

На правах рукописи

Хомяк Анна Игоревна

**«ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА
BACILLUS – ПРОДУЦЕНТОВ НОВЫХ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ
РАСТЕНИЙ»**

1.5.6 – биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2022

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

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

Официальные оппоненты: **Джавахия Вахтанг Витальевич**,
кандидат биологических наук, ведущий
научный сотрудник, руководитель группы
биотехнологии физиологически активных
веществ Федерального государственного
учреждения Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН

Беляев Анатолий Аркадьевич,
доктор сельскохозяйственных наук,
заведующий кафедрой защиты растений
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Новосибирский
государственный аграрный университет»

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

Защита состоится «09» сентября 2022 г. в 09-00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. +7(383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Т.С. Непомнящих

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Среднемировой уровень потерь урожая вследствие поражения сельскохозяйственных растений фитопатогенными микроорганизмами оценивается на сегодняшний день в 12 %. Для защиты растений от болезней широко используются химические фунгициды. Эффективность их применения может достигать 100%, но при этом возникает ряд проблем, основные из которых – загрязнение окружающей среды и токсичность полученной продукции [Сложенкина, Горлов, 2017; Sabarwalab et al., 2018; Бугрова и др., 2020]. В связи с этим особое значение приобретает использование экологически безопасных методов защиты растений от возбудителей болезней [Thomson, Vijan, 2016; Acheuk et al., 2022]. Одним из путей решения проблемы является переориентация защиты растений на создание и применение микробных препаратов [Twizeyimana, Hartman, 2019; Djaenuddin, Muis, 2020; Уромова, Козлов, 2020; Zhao et al., 2022].

Необходимо учитывать, что действующим началом биопрепаратов являются живые клетки микроорганизмов [Дроздова, Сорокина, 2019]. Поэтому важной задачей является обеспечение жизнеспособности, биологической активности и чистоты культуры клеток штаммов-продуцентов, разработка и усовершенствование технологий производства биопрепаратов на их основе, а также совершенствование технологического производства с учетом трофических потребностей микроорганизмов, их устойчивости к различным воздействиям [Маслиенко, 2004; Новикова, 2005; Павлюшин, 2010; Максимов и др., 2018; Lengai, Muthomi, 2018; Дроздова, Сорокина, 2019].

Степень изученности темы. Исследование патентных документов и научных статей показало, что в настоящее время существует большой набор бактерий-антагонистов, которые могут послужить основой биопрепаратов. Заявители патентов и авторы научных статей в своих работах подробно излагают результаты исследований по антифунгальной активности биоагентов в отношении различных патогенов, по биологической эффективности и ростостимулирующему эффекту [Asaturova et al., 2012; Abada et al., 2014; Штерншис и др., 2016; Toral et al., 2018]. Однако вопросы технологии производства биопрепаратов и требования к их конечным характеристикам еще недостаточно проработаны [Köhl et al., 2011; Trejo et al., 2013; Wachowska et al., 2013; Ndolo et al., 2019]. Если за рубежом появляется все большее число публикаций, касающихся разработки новых микробиологических препаратов для защиты растений, то в современной российской научной литературе таких публикаций крайне мало [Бурова, 2012; Леонтьева и др., 2013; Холод, 2014; Четвериков и др., 2016].

Многие авторы подчеркивают узкий спектр действия биопрепаратов и нестабильность защитного и стимулирующего действия [Митина, Резвякова, 2012; Резанова, 2013; Табакова, Чухина, 2015; Соболева, 2018; Essiedu et al., 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: осуществить изучение и оптимизацию условий культивирования бактерий рода *Bacillus* – продуцентов новых биопрепаратов для защиты растений от корневых гнилей фузариозной этиологии

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить оптимальные источники углеродного и азотного питания, а также параметры температуры и pH для культивирования штаммов бактерий *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517.
2. Изучить динамику роста штаммов в условиях периодического культивирования для установления оптимального времени выращивания штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517.
3. Разработать состав питательных сред для культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 с высокой антифунгальной активностью и титром не менее 1×10^9 КОЕ/мл.
4. Осуществить контроль качества полученных лабораторных образцов на соответствие техническим характеристикам современных биопрепаратов.
5. Разработать технические условия (ТУ) и лабораторные регламенты производства биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517.
6. 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 озимой пшеницы в условиях полевого мелкоделяночного опыта на экспериментальной базе ФГБНУ ФНЦБЗР.

Научная новизна. Изучены биотехнологические особенности штаммов *B. subtilis* BZR 336 g и *B. subtilis* BZR 517. Впервые определены оптимальные параметры источников углеродного и азотного питания, температуры, pH, а также динамики роста штаммов *B. subtilis* BZR 336 g и *B. subtilis* BZR 517 в условиях периодического культивирования. Дано биологическое обоснование применения изученных штаммов для получения новых биопрепаратов.

Оценена биологическая эффективность жидкой культуры (ЖК) на основе штаммов бактерий-антагонистов на искусственном инфекционном фоне заражения грибом *Fusarium graminearum* BZR 4 в зависимости от типа питательных сред.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в получении новых знаний физиолого-биохимических свойств бактерий *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517, влияния абиотических факторов на рост бактерий в процессе периодического культивирования.

Разработаны ТУ и лабораторные регламенты на производство биопрепаратов на основе штаммов бактерий *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 для защиты озимой пшеницы от болезней.

Проведены исследования эффективности лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов бактерий *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в полевых условиях и рассчитана биологическая эффективность их применения на озимой пшенице против фузариозных корневых гнилей. Установленная возможность получения новых биопрепаратов вносит вклад в научные основы их использования в защите растений от фитопатогенов.

Работа может представлять интерес в качестве теоретического и практического материала для научных сотрудников, студентов и аспирантов по специальностям «Биотехнология», «микробиология» и «защита растений».

Положения, выносимые на защиту:

- условия культивирования и динамика роста штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517;

- влияние состава питательной среды на ростостимулирующую и фунгицидную активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517;

- биологическая эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в полевых условиях и получение сохраненного урожая озимой пшеницы.

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

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Научное обеспечение АПК», г. Краснодар, 26-28 ноября 2013 г.; VIII Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем», г. Краснодар, 16-18 сентября 2014 г.; VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», г. Москва, 17-20 марта 2015 г.; Научно-образовательной конференции молодых ученых «Инновационные биотехнологии в развитии АПК», г. Краснодар, 25-28 мая 2015 г.; Международном саммите молодых ученых «Современные решения в развитии сельскохозяйственной науки и производства», г. Краснодар, 26-30 июля 2016 г.; IX Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем» 20-22 сентября 2016 г., г. Краснодар; X Всероссийской конференции молодых ученых «Научное обеспечение АПК», посвященной 120-летию И.С. Косенко, г. Краснодар, 29-30 ноября 2016 г.; 8-й Международной конференции «Агротехнический метод защиты растений», г. Краснодар 19-22 июня, 2017;

Международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2018, г. Уфа, 13-17 июня 2018 г.; Международной научно-практической конференции с элементами школы молодых ученых "Приоритетные направления научного обеспечения агропромышленного комплекса России и стран СНГ", п. Белозерный, 21-24 августа 2018г.; XI Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты», г. Минск, р. Беларусь, 3-6 июня 2019 г; IV Международной научной конференции «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки» г. Ялта, 9-13 сентября 2019.

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

Личный вклад соискателя. Автор принимал непосредственное участие в проведении лабораторных и полевых опытов, в формулировании основных выводов и подготовке публикаций. Разработка программы исследований и необходимых для её осуществления методов исследований выполнены при участии научного руководителя.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 155 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав, заключений, практических рекомендаций, списка литературы, 12 приложений, содержит 6 таблиц, 37 рисунков. Список библиографических источников включает 226 наименований, в том числе 132 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы

Рассмотрен вопрос разработки биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов в России и в мире. Проанализированы сведения по влиянию условий культивирования на эффективность штаммов-продуцентов биопрепаратов для защиты от фитопатогенных организмов. Обобщены данные по эффективности применения биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов в подавлении возбудителей болезней растений.

2. Материалы и методы

Объекты исследования: штаммы *Bacillus subtilis* BZR 336 g (патент № 2553518) и *Bacillus subtilis* BZR 517 (патент № 2552146) из Биоресурсной коллекции «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» ФГБНУ ФНЦБЗР. Штаммы депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (г. Санкт-Петербург). В работе также использованы тест-культуры фитопатогенных грибов – моноспоровые штаммы *Fusarium graminearum* Schwabe BZR 4 и *F. oxysporum* var. *orthoceras* App. et Wr. BZR

б, семена и растения озимой пшеницы сортов Батько и Калым селекции НЦЗ им. П.П. Лукьяненко.

Исследования проводили на базе лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ФНЦБЗР с использованием материально-технической базы УНУ «Технологическая линия для получения микробиологических средств защиты растений нового поколения» ([http://ckp-rf.ru/registered No 671367](http://ckp-rf.ru/registered%20No%20671367)).

Постановка эксперимента: ЖК на основе штаммов получали методом периодического культивирования в конических колбах (350 мл) с объемом питательной среды 100 мл и предварительным внесением посевной (маточной) культуры (2,0 % от объема питательной среды).

Для определения оптимальных источников углеродного питания в среду для культивирования штаммов вносили сахарозу, глюкозу, мелассу и глицерин. При определении оптимальных источников азотного питания испытывали пептон, NaNO₃, дрожжевой и кукурузный экстракты. Для определения оптимальной температуры культивирования штаммы выращивали при температурах 20,0; 25,0; 30,0 и 35,0 °С, pH при 3,0; 6,0; 8,0 и 10,0. Для определения оптимальных сроков культивирования пробы для анализа брали через 8, 16, 24, 36, 48 и 72 ч после начала культивирования.

Методы исследования: количество колониеобразующих единиц определяли методом Коха [Практикум по микробиологии, 2005]. Определение антагонистической активности проводили методом двойных (встречных) культур [Егоров, 2004]; антибиотическую активность – модифицированным методом последовательных разведений [Егоров, 2004; Sidorova et al., 2020]. Выделение, очистку и анализ антифунгальной активности бактериальных метаболитов проводили путем экстракции этилацетатом, восходящей тонкослойной хроматографии и биоавтографии [Сидорова и др., 2019].

Биологическую эффективность ЖК на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336 g и *B. subtilis* BZR 517 с различными нормами применения определяли на фоне искусственного заражения грибом *F. graminearum* BZR 4 в условиях климатической камеры Binder KWWF 720 (Германия) (24 °С, 14000 люкс, влажность 65 %). Учет поражения корневой гнилью и расчёт биологической эффективности осуществляли согласно Методическим указаниям по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве (2009).

Определение биологической и хозяйственной эффективности в отношении корневой гнили фузариозной этиологии на фоне естественного поражения растений осуществляли в условиях полевого мелкоделяночного опыта на экспериментальной базе ФГБНУ ФНЦБЗР с 2013 по 2015 гг. Учеты корневой гнили фузариозной этиологии осуществляли согласно Методическим указаниям по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве [2009]. Массу 1000 зерен определяли по ГОСТ 12042-80.

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

Глава 3. Результаты и обсуждения

3.1 Исследование оптимальных условий культивирования штаммов

B. subtilis BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

Подбор источников углеродного питания

В результате проведенных исследований наибольшее количество клеток в ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g отмечалось на среде, где в качестве источника углерода была использована меласса: $(4,0 \pm 0,14) \times 10^7$ КОЕ/мл (рисунок 1). 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. Для обоих штаммов максимальное ингибирование *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 отмечено на среде с добавлением мелассы: 9,78% для штамма *B. subtilis* BZR 336g и 8,81 % для штамма *B. subtilis* BZR 517 (рисунок 2).

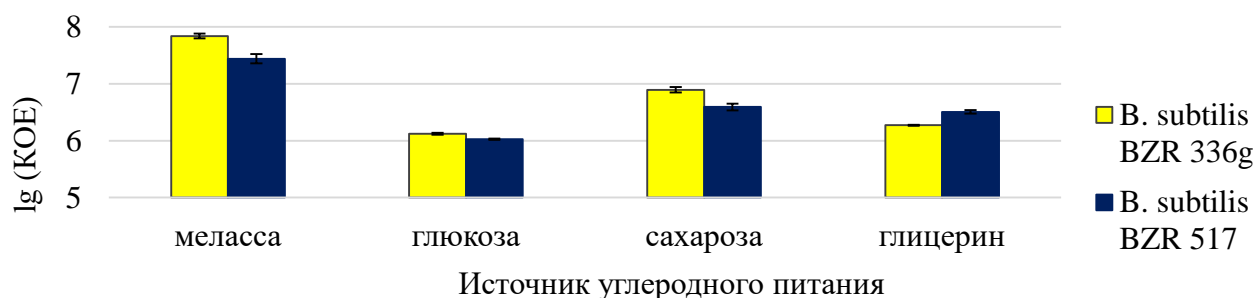


Рисунок 1 – Влияние источников углеродного питания на рост штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в процессе периодического культивирования

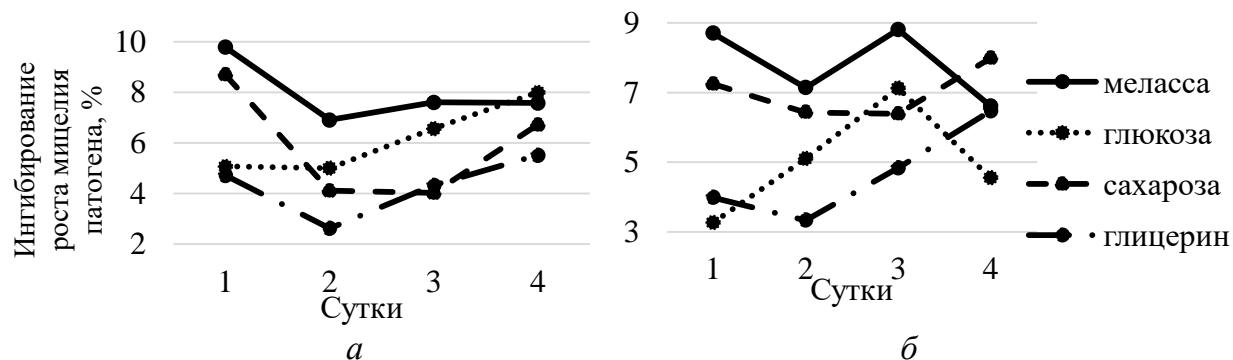
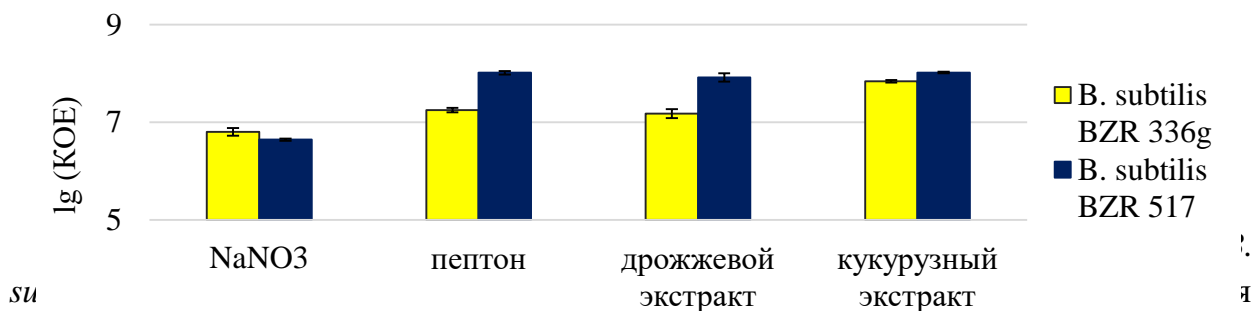


Рисунок 2 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g (а) и *B. subtilis* BZR 517 (б) в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от источника углеродного питания

В ходе исследований морфологических изменений мицелия *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 отмечено не было.

Подбор источников азотного питания

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 (рисунок 3).



Источник азотного питания

Существенное ингибирование *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 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) и пептона для штамма *B. subtilis* BZR 517 (19.12 %) (рисунок 4).

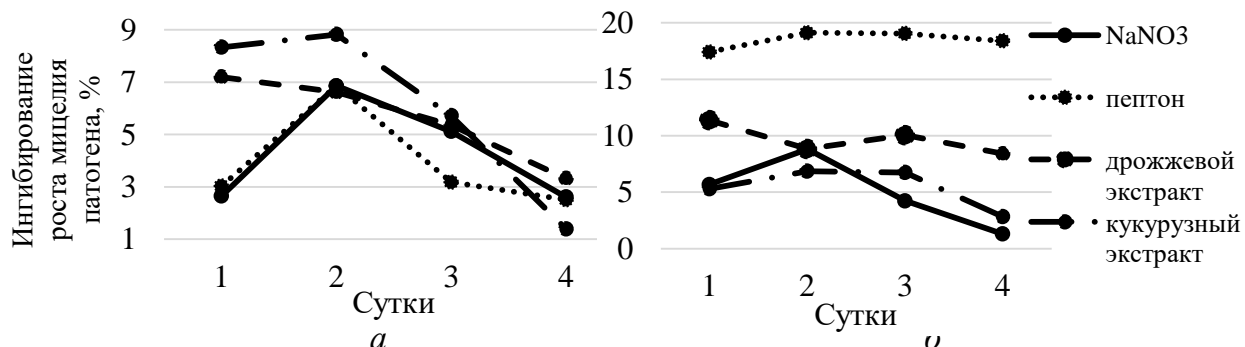


Рисунок 4 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g (а) и *B. subtilis* BZR 517 (б) в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от источника азотного питания

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

Подбор температуры культивирования

На рисунке 5 представлены результаты исследований оптимальной температуры культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

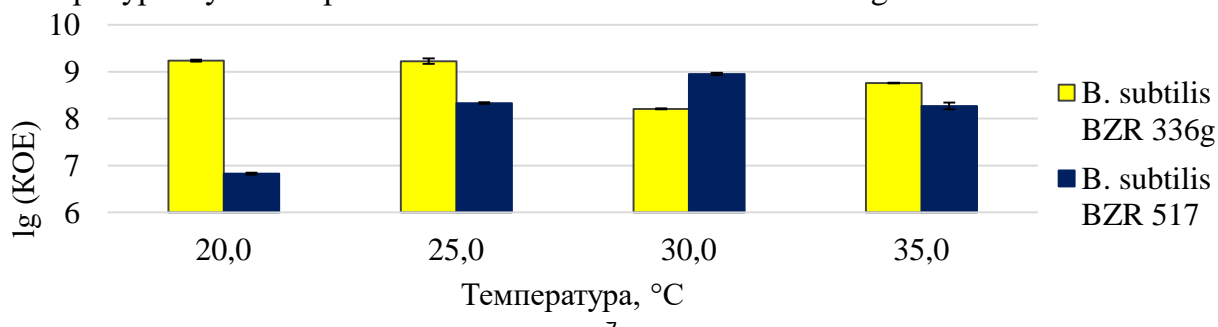


Рисунок 5 – Влияние температуры на рост штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в процессе периодического культивирования

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

Сравнительное изучение антибиотической активности ЖК исследуемых штаммов в отношении тест-культуры *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 показало, что интенсивное накопление антифунгальных веществ в среде зафиксировано при 20,0 и 25,0° С для штамма *B. subtilis* BZR 336g (33,3 % и 32,10 % соответственно) и при 25,0 и 30,0° С для штамма *B. subtilis* BZR 517 (24,43 % и 25,89 % соответственно) (рисунок 6).

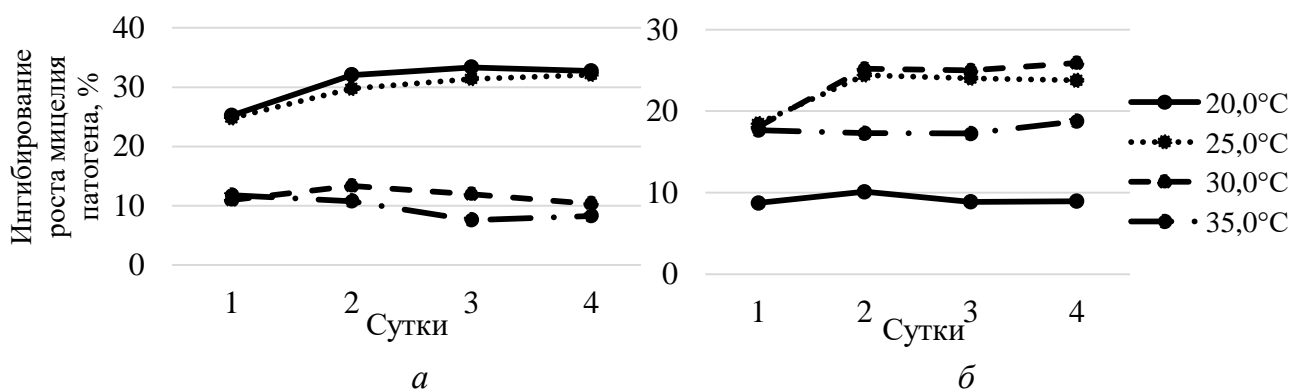


Рисунок 6 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g (а) и *B. subtilis* BZR 517 (б) в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от температуры культивирования

Для штамма *B. subtilis* BZR 336g при повышении температуры культивирования накопление антифунгальных метаболитов снижалось в 2-3 раза: ингибирование мицелия патогена отмечено на уровне 7,60 % на третьей сутки учета. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 отмечена обратная закономерность: понижение температуры приводило к существенному снижению антибиотической активности (до 8,73 %).

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

Подбор рН культивирования

Установлено, что титр клеток, равный $(2,7 \pm 0,07) \times 10^9$ КОЕ/мл в сочетании с антифунгальной активностью на уровне 23,19 % отмечен при pH 8,0 для штамма *B. subtilis* BZR 336g. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 высокие значения титра $(9,8 \pm 0,2) \times 10^8$ и $(9,9 \pm 0,2) \times 10^8$ КОЕ/мл в сочетании с максимальной антифунгальной активностью (47,54 % и 41,80% соответственно) отмечены при pH 6,0 и 8,0 (рисунок 7, 8).

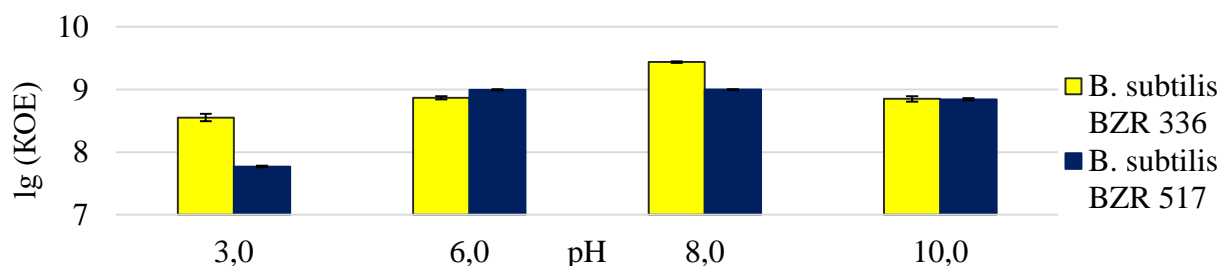


Рисунок 7 – Влияние pH на рост штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в процессе периодического культивирования

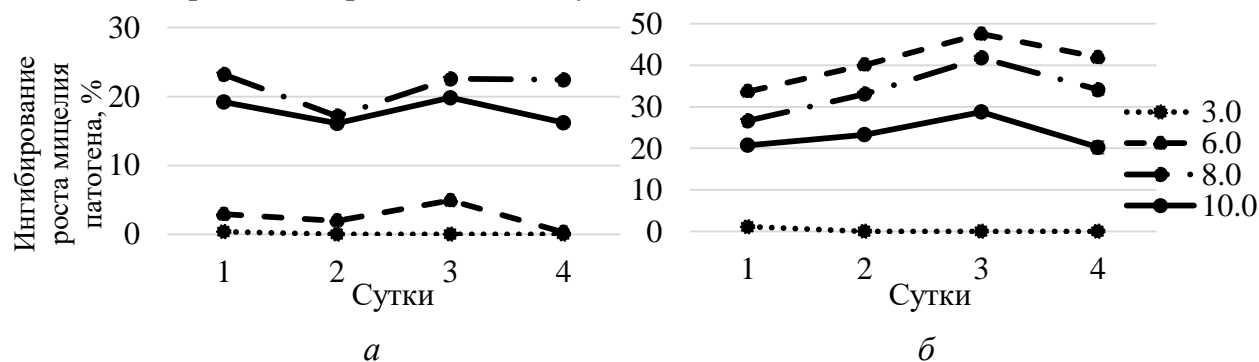


Рисунок 8 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g (а) и *B. subtilis* BZR 517 (б) в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от pH

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.

Время культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

В процессе культивирования исследуемых штаммов были выделены следующие фазы роста (рисунок 9).

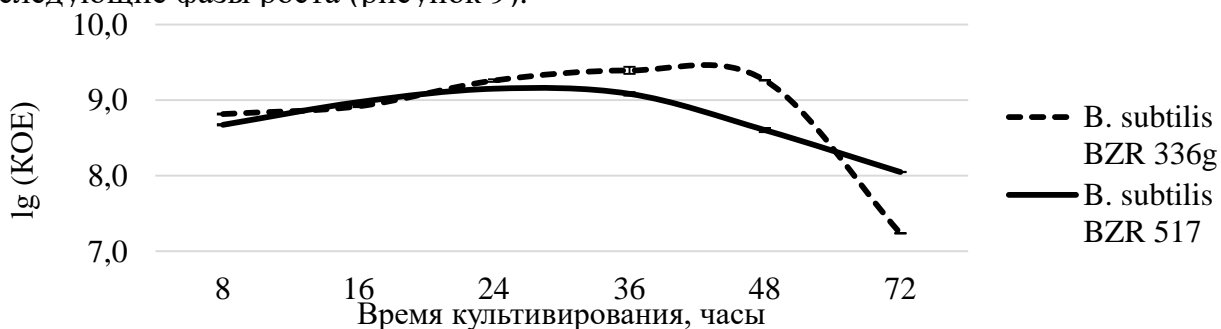


Рисунок 9 – Динамика роста штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 при периодическом культивировании

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.

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 бактериальных 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.

Исследование антибиотической активности показало, что начальный синтез антибиотических веществ исследуемых штаммов был отмечен после восьми часов культивирования (рисунок 10).

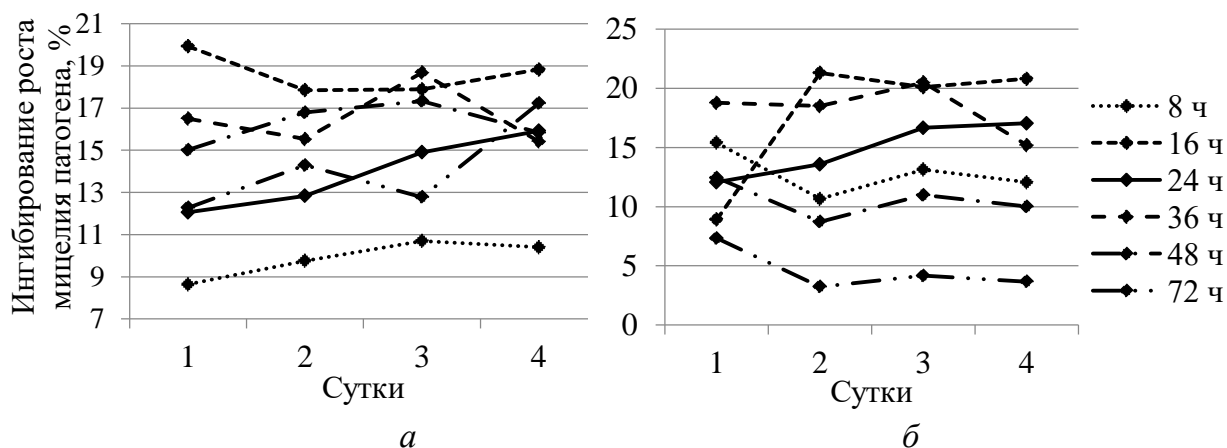


Рисунок 10 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g (а) и *B. subtilis* BZR 517 (б) в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от времени культивирования

В этот период ЖК исследуемых штаммов оказывала лишь статическое действие на возбудителя фузариоза *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 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 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.

3.2 Разработка состава питательной среды для культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

На основании полученных данных была разработана оригинальная оптимизированная питательная среда (ОПС) (таблица 1). В ее состав вошли следующие компоненты: хлористый калий, магний серноокислый, калий фосфорнокислый, кукурузный экстракт, кальций углекислый, железо серноокисное, меласса.

Установлено, что количество КОЕ ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g на ОПС составило $(2,4 \pm 0,2) \times 10^9$ КОЕ/мл, *B. subtilis* BZR 517 – $(4,1 \pm 0,2) \times 10^8$ КОЕ/мл.

Таблица 1 – Рост штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на различных питательных средах в процессе периодического культивирования

Питательная среда	Титр ЖК, КОЕ/мл	
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g	<i>B. subtilis</i> BZR 517
Кинга В (КВ)	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^6$ ^a	$(3,3 \pm 0,2) \times 10^6$ ^a
Картофельно-глюкозная среда (КГС)	$(1,1 \pm 0,03) \times 10^8$ ^b	$(2,4 \pm 0,3) \times 10^6$ ^a
ОПС	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^9$ ^c	$(4,1 \pm 0,2) \times 10^8$ ^b

Исследования антагонистической активности штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в зависимости от состава питательной среды представлены на рисунке 11.

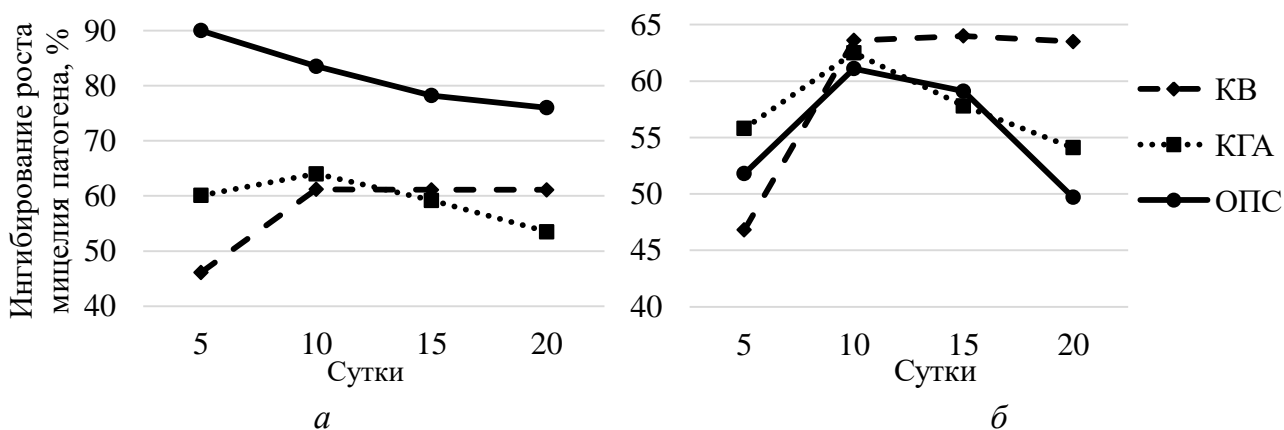


Рисунок 11 – Антагонистическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g (а) и *B. subtilis* BZR 517 (б) в отношении *F. graminearum* BZR 4 в зависимости от питательной среды

Для штамма 336g максимальная антифунгальная активность отмечена на ОПС, тогда как на питательных средах КВ и картофельно-глюкозный агар (КГА) она была значительно ниже. Так, на ОПС антифунгальная активность составила от 76,0 до 90,0 %, на других средах – от 46,1 до 64,0%.

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

Хроматографический анализ показал, что в зависимости от состава питательной среды при культивировании штаммов образуется большое количество соединений, различающиеся как по хроматографической подвижности, так и свечению в ультрафиолетовом свете (рисунок 12).

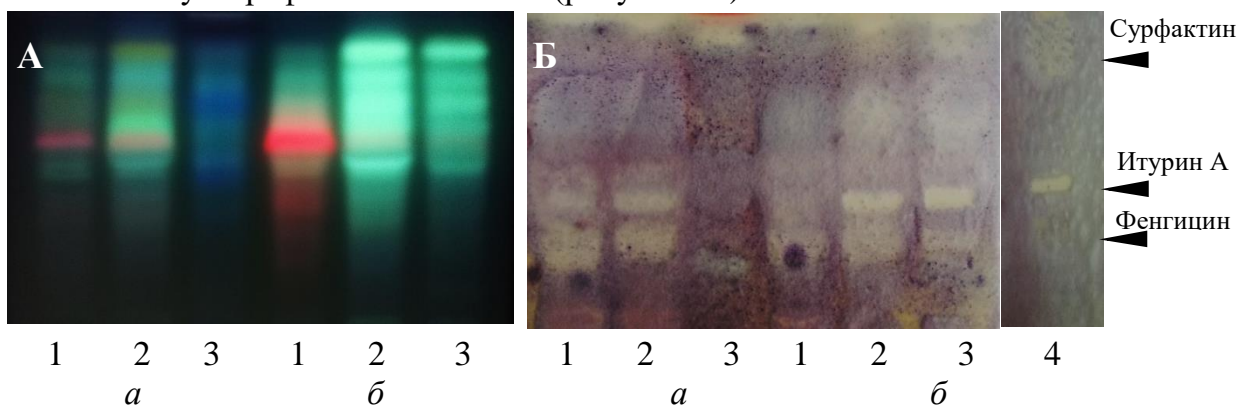


Рисунок 12 – Хроматограммы (А) и биоавтограммы (Б) супернатанта штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в зависимости от питательной среды на силикагелевом носителе (этилацетат-этанол-вода 40:15:15) в УФ 366 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6)

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

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 у штамма *B. subtilis* BZR 336g на среде КВ.

3.3 Биологическая эффективность штаммов *B. subtilis* BZR 336 g и *B. subtilis* BZR 517 на фоне искусственного заражения озимой пшеницы *F. graminearum* BZR 4 в условиях климатической камеры

Результаты исследования биологической эффективности штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на фоне искусственного заражения *F. graminearum* BZR 4 в условиях климатической камеры, на растениях озимой пшеницы сорт Батько представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Биологическая эффективность ЖК на основе штаммов бактерий, полученных с применением различных питательных сред, на фоне искусственного заражения растений озимой пшеницы грибом *F. graminearum* BZR 4, климатическая камера, сорт Батько, 2014 г.

Вариант, норма применения, л/т	Всхожесть, %	Биологическая эффективность, %
Контроль без инфекции	97,6 ^b	
Контроль с инфекцией (обработка водой)	58,8 ^{ab}	68,4/ 100*
Кинто Дуо, КС, химический эталон, 2,5	77,7 ^{ab}	38,9 ^{bc}
Фитоспорин-М, Ж, биологический эталон, 2,0	65,5 ^{ab}	28,9 ^{ab}
КВ		
<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 + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (3,0+2,0)	77,7 ^{ab}	30,1 ^b
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (2,0+1,0)	72,2 ^{ab}	21,5 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (1,0+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 + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (3,0+2,0)	82,2 ^{ab}	27,9 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (2,0+1,0)	75,5 ^{ab}	25,4 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (1,0+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 + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (3,0+2,0)	87,7 ^{ab}	25,4 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (2,0+1,0)	97,7 ^b	37,0 ^{bc}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (1,0+1,0)	94,4 ^b	35,1 ^{bc}
* - 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		

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 озимой пшеницы 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.

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%.

Обработка семян ЖК на основе монокультур штаммов и смеси ЖК штаммов на различных питательных средах показали статистически достоверное увеличение биометрических параметров проростков озимой пшеницы на фоне искусственного заражения *F. graminearum* BZR 4: увеличение длины побега от 17,0 до 25,4 % на среде КГС, от 15,2 до 22,3 % – КВ, от 15,9 до 30,2 % – ОПС, длины корня от 23,8 до 37,3 % на среде КГС, от 28,3 до 39,6% – КВ, от 19,5 до 22,6 % – ОПС, массы побега до 16,9 % на среде КГС, массы корня до 47, 3 на среде КВ. Отмечено, что для вариантов, с применением ОПС характерно более интенсивное увеличение роста и развития надземных частей растений, более дружные и выровненные всходы.

В ходе исследований установлено, что применение ЖК, полученной с использованием ОПС, обеспечивало всхожесть и биологическую эффективность на уровне стандартных сред. Но с учетом того, что компоненты ОПС доступные, а ЖК штаммов на ее основе обладает высокой эффективностью по таким критериям как количество колониеобразующих единиц и антифунгальная активность, ОПС была включена в программу исследований по разработке технологии производства биопрепаратов. Кроме того, установлено, что совместное применение штаммов нецелесообразно, так как значения всхожести и биологической эффективности, полученные в результате применения смеси штаммов в различных соотношениях, достоверно не различаются внутри одной группы.

3.4 Контроль качества и научно-техническая документация для лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

По заключению ФГБУН «Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов» ФМБА РФ штаммы *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 являются безопасными по параметрам вирулентности,

токсичности, токсиногенности и способности к диссеминации и могут быть использованы в качестве промышленных при соблюдении норм и правил санитарного законодательства.

Разработана научно-техническая документация на биопрепарат: ТУ (ГОСТ 2.114-95) и лабораторные регламенты производства (ГОСТ Р 54763-2011).

Отмечено, что лабораторные образцы биопрепаратов на основе штаммов обеспечивают антагонистическую активность в отношении тест-культуры гриба *F. graminearum* BZR 4 от 76,0 до 90,0% для штамма *B. subtilis* BZR 336g, и от 49,7 до 61,1 % для штамма *B. subtilis* BZR 517.

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

Испытания лабораторных образцов биопрепаратов на фоне естественного поражения в условиях мелких делянок были проведены в период с 2013 по 2015 гг. на экспериментальной базе ФГБНУ ФНЦБЗР. Для закладки опыта была использована мягкая озимая пшеница сорта Калым (таблица 3).

Обработку семян лабораторными образцами осуществляли перед посевом, вегетирующих растений – в фазу выхода в трубку (Z 32-35) и в фазу колошения (Z 50-59).

В 2013 г. 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%. В 2014 г. биологическая эффективность в вариантах с применением микробных агентов колебалась в диапазоне от 17,2 до 22,8 % при биологической эффективности в варианте с применением химического эталона – 26,2 %, биологического – 17,4 % (на фоне развития и распространенности фузариозной корневой гнили в контроле на уровне 36,1 и 67,4% соответственно). Но следует обратить внимание, что показатели биологической эффективности в вариантах и эталонах в 2014 г. находились в одной группе и достоверных различий установлено не было. В 2015 г. биологическая эффективность в варианте с применением лабораторного образца на основе штамма *B. subtilis* 336g составила 13,6 %, биологического эталона – 16,0 %, химического эталона – 25,9 % на фоне развития в контроле фузариозной корневой гнили на уровне 25,3 %, распространенности – 95,0 %. При этом в варианте с применением лабораторного образца на основе штамма 517 защитный эффект не отмечен.

Одним из показателей, определяющих сохраненный урожай зерновых культур является масса 1000 зерен. 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.

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 озимой пшеницы, а также обеспечивать сохраненный урожай в условиях мелкоделяночных полевых испытаний.

Таблица 3 – Биологическая и хозяйственная эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336 г и *B. subtilis* BZR 517 против фузариозных корневых гнилей озимой пшеницы в условиях полевого мелкоделяночного опыта, сорт Калым (ФГБНУ ФНЦБЗР, г. Краснодар), 2013-2015 гг.

Вариант, нормы применения, л/т, л/га	2013				2014				2015			
	БЭ, %*	Урожайность, т/га	Сохраненный урожай, т/га	Масса 1000 зерен, г	БЭ, %	Урожайность, т/га	Сохраненный урожай, т/га	Масса 1000 зерен, г	БЭ, %	Урожайность, т/га	Сохраненный урожай, т/га	Масса 1000 зерен, г
Контроль (обработка водой)	22,2/44,4 **	4,0 ^b	–	36,4 ^a	36,1/67,4	6,9 ^a	–	37,8 ^a	25,3/95,0	7,7 ^a	–	36,3 ^a
Химический эталон – Раксил, КС, 0,5 л/га + Альто Супер, КЭ 0,5 л/га	10,0 ^b	6,9 ^c	2,9	38,8 ^c	26,2 ^a	7,0 ^a	0,1	38,5 ^{ab}	25,9 ^a	8,3 ^b	0,6	36,3 ^a
Биологический эталон – Фитоспорин-М, Ж, 1,0 л/га	–	–	–	–	17,4 ^a	7,4 ^c	0,5	36,3 ^c	16,0 ^{ab}	7,5 ^a	0	34,2 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0 л/га	37,5 ^a	7,9 ^a	3,9	37,9 ^{bc}	22,8 ^a	7,2 ^b	0,3	38,5 ^{ab}	13,6 ^{ab}	7,9 ^{ab}	0,1	35,9 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 517, 2,0 л/га	45,0 ^a	7,9 ^a	3,9	36,5 ^{ab}	17,2 ^a	7,6 ^d	0,7	39,9 ^b	0 ^b	7,5 ^a	0	34,0 ^a

* - биологическую эффективность определяли по развитию болезни (Долженко, 2009)

** - распространенность/ развитие 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

-титр ЖК не менее 1,4-2,1x10⁹ КОЕ/мл

Заключения

1. Изучены биотехнологические особенности штаммов *B. subtilis* BZR 336 g и *B. subtilis* BZR 517. Наиболее подходящим источником углерода для обоих штаммов является меласса, оптимальным источником азота – пептон и кукурузный экстракт. Установлена оптимальная температура для культивирования перспективных штаммов бактерий: для штамма *B. subtilis* BZR 336g – 20,0 и 25,0°C, для штамма *B. subtilis* BZR 517 – 30,0°C. Определен оптимум pH для культивирования штаммов бактерий: для штамма *B. subtilis* BZR 336g – 8,0, для штамма *B. subtilis* BZR 517 – 6,0 и 8,0.

2. Выявлено оптимальное время культивирования для штамма *B. subtilis* BZR 336g 36-48 ч, для штамма *B. subtilis* BZR 517– 24-36 ч.

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

4. Установлено, что лабораторные образцы биопрепаратов на основе исследуемых штаммов соответствуют техническим характеристикам современных биопрепаратов: титр составляет не менее $(2,4 \pm 0,24) \times 10^9$ КОЕ/мл для штамма *B. subtilis* BZR 336g и $(1,4 \pm 0,01) \times 10^9$ КОЕ/мл для штамма *B. subtilis* BZR 517; антагонистическая активность по отношению к *F. graminearum* BZR 4 составляет от 70,0 до 90,0% для штамма *B. subtilis* BZR 336g, и от 49,7 до 61,1 % для штамма *B. subtilis* BZR 517; имеют однородный состав, хорошо растворимы в воде.

5. Разработаны технические условия и лабораторные регламенты производства биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517.

6. Установлено, что обработка семян и растений озимой пшеницы лабораторными образцами биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в условиях полевого мелкоделяночного опыта обеспечила биологическую эффективность против корневой гнили фузариозной этиологии от 13,6 до 45,0 % на фоне развития болезни 22,2-36,1%, распространенности – 44,4-95,0 %, величина сохраненного урожая составила 0,1-3,9 т/га.

Практические рекомендации

1. Проведенные исследования позволяют рекомендовать штаммы для использования научно-исследовательскими учреждениями и коммерческими организациями для создания новых отечественных биопрепаратов.

2. С целью снижения вредоносности фузариозных корневых гнилей на озимой пшенице рекомендуется проводить обработку семян и вегетирующих растений лабораторными образцами биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517, полученных с использованием оригинальных

питательных сред и оптимальных условий культивирования, после проведения процедуры государственной регистрации.

Список опубликованных работ

Публикации в изданиях ВАК, специальность «Биотехнология»

1. 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.

2. **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. Асатулова // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. – 2021. – Т. 35. – С. 61-73. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.35.61>

Публикации в изданиях, входящих в БД Scopus, WoS

1. Conditions for the cultivation of new *Bacillus* bacteria being micro bioproduct producers / А. М. Asaturova, **A. I. Nomyak**, N. S. Tomashevich [et al.] // Journal of Pure and Applied Microbiology. 2015. – V. 9. – № 4. – P. 2797-2804.

2. Сидорова, Т.М. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в биологическом контроле фитопатогенных микроорганизмов / Т.М. Сидорова, А.М. Асатулова, **А.И. Хомяк** [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53. – № 1. – С. 29-37. doi: 10.15389/agrobiology.2018.1.29rus

3. Выделение и характеристика антигрибных метаболитов штаммов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus subtilis* BZR 517 модифицированным методом биоавтографии / Т.М. Сидорова, А.М. Асатулова, **А.И. Хомяк** // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. № 1. С. 178-185. doi: 10.15389/agrobiology.2019.1.178eng

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

Прочие публикации:

1. **Хомяк, А.И.** Определение оптимальных условий культивирования новых бактерий рода *Bacillus* – продуцентов биофунгицидов / **А.И. Хомяк** // Тезисы докладов VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Научное обеспечение АПК» – Краснодар, 26-28 ноября 2013 г. – Т. 1. – С. 51-53.

2. **Хомяк, А.И.** Оптимальные условия культивирования новых бактерий рода *Bacillus*, перспективных для разработки на их основе биофунгицидов / **А.И. Хомяк**, А.М. Асатулова, Т.М. Сидорова // Материалы 8-й Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений - основа стабилизации экосистем. Инновационные технологии применения биологических средств защиты растений в производстве органической сельскохозяйственной продукции», Краснодар, 16-18 сентября 2014 г. – С. 298-301.

3. Физиологические признаки бактерий рода *Bacillus* - перспективных продуцентов биофунгицидов / А.М. Асатулова, **А.И. Хомяк**, Н.С. Томашевич [и др.] // Наука Кубани. – 2014. – №1. – С. 12-15.

4. **Хомяк, А. И.** Разработка технологии получения нового экологически безопасного биофунгицида на основе бактерий *Bacillus subtilis* для защиты озимой пшеницы от экономически значимых болезней / **А. И. Хомяк**, А. М. Асатулова // Молодой ученый. Материалы научно-образовательной конференции молодых ученых «Инновационные биотехнологии в развитии АПК». – 2015. – № 9-2 (89) – С. 82-83.
5. Разработка технологии получения новых бактериальных биофунгицидов для защиты растений / **А.И. Хомяк**, А.М. Асатулова, Т.М. Сидорова [и др.] // Материалы Международного саммита молодых учёных «Современные решения в развитии сельскохозяйственной науки и производства» – Краснодар, 26-30 июля 2016 г. – С. 225-230.
6. **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» – Уфа, 13-17 июня 2018 г. – С. 244.
7. Эффективность инокуляции семян озимой пшеницы бактериями рода *Bacillus*, перспективными для создания биопрепаратов / А.М. Асатулова, 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
8. Экологизированная система защиты пшеницы на основе новых оригинальных биофунгицидов / А. М. Асатулова, Н.С. Томашевич, Н.А. Жевнова [и др.] // Таврический вестник аграрной науки. – 2019. – № 1(17). – С. 31-42. DOI 10.33952/2542-0720-2019-1-17-31-42
9. Изучение антагонистических и ростстимулирующих свойств штаммов *Bacillus subtilis*, перспективных для создания эффективных биофунгицидов / А.М. Асатулова, Т.М. Сидорова, Н.С. Томашевич [и др.] // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2020. – Т. 21. – № 3. – С. 263-272. DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2020.21.3.263-272>

Патенты

1. Биофунгицид для защиты сельскохозяйственных культур от болезней и повышения урожайности: пат. 2621356 Рос. Федерация: МПК А01N 63/00 С12N 1/20 / А.М. Асатулова, Н.С. Томашевич, Н.А. Жевнова, **А.И. Хомяк** [и др.]. заявитель и патентообладатель ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений». – № 2015151901/13; заявл. 03.12.2015; опубл. 02.06.2017, бюл. № 16. – 13 с.

Благодарности.

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, к.б.н., директору, в.н.с. лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ФНЦБЗР Асатуровой А.М. за научно-методическое руководство и помощь в выполнении диссертационной работы, а также сотрудникам лаборатории н.с. Жевновой Н.А., с.н.с., к.б.н Сидоровой Т.М., с.н.с., к.с.-х.н. Томашевич Н.С., н.с. Дубяге В.М., м.н.с. Павловой М.Д., н.с. Козицыну А.Е., н.с. Сидорову Н.М., лаборанту-исследователю Королевой О.Ф. за оказанную помощь. За ценные советы и замечания – к.б.н., в.н.с. лаборатории химической коммуникации и массового разведения насекомых В.Я. Исмаилову, рук. отдела интеллектуальной собственности и инновационного развития, к.с.-х.н. Ермоленко С.А.