийский научно-исследовательский институт агрохимии им. Д. Н. Прянишникова, Санкт-Петербургский государственный университет низкотемпературных технологий Минобрнауки России. – Москва : Всероссийский научно-исследовательский институт агрохимии им. Д.Н. Прянишникова, 2007. – 216 с. – ISBN 5-9238-0067-5. – EDN QKQCUP.

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

104. Черников, И. А. Эффективность биофунгицида Бактофит, СП на картофеле на разных агрохимических фонах / И. А. Черников // 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 Константина Каэтановича Гедройца (ВНИИА), Москва, 28 ноября 2022 года / Под редакцией А.А. Завалина. – Москва: Всероссийский научно-исследовательский институт агрохимии имени Д.Н. Прянишникова, 2023. – С. 169-174. – EDN AQJHAV.

105. Четвериков, С. П. Оптимизация состава питательной среды для промышленного производства биопрепарата «Елена» / С. П. Четвериков, Е. А. Асабина, О. Н. Логинов // Башкирский химический журнал. – 2006. – Т. 13, № 2. – С. 10-13. – EDN KTWAOТ.

106. Штаммы бактерий из Биоресурсной коллекции ФГБНУ ФНЦБЗР, обладающие ростстимулирующей активностью в отношении растений озимой пшеницы / А. М. Асатулова, Н. С. Томашевич, В. М. Дубяга [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2023. – Т. 37, № 5. – С. 21-27. – DOI 10.53859/02352451_2023_37_5_21. – EDN FFARVO.

107. Эндوفитные бактерии как агенты для биопестицидов нового поколения (обзор) / И. В. Максимов, Т. И. Максимова, Е. Р. Сарварова, [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54, № 2. – С. 134-148. – DOI 10.7868/S0555109918020034. – EDN YTPPOJ.

108. Эффективность биопестицидов и регуляторов роста растений в защите пшеницы от болезней / С. С. Санин, Л. Н. Назарова, Н. П. Неклеса [и др.] // Защита и карантин растений. – 2012. – № 3. – С. 16-18. – EDN OXRQFJ.

109. Эффективность инокуляции семян озимой пшеницы бактериями рода *Bacillus*, перспективными для создания биопрепаратов / А. М. Асатунова, Н. А. Жевнова, М. Д. Павлова [и др.] // Зерновое хозяйство России. – 2019. – № 2(62). – С. 8-12. – DOI 10.31367/2079-8725-2019-62-2-8-12. – EDN ZHCVSX.

110. Эффективность использования биопрепаратов при возделывании озимой пшеницы / О. И. Власова, Е. А. Данилец, В. М. Передериева [и др.] // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2019. – № 149. – С. 23-30. – DOI 10.21515/1990-4665-149-011. – EDN TKJXJA.

111. Эффективность применения новых биопрепаратов на основе штаммов бактерий *Bacillus subtilis* против фузариоза озимой пшеницы на фоне искусственного заражения / А. М. Асатунова, Н. А. Жевнова, А. И. Хомяк [и др.] // Наука Кубани. – 2016. – № 1. – С. 9-14. – EDN WLFXCV.

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

113. A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus euthrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent phas / T. Volova, E. Kiselev, O. Vinogradova [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – V. 9. – № 2. – 15 p.

114. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization of *Bacillus subtilis* N11 / N. Zhang, K. Wu, X. He [et al.] // Plant Soil. – 2011. – V. 344 – P. 97.

115. Abushady, H. M. Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production / H. M. Abushady, A. S. Bashandy, H. M. M. Ibrahim // International Journal Of Agriculture & Biology. – 2005. – Vol. 7(3.) – P. 337-344.

116. ANN and RSM based modelling for optimization of cell dry mass of *Bacillus* sp. strain B67 and its antifungal activity against *Botrytis cinerea* / J. Shafi, Z. Sun, M. Ji

[et al.] // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. – 2018. – Vol. 32. – № 1. – P. 58-68. – DOI: 10.1080/13102818.2017.1379359.

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

118. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea* / L. Toral, M. Rodríguez, V. Béjar [et al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – № 9. – P. 1315. – DOI: 10.3389/fmicb.2018.01315.

119. Antifungal and antibacterial properties of surfactin isolated from *Bacillus subtilis* growing on molasses / G. A. Plaza, A. Turek, E. Król [et al.] // *African Journal of Microbiology Research*. – 2013. – V. 7(25). – P. 3165-3170.

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

121. Atanasova-Pancevska, N. Isolation, characterization and formulation of antagonistic bacteria against fungal plant pathogens / N. Atanasova-Pancevska, D. Kungulovski // *AGROFOR*. – 2018. – № 3(3). – P. 80-89. – DOI: <https://doi.org/10.7251/AGRENG1803080A>.

122. *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations / R. O. Penha, L. P. S. Vandenberghe, V. T. Soccol [et al.] // *Planta*. – 2020. – Vol. 251, No. 3. – P. 70. – DOI: 10.1007/s00425-020-03357-7. – EDN PIJKBZ.

123. *Bacillus* spp. as bio-factories for antifungal secondary metabolites: Innovation beyond whole organism formulations / B. Salazar, A. Ortiz, C. Keswani [et al.] // *Microbial Ecology*. – 2023. – Vol. 86(1). – P. 1-24.

124. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions / S. Arnaouteli, N. C. Bamford, N. R. Stanley-Wall [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. – 2021. – Vol. 19, No. 9. – P. 600-614. – DOI 10.1038/s41579-021-00540-9. – EDN PTDBEU.

125. *Bacillus subtilis* TE3: A promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) / E. Villa-Rodríguez, F. Parra-Cota, E. Castro-Longoria [et al.] // *Biological Control*. – 2019. – V. 132. – P. 135-143. – DOI: 10.1016/j.biocontrol.2019.02.012.

126. *Bacillus subtilis*: a multifarious plant growth promoter, biocontrol agent, and bioalleviator of abiotic stress / A. Sagar, S. S. Yadav, R. Z. Sayyed [et al.] // In *Bacilli in Agrobiotechnology: Plant Stress Tolerance, Bioremediation, and Bioprospecting*. – 2022. – Cham: Springer International Publishing. – P. 561-580.

127. Barska, E. Optimization of cultivation conditions of *Bacillus* genus bacteria for proteolytic enzymes production [электронный ресурс] / E. Barska // *Problems of Environmental Biotechnology*. – 2014. – № 4. Режим доступа <http://ecobio.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/article/view/5527>.

128. Bayman, P. Microbial endophytes of orchid roots / P. Bayman, J.T. Otero // *Soil Biology*. – 2006. – Vol. 9. – P. 153-177.

129. Berrie, A. Developing biopesticide-based programmes for managing powdery mildew in protected strawberries in the UK / A. Berrie, X. Xu // *Crop Protection*. – 2021. – Vol. 149. – P. 105766. – DOI 10.1016/j.cropro.2021.105766. – EDN LGPMAC.

130. Bio efficacy studies of Taegro (*Bacillus subtilis*) on root rot incidence, growth and yield attributing characters / H. Kumar, A. K. Singh, B. V. Rajkumar [et al.] // *The Ecoscan: Special issue*. – 2015. – V. 7. – P. 301-304.

131. Biochemical limitations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides production in a wheat bran culture medium / R. Barssoum, G. Al Kassis, R. Nassereddine [et al.] // *Research in Microbiology*. – 2023. – Vol. 174, No. 6. – P. 104043. – DOI 10.1016/j.resmic.2023.104043. – EDN VJVPYW.

132. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species / D. Fira, I. Dimkić, T. Berić [et al.] // *Journal of biotechnology*. – 2018. – Vol. 285. – P. 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>

133. Biopesticide and formulation processes based on starch industrial wastewater fortified with soybean medium / A. Ndao, L. R. Kumar, R. D. Tyagi [et al.] // *Journal of Environmental Science and Health. Part B: Pesticides, Food Contaminants,*

and Agricultural Wastes. – 2020. – Vol. 55, No. 2. – P. 115-126. – DOI: 10.1080/03601234.2019.1668225. – EDN CADJAT.

134. Biopesticide Encapsulation Using Supercritical CO₂: A Comprehensive Review and Potential Applications / D. R. Do Nascimento Junior, A. Taberno, E.C.d.M. Cabral Albuquerque [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, No. 13. – P. 4003. – DOI 10.3390/molecules26134003. – EDN BFGYFG.

135. Biopesticide oversight and registration at the U.S. Environmental Protection Agency / J. Leahy, M. Mendelsohn, J. Kough [et al.] – In: Coats (ed.) *Biopesticides: state of the art and future opportunities*. ACS Symposium Series, American Chemical Society. 2014. – 16 p.

136. Biopesticides for pests control: A review / A. Tijjani, K. A. Bashir, I. Mohammed [et al.] // *Journal of Biopesticides and Agriculture*. – 2016. – Vol. 3. – № 1. – P. 6-13.

137. Biopesticides: current status and future prospects in India / Y. N. Tripathi, K. Divyanshu, S. Kumar [et al.] // *Bioeconomy for sustainable development*. – 2020. – P. 79-109.

138. Biopesticides and Biofertilizers: Types, Production, Benefits, and Utilization / L. Abbey, J. Abbey, A. Leke-Aladekoba [et al.] // *Byproducts from Agriculture and Fisheries: Adding Value for Food, Feed, Pharma, and Fuels*. – 2019. – P. 479-500. <https://doi.org/10.1002/9781119383956.ch20>

139. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1 / P. Parthipan, E. Preetham, L. L. Machuca [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 193.

140. Biosurfactants and its prospective application in the petroleum industry / M.S. Osman, Z. Ibrahim, A. Japper-Jaafar [et al.] // *Journal of Sustainability Science and Management*. – 2019. – V. – 14. – P. 125-140.

141. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* b20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery / S. N. Al-Bahry, Y. M. Al-Wahaibi, A. E. Elshafie [et al.] // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2013. – № 81, 141-146.

142. Cambaza, E. Comprehensive description of *Fusarium graminearum* pigments and related compounds / E. Cambaza // Foods. – 2018. – Vol. 7, No. 10. – P. 165. – DOI 10.3390/foods7100165. – EDN LIGPTF.

143. Chen, W. Developing microbeplant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration / W. Chen, C.H. Wu, S.H. Bernard // Microbial biotechnology. – 2009. – Vol. 10. – P. 1-13.

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

145. Coevolutionary Governance of Antibiotic and Pesticide Resistance / P. Søgaard Jørgensen, C. Folke, P. J. G. Henriksson [et al.] // Trends in Ecology & Evolution. – 2020. – Vol. 35, No. 6. – P. 484-494. – DOI:10.1016/j.tree.2020.01.011. – EDN MJWKBM.

146. Concepts and applications of foliar spray for microbial inoculants / C. Preininger, U. Sauer, A. Bejarano [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2018. – Vol. 102, No. 17. – P. 7265-7282. – DOI: 10.1007/s00253-018-9173-4. – EDN EQXNIO.

147. Congo red induces trans-priming to UV-B radiation in *Metarhizium robertsii* / K. C. Licona-Juárez, A. V. S. Bezerra, I. T. C. Oliveira [et al.] // Fungal Biology. – 2023. – Vol. 127, No. 12. – P. 1544-1550. – DOI: 10.1016/j.funbio.2023.06.005. – EDN ZGDLMU.

148. Djaenuddin, N. Effectiveness of *Bacillus subtilis* TM4 biopesticide formulation as biocontrol agent against maydis leaf blight disease on corn / N. Djaenuddin, Suriani, A. Muis // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2020. – Vol. 484, No. 1. – P. 012096. – DOI 10.1088/1755-1315/484/1/012096. – EDN KGDRQU.

149. Effect of zinc oxide nanoparticle supplementation on the enhanced production of surfactin and iturin lipopeptides of endophytic *Bacillus* sp. Fcl1 and its

ameliorated antifungal activity / A. Ravi, V. V. T. Nandayipurath, S. Rajan [et al.] // Pest Management Science. – 2021. – V. 77(2). P. 1035-1041. DOI:10.1002/ps.6118

150. Effects of substrates and reaction conditions on production of cyclodextrins using cyclodextrin glucanotransferase from newly isolated *Bacillus agaradhaerens* KSU-A11 [электронный ресурс] / A.S.S. Ibrahim, M. A. El-Tayeb, Y. B. Elbadawi [et al.] // Electronic Journal of Biotechnology. – 2011. Режим доступа: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v14n5-4>.

151. Effects of temperature, pH and water activity on the growth and the sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1 / E. Gauvry, A. G. Mathot, O. Couvert [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2020. – № 337. – P. 108915. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108915

152. Effect of seed bacterization with plant growth-promoting bacteria on wheat productivity and phosphorus mobility in the rhizosphere / T. Arkhipova, N. Galimsyanova, L. Kuzmina [et al.] // Plant Soil Environmental. – 2019. – Vol. 65. – P. 313-319. <https://doi.org/10.17221/752/2018-PSE>.

153. Efficacy of *Bacillus subtilis* strain QST 713 (Rhapsody) against four major diseases of greenhouse cucumbers / Z. K. Punja, A. Tirajoh, D. Collyer [et al.] // Crop Protection. – 2019. – №. 124. – P. 104845. DOI: 10.1016/j.cropro.2019.104845

154. Efficacy of biofungicides against root rot and damping-off of microgreens caused by *Pythium* spp / C. S. McGehee, R. E. Raudales, W. H. Elmer [et al.] // Crop Protection. – 2019. – № 121. – P. 96-102. DOI:10.1016/j.cropro.2018.12.007

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

156. Exopolymer diversity and the role of levan in *Bacillus subtilis* biofilms [электронный ресурс] / I. Dogsa, M. Brloznic, D. Stopar [et al.] // PLoS ONE 8(4). – 2013. – 10 p. Код доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0062044>

157. Enwemeka, Ch. S. The role of UV and blue light in photo-eradication of microorganisms / Ch. S. Enwemeka, T. L. Baker, V. V. Bumah // Journal of Photochemistry and Photobiology. – 2021. – Vol. 8. – P. 100064. – DOI 10.1016/j.jpap.2021.100064. – EDN AHICXC.

158. Epiphanies of well-known and newly discovered macromolecular carbohydrates – A review / P. B. S. Albuquerque, W. F. De Oliveira, P. M. Dos Santos Silva [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 156. – P. 51-66. – DOI 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.046. – EDN QIEKBQ.

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

160. Ethanol induction of laccase depends on nitrogen conditions of *Pycnoporus sanguineus* / C.A. Hernández, N. Sandoval, J. Mallerman [et al.] // Electronic Journal of Biotechnology. – 2015. – № 18. – P. 327–332.

161. Evaluating the efficacy of potential fungicide-adjuvant combinations for control of myrtle rust in New Zealand / K. Adusei-Fosu, C. A. Rolando, B. Richardson [et al.] // Journal of Plant Diseases and Protection. – 2021. – Vol. 128, No. 6. – P. 1501-1515. – DOI 10.1007/s41348-021-00523-1. – EDN SEQGYQ.

162. Evaluation of biofungicide formulation of *Trichoderma longibrachiatum* in controlling of tomato seedling damping-off caused by *Rhizoctonia solani* / B. Y. Mahde, M. A. Fayyadh, S. S. Al-Luaibi [et al.] // Basrah Journal of Agricultural Sciences. – 2019. – № 32(2). – P. 135–149. – DOI: 10.37077/25200860.2019.204

163. Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design / F. Mandelli, F. Yamashita, J.L. Pereira, A.Z. Mercadante [et al.] // Brazilian Journal of Microbiology. – 2012. – Vol. 43. – P. 126-134.

164. Evidence that the biofungicide Serenade® (*Bacillus subtilis*) suppresses clubroot on Canola via antibiosis and induced host resistance / R.L. Lahlali, G. Peng, B.D. Gossen [et al.] // Phytopathology. – 2013. – № 103(3). – P. 245-254.

165. Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design / S. A. Moghannem, M. Farag, A. M. Shehab, [et al.] // Brazilian Journal of Microbiology. – 2018. – V. 49. – P. 452-462. – DOI:10.1016/j.bjm.2017.05.012
166. Falguni R. P. Optimization of production of alkaline phosphatase by a facultative alkaliphile *Bacillus flexus* FPB17 isolated from alkaline lake soils / R.P. Falguni, M.C. Sharma // Journal of Agricultural Technology. – 2012. – Vol.8. – № 5. – P. 1605-1612.
167. Fenibo, E.O. Biopesticides in Sustainable Agriculture: Current Status and Future Prospects / E.O. Fenibo, G.N. Ijoma, T. Matambo // New and Future Development in Biopesticide Research: Biotechnological Exploration / S.D. Mandal, G. Ramkumar, S. Karthi, F. Jin (eds). – Singapore : Springer, 2022. – https://doi.org/10.1007/978-981-16-3989-0_1
168. Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review / S. Abbasiliasi, J. S. Tan, T. A. T. Ibrahim [et al.] // Rsc Advances. – 2017. – № 7(47). – P. 29395-29420.
169. Formulation and development of biofungicide / K.C. Dhiraj, K.V. Shiv, K.P. Aanand [et al.] // International Research Journal of Natural Sciences. – 2014. – Vol. 2. – № 2. – P.14-22.
170. Garcha, S. Molasses growth medium for production of *Rhizobium* sp. based biofertilizer / S. Garcha, R. Kansal, S.K. Gosal // Indian Journal of Biochemistry & Biophysics. – 2019. – Vol. 56. – P. 378-383.
171. Gašić, S. Biopesticide formulations, possibility of application and future trends / S. Gašić, B. Tanović // Pesticides And Phytomedicine. – 2013. – Vol. 28. – № 2. – P. 97-102.
172. Ghribi, D. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration / D. Ghribi, S. Ellouze-Chaabouni // Biotechnology Research International. – 2011. – Vol. 2011. – 6 p.

173. Goswami, D. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review / D. Goswami, J.N. Thakker, P.C. Dhandhukia // Cogent Food Agric. – 2016. – № 2(1). – P. 1-19. DOI:10.1080/23311932.2015.1127500.
174. Hammon, R. Evaluation of Kodiak (R) biological seed treatment to control seedling diseases of chickpea / R. Hammon, A. Berrada // C.S.U.C. Extension. – 2001. – P. 47.
175. Hashem, A. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress / A. Hashem, B. Tabassum, E. Fathi Abd Allah // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2019. – №. 26. – P. 1291-1297. – DOI:10.1016/j.sjbs.2019.05.004
176. He, Z. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymixa* strain that corproduces a novel lantibiotic and polymyxin / Z. He, D. Kislal, L. Zhang // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73. – № 1. – P. 168-178.
177. Improved shelf life of dried *Beauveria bassiana* blastospores using convective drying and active packaging processes / G. M. Mascarin, M. A. Jackson, R. W. Behle [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2016. – Vol. 100, No. 19. – P. 8359-8370. – DOI: 10.1007/s00253-016-7597-2. – EDN IXGBDS.
178. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease / O. Kilani-Feki, S. B. Khedher, M. Dammak [et al.] // Biological Control. – 2016. – V. 95. – P. 73-82. – DOI:10.1016/j.biocontrol.2016.01.005
179. Improvement of biomass and cyclic lipopeptides production in *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 by modifying carbon and nitrogen sources and ratios of the culture media / D. B. Medeot, M. Bertorello-Cuenca, J. P. Liaudat [et al.] // Biological control. – 2017. – V. 115. – P. 119-128.
180. Inhibition property of a novel antifungal polypeptide, Jiean-peptide / Y. Dai-Fu, J.Y. Zhou, J. Zhong [et al.] // Chinese Journal of Antibiotics. – 2005. – Vol. 30. – № 9. – P. 516-520.

181. Isolation and characterization of a *Rhodococcus* strain able to degrade 2-fluorophenol / A.F. Duque, S.A. Hasan, V.S. Bessa [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2012. – № 95. – P. 511–520.
182. Jalali, E. A novel method for biosynthesis of different polymorphs of TiO₂ nanoparticles as a protector for *Bacillus thuringiensis* from Ultra Violet / E. Jalali, S. Maghsoudi, E. Noroozian // *Scientific Reports*. – 2020. – № 10. – P. 426. – DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57407-6>.
183. Kazim, A.R. Antimicrobial effect of phospholipid produced from *Bacillus subtilis* / A.R. Kazim, S.B. Alden // *World Journal of Experimental Biosciences*. – 2014. – V. 2. – № 2. – P. 59-63.
184. Khater, H.F. Prospects of botanical biopesticides in insect pest management / H.F. Khater // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. – 2012. – Vol. 02. – № 05. – P. 244-259.
185. King, E.O. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein / E.O. King, M.K. Ward, D.E. Raney // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 1954. – Vol. 44. – P. 301-307.
186. Koumoutsis, A. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42 / A. Koumoutsis, X-H. Chen, A. Henne // *J. Bacteriol.* 2004. – Vol.186. – № 4. – P.1084-1096.
187. Kruse, S. Imaging high-performance thin-layer chromatography as powerful tool to visualize metabolite profiles of eight *Bacillus* candidates upon cultivation and growth behavior / S. Kruse, F.Pierre, G. Morlock // *Journal of Chromatography A*. – 2021. – V. 1640. – P. 461929. DOI:10.1016/j.chroma.2021.461929.
188. Leisso, R.S. Field evaluation of biological control and fungicide seed treatments for pre-emergence damping off of chickpeas / R.S. Leisso, M.E. Burrows // *Pisum Genetics*. – 2007. – № 39. – P. 28-31.
189. Martin, S.B. Biological control of soilborne pathogens with antagonists / S.B. Martin, G.S. Abawi, H.C. Hoch // *Biological control in agricultural IPM systems*. – 1987. – P. 433-454.

190. Mesnage, R., Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides / R. Mesnage, M. N. Antoniou // *Frontiers in public health*. – 2018. – № 5. – P. 361. – DOI: 10.3389/fpubh.2017.00361.
191. Microbial bio-control agents: A comprehensive analysis on sustainable pest management in agriculture / R. Chaudhary, A. Nawaz, Z. Khattak [et al.] // *Journal of Agriculture and Food Research*. – 2024. – Vol. 18. – P. 101421. – DOI 10.1016/j.jafr.2024.101421. – EDN ILPLEU.
192. Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides / I. Horak, G. Engelbrecht, P.J. J. van Rensburg [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. – 2019. – Vol. 127. – №2. – P. 326-343. – DOI:10.1111/jam.14218.
193. Microorganisms as biological control agents against *Fusarium* pathogens in winter wheat / U. Wachowska, K. Kucharska, M. Jkdryczka [et al.] // *Polish Journal of Environmental Studies*. – 2013. – V.22. – № 2. – P. 591-597.
194. Miljaković, D. The significance of *Bacillus* spp. In disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops / D. Miljaković, J. Marinković, S. Balešević-Tubić // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8, No. 7. – P. 1-19. – DOI: 10.3390/microorganisms8071037. – EDN ZIBZWB.
195. Mishra, J. Biopesticides: Where We Stand? // N.K. Arora (ed.), *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*, 2015. – P. 37-75.
196. Mohapatra, S. Study on polyhydroxyalkanoates production using rhizospheric soil bacterial isolates of sweet potato / S. Mohapatra, D.P. Samantaray, S.M. Samantaray // *Indian Journal of Science and Technology*. – 2015. – V. – 8(S7). – P. 57-62.
197. Montealegre, J.R. Selection of antagonists to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato / J.R. Montealegre, R. Reyes, L.M. Perez // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2003. – Vol. 6. – № 2. – P. 116-127.
198. Novel combination of a biosurfactant with entomopathogenic fungi enhances efficacy against Bemisia whitefly / J. do Nascimento Silva, G. M. Mascarin, R.

P. V. de Castro [et al.] // Pest management science. – 2019. – № 75(11). – P. 2882-2891. – DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.5458>.

199. Optimization of antifungal lipopeptide production from *Bacillus* sp. BH072 by response surface methodology / X. Zhao, Y. Han, X. Q. Tan [et al.] // Journal of Microbiology. – 2014. – V. 52. – № 4. – P. 324-332.

200. Optimization of *Bacillus aerius* strain JS-786 cell dry mass and its antifungal activity against *Botrytis cinerea* using response surface methodology / J. Shafi, J. Mingshan, Q. Zhiqiu [et al.] // Archives of Biological Sciences. – 2017. – Vol. 69. – №. 3. – P. 469-480. DOI: [10.2298/ABS160421122S](https://doi.org/10.2298/ABS160421122S).

201. Optimization of *Bacillus subtilis* cell growth effecting jjean-peptide production in fed batch fermentation using central composite design / J. Zhong, X. Zhang, Y. Ren [et al.] // Electronic Journal of Biotechnology. – 2014. – № 17. – P. 132-136.

202. Optimization of iturin A production from *Bacillus subtilis* ZK-H2 in submerge fermentation by response surface methodology / H. Yue, J. Zhong, Z. Li [et al.] // Biotechnology. – 2021. – № 11. – P. 36. – DOI:[10.1007/s13205-020-02540-7](https://doi.org/10.1007/s13205-020-02540-7).

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

204. Optimization of medium composition for the production of antimicrobial activity by *Bacillus subtilis* B38 / O. Tabbene, I. Ben Slimene, K. Djebali [et al.] // Biotechnology Progress. – 2009. – Vol. 25. – № 5. – P. 1267-1274.

205. Optimization of the culture medium, fermentation process, and effectiveness of a biopesticide from an Iranian *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (BN2) / F. Saberi, R. Marzban, M. Ardjmand [et al.] // Journal of Agricultural Science and Technology. – 2023. – Vol. 25, No. 2. – P. 469-484. – DOI: [10.52547/jast.25.2.469](https://doi.org/10.52547/jast.25.2.469). – EDN JNGHPA.

206. Optimization of thermo-alkali stable amylase production and biomass yield from *Bacillus* sp. under submerged cultivation / A. Khusro, K. Barathikannan, C. Aarti [et al.] // Fermentation. – 2017. – V. 3(1). – P. 7. –DOI:[10.3390/fermentation3010007](https://doi.org/10.3390/fermentation3010007).

207. 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 / K. M. Ayer, D. A. Strickland, M. Choi [et al.] // Plant Disease. – 2021. – Vol. 105, No. 11. – P. 3545-3553. – DOI 10.1094/pdis-02-21-0426-re. – EDN AROVNP.
208. Ortiz, A. The role of beneficial microorganisms in soil quality and plant health / A. Ortiz, E. Sansinenea // Sustainability. – 2022. – Vol. 14, No. 9. – DOI: 10.3390/su14095358. – EDN VNOJHQ.
209. Overview of mechanisms and uses of biopesticides / X. Liu, A. Cao, D. Yan [et al.] // International Journal of Pest Management. – 2021. – № 67(1). – P. 65-72.
210. Oyedele, A. O. Antifungal activities of *Bacillus subtilis* isolated from some condiments and soil / A. O. Oyedele, T. S. Ogunbanwo // African Journal of Microbiology Research. – 2014. – V. 8(18). – P. 1841-1849. DOI:10.5897/AJMR2013.6162.
211. Pelaez, V. Diversification strategies in the pesticide industry: from seeds to biopesticides / V. Pelaez, G. Mizukawa // Ciência Rural, Santa Maria. – 2017. – V. 47. – № 2. – e2016000. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160007>.
212. Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management /Edited by M. Stoytcheva. InTech. – 2011. – 520 p.
213. Potential biocontrol agents for *Fusarium* Head Blight and deoxynivalenol production in wheat / J.M. Palazzini, M.L. Ramirez, A.M. Torres [et al.] // Crop Protection. – 2011. – № 26. – P. 1702-1710.
214. Prevalence of wheat associated *Bacillus* spp. and their bio-control efficacy against *Fusarium* root rot / S. Mulk, A. Wahab, H. Yasmin [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2022. – № 12. – P. 798619. – DOI: 10.3389/fmicb.2021.798619.
215. Prince, G. Susceptibility of *Myzus persicae*, *Brevicoryne brassicae* and *Nasonovia ribisnigri* to Fungal Biopesticides in Laboratory and Field Experiments / G. Prince, D. Chandler // Insects. – 2020. – Vol. 11, No. 1. – P. 55. – DOI: 10.3390/insects11010055. – EDN VLHBSO.
216. Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium / G. D. Gojgic-Cvijovic, D. M. Jakovljevic, B. D. Loncarevic [et al.]

// International journal of biological macromolecules. – 2019. – Vol. 121. – P. 142-151.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.019>.

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

218. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis* / G. Pant, A. Prakash, J. V. P. Pavani [et al.] // Journal of Taibah University for Science. – 2015. – № 9(1). – P. 50-55. DOI:10.1016/j.jtusci.2014.04.010

219. Production of a novel glycerol inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5 / M. Berekaa, T. Zaghloul, Y. Abdel-Fattah [et al.] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2009. – Vol. 25. – P. 287-294.

220. Punja, Z. K. Effects of *Bacillus subtilis* strain QST 713 and storage temperatures on post-harvest disease development on greenhouse tomatoes / Z. K. Punja, G. Rodriguez, A. Tirajoh // Crop Protection. – 2016. – №. 84. – P. 98-104. DOI: 10.1016/j.cropro.2016.02.011

221. Raykova, D. Growth kinetics and bacteriocin production by three enterococcus strains under low-temperature stress / D. Raykova, Sl. Peykov, Sv. Dimov // Trakia Journal of Sciences. – 2008. – V. 6. – №1. – P. 49-53.

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

223. Research and development of biopesticides: challenges and prospects / Ndolo D., Njuguna E., Adetunji C. O. [et al.] // Outlooks on Pest Management. –2019. – T. 30. – №. 6. – P. 267-276. – DOI:10.1564/v30_dec_08.

224. Roeva, O. Optimization of *E. coli* cultivation model parameters using firefly algorithm / O. Roeva // International Journal Bioautomation. – 2012. – Vol.16. – № 1. – P. 23-32.

225. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability [электронный ресурс] / P. Vejan, R. Abdullah, T. Khadiran [et al.] // Review. Molecules. – 2016. – № 21(5):573. – 17 p.: – URL: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/573/pdf>.
226. Sachdev, S., Current challenges, constraints and future strategies for development of successful market for biopesticides / S. Sachdev, R. P. Singh // Climate Change and Environmental Sustainability. – 2016. – Vol. 4 – №2. – P. 129-136. DOI: 10.5958/2320-642X.2016.00014.4
227. Sadouk-Hachaïchi, Z. Growth kinetics study of a bacterial consortium producing biosurfactants, constructed with six strains isolated from an oily sludge / Z. Sadouk-Hachaïchi, A. Tazerouti, H. Hacene // Advances in bioscience and biotechnology. – 2014. – № 5. – P. 418-425.
228. Saha, S. Biopesticides. In Trajectory of 75 years of Indian Agriculture after Independence / S. Saha, R. Thosar, K. Kabade Pawar, K. Banerjee. – Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. – P. 675-703.
229. Sahai, P. Bioformulation and nanotechnology in pesticide and fertilizer delivery system for eco-friendly agriculture: a review / P. Sahai, V. B. Sinha, R. Dutta // Sci Agric. – 2019. – № 3. – P. 2-10. – DOI: 10.31080/ASAG.2019.03.0675.
230. Saleh, H. Optimizing production of a biopesticide protectant by black yeast / H. Saleh, A. Abdelrazak, A. Elsayed // Egyptian Journal of Biological Pest Control. – 2018. – № 28. – P. 72. – DOI: 10.1186/s41938-018-0078-4.
231. Samada, L. H. Biopesticides as promising alternatives to chemical pesticides: A review of their current and future status / L. H. Samada, U. S. F. Tambunan // Online J. Biol. Sci. – 2020. – Vol. 20. – №. 2. – P. 66-76.
232. Screening and optimization of newly isolated thermotolerant *Lysinibacillus fusiformis* strain SK for protease and antifungal activity / S. Khadka, S. Adhikari, A. Thapa [et al.] // Current Microbiology. – 2020. – V. 77. – P. 1558-1568. – DOI:10.1007/s00284-020-01976-7.
233. Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review / A. Mahmood, O. C. Turgay, M. Farooq [et al.] // FEMS Microbiology Ecology. – 2016. – V. 92. – № 8. – fiw112. DOI:10.1093/femsec/fiw112.

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

235. Singh, A.K. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus* sp strain AR2 / A.K. Singh, R. Rautela, S.S. Cameotra // *Microbial Cell Factories*. – 2014. – №13. – P. 67. – DOI:10.1186/1475-2859-13-67.

236. Single cell encapsulation in a Pickering emulsion stabilized by TiO₂ nanoparticles provides protection against UV radiation for a biopesticide / R. A. Feldbaum, N. Yaakov, K. Ananth Mani [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2021. – Vol. 206. – P. 111958. – DOI 10.1016/j.colsurfb.2021.111958. – EDN KYRKKF.

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

238. Status and Prospects of Botanical Biopesticides in Europe and Mediterranean Countries / F. Acheuk, S. Basiouni, A. A. Shehata [et al.] // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12, No. 2. – DOI 10.3390/biom12020311. – EDN KRLYHF.

239. Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain / N. Jemil, A. Manresa, F. Rabanal [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2017. V. 1060. – P. 374-386. DOI:10.1016/j.jchromb.2017.06.013.

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

241. 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 / X. Ji, J. Li, Z. Meng [et al.] // *Plant disease*. – 2019. – V. 103. – № (8). – P. 1991-1997. DOI:10.1094/PDIS-01-19-0143-RE.

242. The biochemistry behind biopesticide efficacy / M. Hubbard, R.K. Hynes, M. Erlandson [et al.] // Sustainable Chemical Processes. – 2014. – № 2. – P. 18.

243. The challenge of combining high yields with environmentally friendly bioproducts: A review on the compatibility of pesticides with microbial inoculants / M. S. Santos, T. F. Rodrigues, M. A. Nogueira [et al.] // Agronomy. – 2021. – Vol. 11. – №5. – P. 870.

244. The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study / M. Trejo, L. Serrano-Carreón, M. Patiño [et al.] // Electronic Journal of Biotechnology. – 2013. – Vol. 16. – №3. – P. 1-23.

245. 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 / Y. Akhanaev, S. Pavlushin, O. Polenogova [et al.] // BioControl. – 2022. – DOI 10.1007/s10526-022-10137-7. – EDN GMJTEV.

246. Towards sustainable green adjuvants for microbial pesticides: recent progress, upcoming challenges, and future perspectives / F. Lin, Yu. Mao, F. Zhao, [et al.] // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11, No. 2. – P. 364. – DOI 10.3390/microorganisms11020364. – EDN RRAFRU.

247. Tumbarski, Y. 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 / Y. Tumbarski, E. Petkov, Z. Denkova // Journal of Global Biosciences. – 2015. – V. 4. – №. 8. – P. 2990-2996.

248. Twizeyimana, M. Effect of selected biopesticides in reducing soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) development / M. Twizeyimana, G. L. Hartman // Plant disease. – 2019. – V. 103(9). – P. 2460-2466. – DOI: 10.1094/PDIS-02-19-0384-RE.

249. Two factor at a time approach by response surface methodology to aggrandize the *Bacillus subtilis* KLP2015 surfactin lipopeptide to use as antifungal agent / K. R. Meena, A. Sharma, R. Kumar [et al.] // Journal of King Saud University-Science. – 2020. – V. 32(1). – P. 337-348. DOI:10.1016/j.jksus.2018.05.025.

250. Ultraviolet Radiation From a Plant Perspective: The Plant-Microorganism Context / L. Vanhaelewyn, D. Van Der Straeten, B. De Coninck [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – № 11. – P. 597642. – DOI: 10.3389/fpls.2020.597642.
251. Willer, H. The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends / H. Willer, J. Lernoud // *Research Institute of Organic Agriculture FiBL and IFOAM Organics International*. – 2019. – P. 1-336.
252. Xu, Y. Enhanced production of iturin A in *Bacillus amyloliquefaciens* by genetic engineering and medium optimization / Y. Xu, D. Cai, H. Zhang [et al.] // *Process Biochemistry*. – 2020. – №. 90. – P. 50-57. – DOI: 10.1016/j.procbio.2019.11.017.
253. Yadav, R. Biopesticides: Current status and future prospects / R. Yadav // *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*. – 2022. – T. 12. – №. 3. – C. 211.
254. Yoon, S. Nitrite control over dissimilatory nitrate/nitrite reduction pathways in *Shewanella loihica* strain PV-4 / S. Yoon, R.A. Sanford, F.E. Löffler // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2015. – № 81(10). – P. 3510-3517.
255. Zadoks, J. C. A decimal code for the growth stages of cereals / J. C. Zadoks, T. T. Chang, D. F. Konzak // *Weed Res.* – 1974. – № 14. – P. 415-421.

ПРИЛОЖЕНИЕ А Свидетельство о государственной регистрации базы данных
№ 2022622985 «Бактерии-антагонисты фитопатогенов из Биоресурсной
коллекции «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов»
ФГБНУ ФНЦБЗР

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 68b80077e14e4f0f0a94edbd24145d5c7
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 20.03.2022 по 26.05.2023

Ю.С. Зубов

ПРИЛОЖЕНИЕ Б Метеорологические условия за период проведения полевых мелкоделяночных опытов

Таблица 1 – Статистика погоды за период проведения полевых испытаний, метеостанция «Круглик», г. Краснодар, 2012-2015 гг.

Показатель	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.		
	темпера- тура воз- духа, °С	относитель- ная влаж- ность воз- духа, %	количество осадков, мм	температура воздуха , °С	относитель- ная влаж- ность воз- духа, %	количество осадков, мм	темпера- тура воздуха , °С	относитель- ная влаж- ность воз- духа, %	количе- ство 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 показа- тели	+ 12,1	67,3	541,1	+ 11,4	69,5	627,3	+ 11,1	67,1	668,3

ПРИЛОЖЕНИЕ В Технические условия на комплексные биопрепараты на
основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

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

А.М. Асатурова

личная подпись

Младший научный сотрудник

А.И. Хомяк

личная подпись

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. Асатулова

личная подпись

Младший научный сотрудник

А.И. Хомяк

личная подпись

Краснодар 2015

ПРИЛОЖЕНИЕ Г Заключение о патогенности штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ "НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ТОКСИКОЛОГИИ И ГИГИЕНИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ
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
(SFBES "RCT&HRB of FMBa of RUSSIA")

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

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 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 испытываемого 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 2,0 мл 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 РЕГУЛЯЦИИ
БИОПРЕПАРАТОВ ФЕДЕРАЛЬНОГО
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА РОССИИ
(ФГБУН "НИЦ ТЫП 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 а/с: Давыдовка ул. Ленина 102А
тел./факс (4967)399738 код из Москвы -27 E-mail: toxic@online.stock.net

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



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 посевах 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 2,0 мл 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


17.05.2013
А.В.Воробьев

ПРИЛОЖЕНИЕ Д Патент на изобретение № 2621356 «Биофунгицид для защиты сельскохозяйственных культур от болезней и повышения урожайности

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

ПРИЛОЖЕНИЕ Е Лабораторные регламенты производства биопрепаратов
на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

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. Надыкта

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. Асатулова

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. Надыкта

«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.


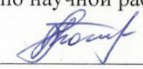
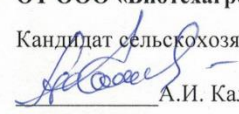
 А.М. Асатунова

Младший научный сотрудник

 А.И. Хомяк

Краснодар 2015

**ПРИЛОЖЕНИЕ Ж Акты внедрения лабораторных регламентов и
технических условий производства биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis*
BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517**

 <p>Утверждаю Директор ФГБНУ ФНЦБЗР А.М. Асатурова «1» июля 2024 г.</p>	 <p>Утверждаю Заместитель генерального директора ООО «Биотехагро» Е.В. Бабарыкин «1» июля 2024 г.</p>
<p>АКТ внедрения лабораторного регламента</p>	
<p>«Производство биопрепарата на основе штамма <i>Bacillus subtilis</i> BZR 336g в препаративной форме жидкая культура» и технических условий</p>	
<p>«Комплексный биопрепарат на основе штамма <i>B. subtilis</i> BZR 336g»</p>	
<p>Краткое описание: лабораторный регламент включает характеристику биопрепарата на основе штамма <i>B. subtilis</i> 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 <i>B. subtilis</i> 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.</p>	
<p>Место проведения работ: Краснодарский край, г. Тимашевск, ООО «Биотехагро»</p>	
<p>Время проведения работ: 15.03.2023-22.05.2023 г.</p>	
<p>Разработчик: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологической защиты растений»</p>	
<p>Исполнители: Асатурова А.М., Хомяк А.И.</p>	
<p>Основание выполнения: диссертационные исследования на тему «Биологическое обоснование создания и применения новых лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов бактерий рода <i>Bacillus</i> для защиты пшеницы озимой от фузариозной корневой гнили»</p>	
<p>Сведения о внедрении: лабораторный регламент «Производство биопрепарата на основе штамма <i>Bacillus subtilis</i> BZR 336g в препаративной форме жидкая культура» от 30.06.2015 и технические условия «Комплексный биопрепарат на основе штамма <i>B. subtilis</i> 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 <i>B. subtilis</i> BZR 336g для защиты сельскохозяйственных культур.</p>	
<p>Сведения об эффективности внедрения: проверка на оборудовании ООО «Биотехагро» подтверждает возможность промышленного производства биопрепарата на основе штамма <i>B. subtilis</i> BZR 336g с титром не менее 1×10^8 КОЕ/мл в соответствии с лабораторным регламентом и техническими условиями.</p>	
<p>ОТ ФГБНУ ФНЦБЗР:</p>	<p>ОТ ООО «Биотехагро»:</p>
<p>Заместитель директора по научной работе, к.с.-х.н.  Н.С. Томашевич</p>	<p>Кандидат сельскохозяйственных наук  А.И. Калашников подпись</p>

Утверждаю
Директор ФГБНУ ФНЦБЗР
А.М. Асатулова
«14» сентября 2024 г.

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

«14» сентября 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: Асатулова А.М., Хомяк А.И.

Основание выполнения: диссертационные исследования на тему «Биологическое обоснование создания и применения новых лабораторных образцов 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.

Н.С. Томашевич
подпись

ОТ ООО «Биотехагро»:

Кандидат сельскохозяйственных наук

А.И. Калашников

подпись

ПРИЛОЖЕНИЕ И Акт внедрения результатов исследования в учебный процесс
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный научный центр биологической защиты растений»

УТВЕРЖДАЮ:
Директор ФГБНУ ФНЦБЗР



А.М. Асатурова

202 г.

АКТ

**внедрения результатов диссертации Хомяк Анны Игоревны в учебный процесс
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный научный центр биологической защиты растений»**

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Хомяк Анны Игоревны на тему «Биологическое обоснование создания и применения новых лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов бактерий рода *Bacillus* для защиты пшеницы озимой от фузариозной корневой гнили» внедрены в учебный процесс Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр биологической защиты растений» 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».

Заведующий отделом
интеллектуальной собственности и
инновационного развития
к.с.-х.н.

Ермоленко С.А.

Начальник отдела аспирантуры и
образовательной деятельности

Вертий Е.А.

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

Томашевич Н.С.