

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

На правах рукописи

Хомяк Анна Игоревна

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

1.5.6 – биотехнология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
канд. биол. наук
Асатурова Анжела Михайловна

Краснодар – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Биопрепараты для защиты растений на основе бактерий-антагонистов в России и в мире.....	12
1.2 Эффективность применения биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов в защите растений.....	18
1.3 Условия культивирования штаммов-продуцентов биопрепаратов.....	23
1.3.1 Температурный режим.....	24
1.3.2 pH.....	26
1.3.3 Источники углеродного питания.....	28
1.3.4 Источники азотного питания.....	32
1.4 Динамика роста штаммов-продуцентов биопрепаратов.....	35
1.5 Оптимизация условий культивирования и разработка технологии получения биопрепаратов.....	38
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	41
2.1 Определение культурально-морфологических признаков штаммов <i>B. subtilis</i> BZR 336g и <i>B. subtilis</i> BZR 517.....	41
2.2 Определение оптимальных условий культивирования штаммов <i>B. subtilis</i> BZR 336g и <i>B. subtilis</i> BZR 517.....	42
2.3 Выделение, хроматографический анализ и анализ антифунгальной активности бактериальных метаболитов	45
2.4 Биологическая эффективность штаммов <i>B. subtilis</i> BZR 336g и <i>B. subtilis</i> BZR 517 на фоне искусственного заражения озимой пшеницы <i>F. graminearum</i> BZR 4 в условиях климатической камеры.....	47
2.5 Эффективность применения лабораторных образцов биопрепаратов на фоне естественного поражения корневой гнилью фузариозной	

этиологии в условиях полевого мелкоделяночного опыта.....	49
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	53
3.1 Культурально-морфологические признаки и идентификация штаммов <i>B. subtilis</i> BZR 336g и <i>B. subtilis</i> BZR 517.....	53
3.2 Исследование оптимальных условий культивирования штаммов <i>B. subtilis</i> BZR 336g и <i>B. subtilis</i> BZR 517.....	55
3.3 Разработка состава питательной среды для культивирования штаммов <i>B. subtilis</i> BZR 336g и <i>B. subtilis</i> BZR 517.....	83
3.4 Биологическая эффективность штаммов <i>B. subtilis</i> BZR 336g и <i>B. subtilis</i> BZR 517 на фоне искусственного заражения озимой пшеницы <i>F. graminearum</i> BZR 4 в условиях климатической камеры.....	90
3.5 Контроль качества лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов <i>B. subtilis</i> BZR 336g и <i>B. subtilis</i> BZR 517.....	95
3.6 Разработка технических условий и лабораторных регламентов производства биопрепаратов на основе штаммов <i>B. subtilis</i> BZR 336g и <i>B. subtilis</i> BZR 517.....	97
3.7 Эффективность применения лабораторных образцов биопрепаратов на фоне естественного поражения корневой гнилью фузариозной этиологии в условиях полевого мелкоделяночного опыта.....	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	107
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	137

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ЖК – жидкая культура

КВ – среда Кинга В

КГА – картофельно-глюкозный агар

КГС – картофельно-глюкозная среда

КОЕ – колониеобразующая единица

л/т, га – литр на тонну, на гектар

ЛР – лабораторный регламент

МПА – мясо-пептонный агар

ОПС – оптимизированная питательная среда

ТУ – технические условия

ЧП – чашка Петри

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Среднемировой уровень потерь урожая вследствие поражения сельскохозяйственных растений фитопатогенными микроорганизмами оценивается на сегодняшний день в 12 %. 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, Kumara, Singh, 2018; Бугрова, Власова, Ротанова 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. В связи с этим существует ряд особенностей (Маслиенко, 2004; Новикова и др., 2003; Павлюшин, 2010; Кирсанова, 2011; Максимов, Максимова, Сарварова и др., 2018; Lengai, Muthomi, 2018; Дроздова, Сорокина, 2019):

- снижение биологической активности и титра при длительном хранении;
- чувствительность к факторам окружающей среды;
- потеря активности штаммов-продуцентов биопрепаратов;
- критическое или ограниченное время применения;
- короткое остаточное время действия;
- загрязнение посторонней микробиотой.

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. При оптимальном подборе всех компонентов по качественному и количественному составу, среда обеспечивает достаточно быстрый рост и развитие популяции микроорганизмов и считается сбалансированной (Abbey, Abbey, Leke- Aladekoba, et al., 2019; Якименко, Бегун, Сорокина, 2020).

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

Степень изученности темы

Исследование патентных документов и научных статей показало, что в настоящее время существует большой набор бактерий-антагонистов, которые могут послужить основой для биопрепаратов. Заявители патентов и авторы научных статей в своих работах широко освещают результаты исследований по антифунгальной активности биоагентов в отношении различных патогенов, по биологической эффективности и ростстимулирующему эффекту (Asaturova, Dubyaga, Tomashevich et al., 2012; Abada, El-Hendawy, Osman, 2014; Штерншис, Беляев, Цветкова, 2016; Toral, Rodríguez, Béjar et al., 2018). Однако вопросы технологии производства биопрепаратов и требования к их конечным характеристикам не столь проработаны (Köhl, Postma, Nicot et al., 2011; Trejo, Serrano-Carreón, Patiño et al., 2013; Wachowska, Kucharska, Jędrzycka et al., 2013; Ndolo et al., 2019). Если за рубежом появляется все большее число публикаций, касающихся разработки новых микробиологических препаратов для защиты растений, то в современной российской научной литературе таких публикаций крайне мало (Бурова, 2012; Леонтьева, Кузина, Логинов, 2013; Холод, 2014; Четвериков, Асабина, Логинов, 2016).

Многие авторы подчеркивают узкий спектр действия биопрепаратов и нестабильность защитного и стимулирующего действия (Митина, Резвякова, 2012; Резанова, 2013; Табакова, Чухина, 2015; Соболева, 2018; Essiedu, Adepoju, Ivantsova, 2020). Одной из причин этого является недостаточное изучение биологических особенностей штаммов – продуцентов и отсутствие современных стандартов и биотехнологий получения биопрепаратов для защиты растений в России.

Цель и задачи исследования.

Цель работы: 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 336g 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 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.

Степень достоверности и апробация работы

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

Результаты исследований докладывались на VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Научное обеспечение АПК», г. Краснодар, 26-28 ноября 2013 г.; VIII Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем», г. Краснодар, 16-18 сентября 2014 г.; VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», г. Москва, 17-20 марта 2015 г.; Научно-образовательной конференции молодых ученых «Инновационные биотехнологии в развитии АПК», г. Краснодар, 25-28 мая 2015 г.; Международном саммите молодых ученых «Современные решения в развитии сельскохозяйственной науки и производства, г. Краснодар, 26-30 июля 2016 г.; IX Международной научно-

практическая 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.

Работа выполнена при финансовой поддержке: У.М.Н.И.К. № 6533ГУ/2015 от 08.06.2016, Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере; гранта РФФИ № 13-08-96533 р_юг и администрации Краснодарского края, 2013-2015 гг; Межгосударственной целевой программы "Инновационные биотехнологии" ЕврАзЭС и Министерства образования, науки и молодежной полититки Краснодарского края (государственный контракт № 16.М04.11.0026 от 15.07.2011, 2011-2013 гг.; государственный контракт № 14.М04.12.0012 от 27.07.2014, 2014-2015 гг.).

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

Личный вклад соискателя

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.

Благодарности

За научно-методическое руководство и помощь в выполнении диссертационной работы автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, к.б.н., директору, в.н.с. лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ФНЦБЗР Асатуровой А.М., 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.

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* (Perez-Garcia, Romero, de Vicente et al., 2011; Jorjani, Heydari, Zamanizadeh et al., 2012 Штерншис, 2012; Chen X., Zhang Y., Fu et al., 2016). А бактерии вида *Bacillus subtilis* являются наиболее продуктивными и перспективными представителями рода *Bacillus* в микробиологической промышленности (Асатурова, Дубяга, Томашевич, и др., 2012; Asaturova, Dubyaga, Tomashevich et al., 2012; Casals, Elmer, Vinas et al., 2012; Власова, Данилец, Передериева и др., 2019; Twizeyimana, Hartman, 2019; Djaenuddin, Muis, 2020; Уромова, Козлов, 2020).

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

- высокая антифунгальная активность (Palazzini, Ramirez, Torres et al., 2011; Hinarejos, Castellano, Rodrigo et al., 2016; Vejan, Abdullah, Khadiran, 2016);

- быстрый антагонистический эффект (Nihorimbere, Ongena, Smargiassi, 2011; Dhiraj, Shiv, Aanand et al., 2014; Villa-Rodríguez, Parra-Cota, Castro-Longoria et al., 2019);

- способность бацилл к колонизации различных частей растения и образование биопленок в ризосфере и на листовой поверхности (Zhang, Wu, He, et al., 2011; Mousivand, Jouzani, Monazah et al., 2012; Xu, Shao, Li et al., 2013; Arnaouteli, Bamford, Stanley-Wall et al., 2021);

- отсутствие устойчивости у патогенов к бациллам и продуцируемым ими соединениям (Abriouel, Franz, Omar, 2011; Dunlap, Schisler, Price et al., 2011; Glick, 2012);

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

- совместимость с химическими препаратами (Азизбеян 2013; Constantinescu, Siciua, Fatu et al., 2014; Ji, Li, Meng et al., 2019).

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

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

В настоящее время биопестициды составляют 2 % средств защиты растений, используемых в мире. Однако наблюдается тенденция к увеличению производства биологических средств защиты растений. В последние годы производство химических пестицидов уменьшается на 2 % в год, в то время как производство биопестицидов ежегодно увеличивается на 20 %. Мировое производство биопестицидов составляет в среднем 3000 тонн в год, а использование биопестицидов каждый год стабильно увеличивается на 10%. По данным BCC Research к 2017 году рынок биологических

пестицидов превысит 3,7 млрд. долларов в год со среднегодовым темпом роста в 12 % (Kumar, Singh, 2015; Mishra, Tewari, Singh, et al., 2015).

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

Кроме того, исследованием свойств штаммов-продуцентов и разработкой биопрепаратов активно занимаются научно-исследовательские институты Европы: Plant Protection Institute (Словакия), Swedish University of Agricultural Sciences (Швеция), Plant pathology research institute (Италия), The New Zealand Institute for Plant & Food Research Limited (Новая Зеландия), Institute of Biology Leiden (Нидерланды); Азии: King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (Тайланд), Northwest A&F University, College of Life Sciences, Tianjin University of Science and Technology, (Китай), Северной и латинской Америки: National Center for Agricultural Utilization Research

(США), Universidad Nacional de Colombia (Колумбия), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (Бразилия), Centro de Investigación de Ciencias Biológicas, (Мексика); Африки: Arid lands research institute (Египет). С каждым годом смягчается налогообложение организаций, осуществляющих научные исследования, увеличиваются объемы финансирования (Leng, Zhang, Guangtang, 2011).

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

Российское сельское хозяйство обладает мощным потенциалом для производства экологического сельскохозяйственного сырья, и одним из перспективных направлений развития сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности РФ является продвижение экологического сельхозсырья и экологических продуктов питания, прежде всего, для внутреннего потребления, а также на зарубежные рынки. В России рынок экологически безопасной продукции еще только формируется (Митина, 2012; Ефремов, 2015). Одна из основных причин такого отставания от Запада – отсутствие на российском рынке широкого ассортимента биологических средств защиты растений (Терентьев, Ковалёва, 2018; Ванюшина, 2019).

Исследование патентных документов и научных статей показало, что в настоящее время существует большой набор бактерий-антагонистов, которые могут послужить основой для биопрепаратов. Заявители патентов и авторы научных статей в своих работах широко освещают результаты исследований по антифунгальной активности биоагентов в отношении различных патогенов, по биологической эффективности и ростстимулирующему эффекту (Asaturova, Dubyaga, Tomashevich et al., 2012; Abada, El-Hendawy, Osman, 2014; Штерншис, Беляев, Цветкова, 2016; Toral, Rodríguez, Béjar et al., 2018). Однако вопросы технологии производства биопрепаратов и требования к их конечным характеристикам не столь проработаны (Köhl, Postma, Nicot et al., 2011; Trejo, Serrano-Carreón, Patiño et al., 2013; Wachowska, Kucharska, Jędrzycka et al., 2013). Если за рубежом появляется все большее число публикаций, касающихся разработки новых микробиологических препаратов для защиты растений, то в современной российской научной литературе таких публикаций крайне мало (Бурова, 2012; Леонтьева, Кузина, Логинов, 2013; Холод, 2014; Четвериков, Асабина, Логинов, 2016).

При этом российский рынок биологических средств защиты растений обладает значительным потенциалом развития, свидетельством чего является сравнение его объема с рынками других стран. По состоянию на начало 2019 года российский рынок в 5,5 раз меньше рынка ЕС и в 10,5 раз меньше рынка США.

В 2019 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 (Маркетинговые исследования российского рынка биологических средств защиты растений, 2019).

Сегодня производством биологических средств защиты растений занимаются как частные предприятия, так и станции защиты растений, которые в большинстве своем являются государственными компаниями и имеют минимальные мощности (Российский рынок биологических средств защиты растений, 2014).

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

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

Минина, Захарова, Уразбахтина и др., 2009; Леонтьева, Кузина, Логинов, 2013).

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

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

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

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

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

Урожайность по сравнению с контролем увеличивалась на 0,3 т/га. (Резанова, 2013).

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

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

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

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

Препарат Бактофит содержит живые клетки бактерий *B. subtilis*, штамм ИПМ-215. Протравливание Бактофитом семян яровой пшеницы перед высадкой снижает зараженность *B. sorokiniana* в 3 раза. На фоне Бактофита средний индекс развития корневых гнилей оказался в 2,6 раза ниже контроля. Бактофит позволил сохранить более существенную часть урожая (18 %, или 4,6 ц/га) (Коробова, Гаврилец, 2005).

В Дагестане с целью оздоровления плантаций Бактофит был протестирован на винограде. В ходе исследований установлена биологическая эффективность Бактофита против милдью на листьях – 64 %, оидиума на гроздьях – 81 % (Астарханова, Астарханов, Савзиева и др., 2010).

Установлено, что при использовании препарата Бактофит отмечено выраженное снижение пораженности яблони паршой и мучнистой росой. Биологическая эффективность в отношении парши достигала 99 %, при подавлении мучнистой росы – 96 % (Якуба, Гусин, 2010).

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

Другим биофунгицидом на основе спорообразующих бацилл является препарат Алирин-Б, содержащий бактерии *B. subtilis* штамм В-10 ВИЗР.

Отмечено, что наиболее интенсивная окраска проростков капусты наблюдалась в варианте с применением Алирина-Б, а всходы были выше, чем в контроле на 14 %. Кроме того, биопрепарат обеспечивали более ранние всходы (Пакина, Сысолятина, Слободянюк, 2011).

В 2011 г. Россельхозцентром по Ставропольскому краю были проведены производственные испытания фунгицидов на озимой пшенице. В варианте, где применяли Алирин-Б, биологическая урожайность составила 50,4 ц/га, прибавка урожая – 14,6 ц/га. Дополнительный доход хозяйства от применения Алирина-Б при цене реализации 4 руб. за 1 кг составил 6240 руб./га. Применение биопрепарата (ввиду его низкой гектарной стоимости) окупилось в 37 раз (Стамо, Кузнецова, 2012).

Установлено, что предпосевная обработка семян озимой ржи и озимой тритикале Алирином-Б, снижала внутрисеменную инфекцию (*Fusarium spp.*) с 50 до 28 %, а биологическая эффективность против корневых гнилей на стадии всходов составила 50 % (Шешегова, Щеклеина, Кедрова, 2012).

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

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.

Исследования, проведенные в 2010 г. сотрудниками Башкирского государственного аграрного университета, показали, что обработка семян яровой пшеницы за 10 дней до посева обеспечивала полевую всхожесть на 2,1 % выше, чем в контроле, развитие корневых гнилей было меньше, чем в контроле, на 12,5 %, пораженность гельминтоспориозом снизилась до 8,2 %, фузариозом – до 2,0 %. Применение Фитоспорина-М способствовало формированию большего числа зерен в колосе, а также благодаря лучшей выполненности зерновки увеличению массы 1000 зерен и массы зерна с одного колоса (Давлетшин, Сафин, Аюпов, 2010).

Установлено, что обработка Фитоспорином-М в условиях закрытого грунта снижала пораженность огурцов корневыми гнилями до 25 %, пораженность томатов фитофторозом до 31 % (Крыницкая, Гамаюрова, Астраханцева и др., 2011).

Сотрудниками Курганинского НИИСХ в исследованиях 2013 г., проведенных на растениях яровой пшеницы, обнаружено, что биологическая эффективность препарата Фитоспорин-М против корневых гнилей составила 34-43 %, что обеспечило дополнительный урожай 3,9 ц/га. (Цыпышева, 2014).

Отмечено, что Фитоспорин-М снижает распространение фитофтороза на перце до 25 % (50 % в контроле), обеспечивая товарность до 95 % (Антонова, 2014).

Обнаружено положительное влияние Фитоспорина-М на формирование индуцированной устойчивости у растений. Так, обработка Фитоспорином-М снижала активность гидролаз в листьях и повышала активность их ингибиторов, что говорит об индуцировании у растений

защитной реакции против патогенов (Пусенкова, Ильясова, Максимов и др., 2015).

Кроме того, доказана способность штаммов *B. subtilis* 26D повышать устойчивость растений не только к болезням, но и к абиотическим стресс-факторам – засолению и дефициту влаги. После 24 часов действия соли инокулированные проростки отставали в росте в среднем на 13 %, тогда как инокулированные не отличались по размеру от контрольных растений (Хайруллин, Недорезков, Мубинов, и др., 2007).

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

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

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

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

формирование индуцированной устойчивости у растений рапса при использовании препарата Serenade (Lahlali, Peng, Gossen, et al., 2013).

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

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

Обработка растений рукколы, капусты, редьки и горчицы препаратами Companion (*B. subtilis* GB03) и Triathlon BA (*B. amyloliquefaciens* D747), способствовала увеличению надземной части растений более, чем на 28%, по сравнению с контролем. Поражение корней растений *Pythium* spp. отмечено на уровне 17-75 % для препарата Companion, 67-83% для препарата Triathlon BA в зависимости от культуры (McGehee, Raudales, Elmer, et al., 2019).

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

1.3 Условия культивирования

Действующим началом биопрепаратов являются живые клетки микроорганизмов, в связи с чем особое значение на стадии производства биопрепарата имеет чувствительность биоагента к факторам окружающей

среды. Так, температура влияет на скорость клеточных реакций, природу метаболизма, пищевые потребности и состав биомассы. Значение 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, 1978; Мосичев и др., 1982; Diaz de Velegas et al., 2005; Moita, Feio, Nunes et al., 2005; Kim, Kong, Baek et al., 2006).

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 (Четвериков и др., 2006; Glare, 2012; Khater, 2012; Gašić S., Tanović, 2013).

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 (Klein, Weber, Marahiel, 1999).

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 (Kambourova, Kirilova, Mandeva et al., 2003). В то же время понижение температуры может способствовать уплотнению мембранных липидов и, как следствие, снижению активности ферментов и растворимости растворимых молекул (Shafi, Mingshan, Zhiqiu et al., 2017).

Снижение температуры роста бактерий может привести к большому увеличению (на 10-20 %) выхода биомассы, рассчитанного по источнику углерода. Так в 2013 году сотрудниками Петрозаводского государственного университета были проведены исследования влияния динамики температуры на активность *Pseudomonas alcaligenes* и *Pseudomonas cichoril*. Бактерии культивировали при температуре от 5 до 35°C. В ходе исследований установлено, что наибольшая скорость роста исследуемых штаммов наблюдается при температуре 15 °C. По результатам изучения влияния температуры на особенности роста и скорость генерации *P. alcaligenes* и *P. cichoril* можно отметить, что температура выполняет ведущую роль в популяционной изменчивости бактерий. Оптимальный температурный диапазон наряду с питательным субстратом является направляющим и стабилизирующим фактором отбора (Обухова, 2013).

Также положительное влияние низких температур на продуктивность бактерий было отмечено в исследованиях A.R. Kazim и S.B. Alden в 2014 году. Установлено, что антифунгальная активность *B. subtilis* в отношении *Aspergillus niger* при инкубировании при 50°C отличалась от контроля незначительно (диаметр зоны ингибирования составил 19 мм, в контроле – 20 мм), в то время как зона ингибирования *A. niger* при инкубировании при 4°C

составила 25 мм. Однако в исследованиях Усанова В.С. с соавторами (2020), установлено, что повышение температуры культивирования *B. subtilis* до 40 °С положительно сказывается на динамике роста бактерии, количество колониеобразующих единиц превышает контроль на 88,9%.

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

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

Изменение температуры культивирования оказывает влияние на РНК, белок и липидный состав клеток бактерий. При одной и той же скорости роста содержание РНК в бактериях при снижении температуры увеличивается в несколько раз. Общее содержание белка в клетках при снижении температуры может увеличиваться или уменьшаться в зависимости от природы лимитирующего субстрата (Перт, 1978).

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

1.3.2 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 флокуляция биомассы), активность ферментов, оказывает влияние на диссоциацию кислот и оснований. Это может быть, как непосредственное влияние ионов водорода или гидроксильных ионов на клетку, так и косвенное воздействие через изменение степени диссоциации веществ субстрата (Перт, 1978).

Многие бактериальные организмы, образующие антибиотики, лучше развиваются при нейтральном значении исходной активной 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.

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 ($5,0-8,4 \times 10^5$ КОЕ/мл) (Mohapatra, Samantaray, Samantaray, 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, 2000).

В ходе развития организмов pH среды не остается постоянным, а зависит как от состава субстрата, так и от физиологических особенностей культивируемых микроорганизмов (Емельяненко, 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, 2010).

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

Таким образом, 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 (Płaza, Turek, Król, 2013). На метаболизм источников углерода и энергии могут также оказывать влияние удельная скорость роста и содержание источника углерода – присутствует ли он в избытке или в количестве, лимитирующем рост (Перт, 1978).

Так, отмечено, что при выращивании штамма *B. subtilis* SPB1 на среде с глюкозой выход сурфактина при концентрации в среде глюкозы 40 г/л составил 720 ± 7 мг/л, а при увеличении концентрации глюкозы в среде до 45 г/л, количество сурфактина снизилось до 690 ± 6 мг/л (Ghribi, Ellouze-Chaabouni, 2011). Эти данные подтверждены исследованиями, в ходе которых установлено, что высокая концентрация глюкозы (50-60 г/л) может привести к накоплению избыточной глюкозы в среде, что приводит к низкому pH и, как следствие, снижению *B. subtilis* производства сурфактина (Chen, Juang, Wei, 2015).

Эти результаты подтверждает многочисленные данные, согласно которым существует некий оптимум насыщения среды питательными компонентами, превышение которого быстро приводит к угнетению роста культуры из-за накопления в среде продуктов ее жизнедеятельности (Lee, 1996; Перерва, 2011).

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

Так, в 2013 году были проведены исследования влияния сахарозы на толщину и плотность биопленок, образуемых *B. subtilis*. Отмечено, что на среде, богатой сахарозой, исследуемые штаммы образовывали биопленки толщиной до 140 мкм, что в десятки раз превышало толщину бактериальных пленок на средах, бедных сахарозой. Кроме того, биопленки на средах, обогащенных сахарозой, образовывали более складчатую структуру и были прочнее, что свидетельствует об увеличении механической прочности бактериальных биопленок под действием сахарозы (Dogsa, Brloznik, Stopar et al., 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 (Tumbariski, Petkov, Denkova, 2015).

Также часто используются соли органических кислот (уксусной, пропионовой, молочной, пировиноградной) и спирты (глицерин, маннит). Так, добавление в среду культивирования *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* уксуснокислого аммония в концентрации 0,10 % и лимоннокислого натрия в концентрации 0,15 % не только сохраняло их антифунгальную активность по отношению к плесневым грибам *A. niger* и *Penicillium granulatum*, но и повышало ее на 14-16 % (Саубенова, 2012).

Часто в промышленном производстве в качестве источника углерода используются крахмал и крахмалсодержащие субстраты (кукурузная, соевая мука и т.д.) (Егоров, 2004; Al-Bahry, Al-Wahaibi, Elshafie et al., 2013). Так, максимальный синтез амилазы штаммом *Bacillus* sp. был отмечен на среде с крахмалом в качестве источника углерода – $80,1 \pm 1,8$ Ед / мл. При этом значительное сокращение амилазной активности изолята наблюдали, когда в среду были внесены ксилоза, сахароза, лактоза и манноза (Khusro et al., 2017).

По данным литературы, уровень накопления биомассы не всегда коррелирует с показателями спорообразования, которое репрессируется, в

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

Ученые из Малайзии протестировали в качестве источника углерода отходы производства пальмового масла (ОППА) с целью повышения продукции сурфактина штаммом *B. subtilis* ATCC 21332. Установлено, что быстрый рост бактерий отмечен на средах, содержащих 10, 30 и 50 % ОППА, при 70 % ОППА рост бактериальной культуры существенно замедлялся. Отмечено, что с уменьшением концентрации ОППА в среде, увеличивалась скорость роста бактериальной культуры. Концентрация ОППА 70 % также оказала негативный эффект на производство сурфактина. Максимальная концентрация сурфактина (30-35 мг/л) была зафиксирована при 50 % ОППА в среде (Abas, Kader, Khalil et al., 2013).

В состав регламентной среды для культивирования аспорогенной культуры *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*, проявляющей высокую инсектицидную активность в отношении насекомых отряда *Lepidoptera*, входят соевая мука, крахмал картофельный и минеральные соли. Существенным недостатком питательной среды является высокая стоимость, обусловленная высокими ценами на компоненты питательной среды. В 2014 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.

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

1.3.4 Источники азотного питания

Метаболизм источника азота обеспечивает главным образом синтез белков, нуклеиновых кислот и полимеров клеточной стенки. Пул аминокислот в цитоплазме составляет 0,2-5 % веса сухой массы. Азот бактериальных клеток составляет до 12 % веса сухой массы; в грибах – 10 % сухого мицелия (Hernández, Sandoval, Mallerman, et al., 2015).

Различными микроорганизмами могут быть использованы очень многие источники азота, включая неорганические и органические его формы (Sharma, Sharma, Kanwar, 2012; Yoon, Sanford, Löffler, 2015). Так, неорганические источники азота (NH_4NO_3 , NaNO_3) обеспечивали более интенсивную продукцию сурфактина штаммом *B. subtilis* 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, Bashandy, Ibrahim, 2005).

Эта закономерность отмечена в исследованиях по оптимизации среды для культивирования *Pseudomonas aureofaciens* 2006, осуществленных в 2012

году Ю.А. Буровой. Лучший результат отмечен в варианте с нитратной формой азота при концентрации 2 г/л (прирост биомассы 12,5 г/л). Титр активных клеток составил в среднем 10^9 – 10^{10} КОЕ/мл. При использовании аммонийного азота прирост биомассы составил в среднем на 9,5 % меньше предыдущего варианта. В варианте с нитратом аммония максимум биомассы составил 11,4 г/л при концентрации 2 г/л.

Часто фактором роста служат аминокислоты. В клеточном белке индивидуальные аминокислоты составляют 1-5 % от всего белка, на основании чего можно приблизительно оценить количество аминокислот, необходимых в качестве факторов роста. Некоторые бактерии, нуждающиеся в нескольких аминокислотах, растут лучше при внесении в среду одной или более аминокислот в форме пептидов. Так, внесение в среду для культивирования штамма *B. circulans*, выделенного из ризосферы люцерны, DL-метионина в концентрации 4 г/л увеличивало выход цефалоспорино-С, оказывающего выраженный антибактериальный эффект (Abada, El-Hendawy, Osman et al., 2014). Добавление в питательную среду для культивирования *B. subtilis* ZK-H2 L-аспарагина, L-глутамина, и L-пролина способствовало увеличению синтеза итурина А на 32,81% по сравнению с контролем (Yue, Zhong, Li et al., 2021).

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

По мнению некоторых исследователей для активной продукции бактерицинов возможно использовать бедные по азоту среды, так как в этом случае создаются лучшие условия для их наработки, что дает возможность

бактериям конкурировать с другими бактериями в общей экологической нише (Svetoch, Stern, Eruslanov, 2005; He, Kisla, Zhang et al., 2007). Так, установлено, что наибольшая активность протеолитических ферментов отмечена в течение 72 часов культивирования штаммов *B. subtilis* и *B. licheniformis* и при концентрации белка в отрубях пшеницы 1,4 % и 1,6 % в цельно-зерновой муке (Barska, 2014).

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

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

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

1.4 Динамика роста штаммов-продуцентов биопрепаратов

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

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

В процессе культивирования микроорганизмов можно выделить несколько периодов роста.

Лаг-фаза. После внесения в среду посевного материала происходит процесс приспособления посевной культуры к новой среде. Численность популяции в это время не увеличивается (в некоторых случаях даже снижается). Предполагается, что в период лаг-фазы микробные клетки не потребляют субстрата, но метаболическая активность клеток проявляется в повышении содержания белка и РНК, активной выработке ферментов, а также в увеличении объема клеток (Sadouk-Nachaïchi, Tazerouti, Hacene, 2014). По достижении определенных соотношений между величинами поверхности клетки и ее объема происходит деление клетки, вследствие чего численность популяции начинает увеличиваться с возрастающей скоростью. Но даже при фиксированных показателях среды размножения

микроорганизмов и работе со строго определенным штаммом нельзя с уверенностью сказать, что через строго определенный промежуток времени клетка поделится на две. Вероятность деления клеток характеризует прирост, а точнее, скорость прироста во времени. Для полноты картины необходимо учитывать продолжительность продуктивного возраста клеток, которая может быть достаточно велика, но протекать без увеличения их численности (Майоров, 2012).

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

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

Стационарная фаза. В среде истощаются питательные вещества и накапливаются продукты обмена, тормозящие рост. Биомасса растет и одновременно происходит гибель части клеток (автолиз), так что общая концентрация сохраняется постоянной. В ранней стационарной фазе размер бактериальных клеток достигает минимума. Для некоторых групп бактерий в стационарной фазе характерно образование эндоспор или экзоспор. В

некоторых случаях увеличение синтеза вторичных метаболитов не прямо пропорционально увеличению количества клеток. В исследованиях по оптимизации синтеза итирина А штаммом *B. amyloliquefaciens* HZ-12 отмечено, что максимальное количество биомассы клеток – $(164,2 \pm 6,5) \times 10^8$ КОЕ/мл, достигнуто при 24 ч культивирования. В дальнейшем происходит резкое падение титра, в то время как синтез итирина А возрастает и достигает своего максимума – $(2013,4 \pm 32,8 \text{ мг/л})$ к 72 ч культивирования (Ху, Cai, Zhang et al., 2020).

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

В настоящее время проводятся многочисленные исследования по изучению параметров периодического культивирования штаммов-продуцентов. Так, в 2012 году Н.В. Шеховцевой с соавторами были проведены исследования кинетических параметров роста бактерий р. *Bacillus*, ассоциированных с подземными органами *Dactylorhiza maculata*. Результаты исследований показывают, что каждая из четырех культур бактерий обладает специфической кривой роста. Культуры штаммов М и S5 растут в два этапа. Стационарная фаза не выражена: сразу после максимального значения биомассы наблюдается ее снижение. Культура М растет в течение 4-х суток. Удельная скорость роста бактерий М со вторых по четвертые увеличивается более чем в 2 раза. Культура S5 растет в течение 6 суток. Удельная скорость роста со вторых по шестые сутки снижается более чем в 3 раза. Кинетические кривые периодических культур штаммов U и E3 отличаются от кривых роста штаммов М и S5 наличием стационарной

фазы. Значение биомассы штамма E3 меньше в 64 раза по сравнению с аналогичным показателем штамма U. Обобщая полученные результаты, можно отметить, что штаммы U и E3 являются быстрорастущими (среднее время генерации составляет 0,6 сут) по сравнению с культурами M (среднее время генерации = 1,3 сут) и S5 (среднее время генерации = 3,1 сут). Штамм U отличается максимальным выходом биомассы, а E3 – минимальным.

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

1.5 Оптимизация условий культивирования и разработка технологии получения биопрепаратов

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

В 2001 году лабораторией Института биологии Китайской академии наук выделен штамм *B. subtilis* ZK8, обладающий фунгицидной активностью по отношению к широкому спектру патогенов и производящий специфический антибиотик, названный исследователями jіean-пептид, принадлежащий к классу итуринов (Dai-Fu, Zhou, Zhong, 2005). В дальнейшем группой исследователей была проведена оптимизация параметров выращивания штамма *B. subtilis* ZK8. В ходе исследований отмечено, что выход jіean-пептида при культивировании штамма продуцента в течение 36 ч. на оптимизированной среде, содержащей 24 % соевого гидролизата и 0,38 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, увеличился на 41 % по

сравнению с контролем и составил $371,3 \pm 32,7$ мг/л (Zhang, Zhou, Fu et al, 2010; Zhong, Zhang, Ren, 2014).

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

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

Исследования, проведенные в целях повышения антибиотической активности штамма *B. subtilis* B38, показали, что лактоза, сукцинат аммония и 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 (Tabbene, Ben Slimene, Djebali et al., 2009).

В 2011 году в отделе микробиологических процессов на твердых поверхностях Института микробиологии и вирусологии НАН Украины была

проведена разработка оптимального состава жидкой питательной среды для культивирования в лабораторных условиях *B. subtilis* ИМВ В-7023 – компонента препарата комплексного действия для растений «Комплегран».

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

В 2013 году сотрудниками Института биологии УНЦ РАН был проведен ряд экспериментов с целью разработки технологии получения биоудобрения «Азолен». Установлено, что увеличение концентрации сахарозы, дрожжевого автолизата и K_2HPO_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, Кузина, Логинов, 2013).

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

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований служили 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 использованы тест-культуры фитопатогенных грибов – моноспоровые штаммы *Fusarium graminearum* Schwabe BZR 4 и *F. oxysporum* var. *orthoceras* App. et Wr. BZR 6, 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)).

2.1 Определение культурально-морфологических признаков штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

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

2.2 Определение оптимальных условий культивирования штаммов

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

В качестве тестируемых источников углерода в среду вносили сахарозу, глюкозу, мелассу и глицерин. При изучении углеродных источников неизменным компонентом азотного питания служил азотнокислый натрий. При определении оптимальных источников азотного питания испытывали пептон, NaNO_3 , дрожжевой и кукурузный экстракты с неизменным источником углерода глюкозой. В качестве базовой использовали среду Чапека для бактерий (среда собственного приготовления, все компоненты российского производства) (Скворцова, 1981). Для определения оптимальной температуры культивирования штаммы выращивали при температурах 20,0; 25,0; 30,0 и 35,0 °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 количества колониеобразующих единиц. Антибиотическую активность штаммов определяли модифицированным методом последовательных разведений (Егоров, 2004; Sidorova, Asaturova, Nomyak, 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 µm. Далее культуральную жидкость вносили в ЧП по 1,0 мл. В ЧП добавляли по 9 мл охлажденной до + 37,0 - + 40,0 °C агаризованной оптимизированной питательной среды и давали агару застыть.

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

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

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

И – ингибирование роста мицелия патогена, %;

А – рост гриба в варианте, мм;

В – рост гриба в контроле, мм.

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

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

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

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

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

И – ингибирование роста мицелия патогена, %;

A – рост гриба в варианте, мм;

B – рост гриба в контроле, мм.

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

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

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

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

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

T – КОЕ в 1,0 мл;

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

V – объем суспензии, взятый для посева;

10^n – коэффициент разведения.

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

2.3 Выделение, хроматографический анализ и анализ антифунгальной активности бактериальных метаболитов

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

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

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

Степень фунгитоксичности выделенных компонентов оценивали методом биоавтографии (Сидорова, 2002; Сидорова, Асатулова, Хомяк и др., 2019) с применением в качестве тестового гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 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).

2.4 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

Определение биологической эффективности осуществляли на фоне искусственного заражения семян озимой пшеницы сорта Батько грибом *F. graminearum* BZR 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 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 стандарта использовали фунгицид Кинто Дуо, КС (тритиконазол 20 г/л + прохлораз 60 г/л) с нормой расхода 2,5 л/т, в качестве биологического стандарта – биопрепарат Фитоспорин – М, Ж (*B. subtilis*, 26Д) с нормой расхода 1,0 л/т (титр ЖК штамма *B. subtilis* BZR 336g $3,13 \times 10^9$ КОЕ/мл, штамма *B. subtilis* BZR 517 – $4,06 \times 10^9$ 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 (Долженко, 2009):

0 – признаки поражения отсутствуют;

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

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

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

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

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

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

R - развитие болезни, %

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

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

N - общее число растений в варианте;

K - высший балл шкалы учета.

Распространенность болезни рассчитывали по формуле:

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

P - распространенность болезни, %

n - число больных растений в варианте;

N - общее число растений в варианте.

Биологическую эффективность рассчитывали по формуле Эббота:

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

C - биологическая эффективность, %;

P - развитие болезни в контроле, %;

p - развитие болезни в варианте, %.

2.5 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 2013 по 2015 гг. на экспериментальной базе ФГБНУ ФНЦБЗР.

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

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

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

Среднегодовая температура составляла от +13,2 до +13,9 °С, максимально низкие показатели температур были отмечены в декабре - феврале, максимально высокие – в июне и июле. Суммарное количество

осадков за год составляло от 175 до 791 мм, количество дней с выпавшими осадками – от 16 до 159. Среднегодовая влажность воздуха составляла от 64 до 67 %. Средняя температура вегетационного периода от +11,1 до +12,3 °С, суммарное количество осадков – 541,1 - 690,4 мм, влажность воздуха 66,1 - 67,3 % (приложение 1, таблица 1). Анализ метеорологических условий по данным метеостанции «Круглик» за период проведения исследований по диссертационной работе (2013-2015 гг.) представлен в приложении 1, таблица 2.

Схема мелкоделяночного опыта, 2013 гг.

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

Схема мелкоделяночного опыта, 2014 гг.

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

Схема мелкоделяночного опыта, 2015 гг.

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

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

Для закладки опыта в условиях мелких делянок осуществляли предпосевную обработку семян озимой пшеницы в лабораторных условиях ручным способом за день до посева. Контрольные варианты обрабатывали дистиллированной водой. В качестве химического стандарта использовали Раксил, КС (тебуконазол 60 г/л) с нормой расхода препарата 0,5 л/т, в качестве биологического стандарта – Фитоспорин - М, Ж (*B. subtilis* 26 Д) с нормой расхода препарата 1,0 л/т.

Посев осуществляли спустя сутки после обработки с помощью механической сеялки СЗ-3,6. Площадь одной делянки составляла 100 м². Норма высева – 220 кг/га. Ширина междурядья – 15 см. Опытные участки располагали по предшественнику люцерна.

В течение вегетации растения озимой пшеницы 2 раза обрабатывали профилактически лабораторными образцами биопрепаратов и стандартами в фазу выхода в трубку (Z 32-35) и в фазу колошения (Z 51-59) (Zadoks et al., 1974). Норма расхода рабочей жидкости составляла 300 л/га. Рабочую жидкость готовили непосредственно перед обработкой. В качестве химического стандарта использовали Альто Супер, КС (пропиконазол + ципроконазол, 250 + 80 г/л). В качестве биологического стандарта – Фитоспорин-М, Ж (*B. subtilis* 26 Д).

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

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

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

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

P – распространенность болезни, %

n – число больных растений в варианте, шт.

N – общее число растений в варианте,

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

R – развитие болезни, %

a – количество растений с одинаковым баллом поражения (b)

\sum – сумма произведений $a \times b$

N – общее число растений в варианте

K – высший балл шкалы учета

Биологическую эффективность против корневой гнили фузариозной этиологии оценивали в динамике в фазу кущения осенью (Z 20-21) и весной (Z 26-29), в фазу выхода в трубку (Z 32-35), цветения (Z 61-69) и созревания (Z 73-77).

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

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Культурально-морфологические признаки и идентификация штаммов

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

Морфологические признаки клеток

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

Таблица 1 – Морфологические признаки клеток штаммов бактерий-антагонистов

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

Культурально-морфологические признаки колоний

Культуральные признаки штаммов бактерий-антагонистов изучали на двух средах: МПА и КГА (таблица 2). На МПА форма колоний штамма *B. subtilis* BZR 336g ризоидная с неправильным или лопастным краем, штамма *B. subtilis* BZR 517 – круглая с фестончатым краем. Колонии у штамма *B. subtilis*

BZR 336g блестящие, бесцветные, тогда как у штамма *B. subtilis* BZR 517 матовые в центре, блестящие по краю, бесцветные. Профиль колоний плоский. Структура колоний *B. subtilis* BZR 336g мелкозернистая, штамма *B. subtilis* BZR 517 – струйчатая в центре, мелкозернистая по краю. Консистенция мягкая, колонии прилипают к петле. Диаметр колоний у штамма *B. subtilis* BZR 336g 3-8 мм, у штамма *B. subtilis* BZR 517 – 2-5 мм.

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

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

На КГА формируются колонии ризоидной формы с лопастным краем у штамма *B. subtilis* BZR 336g, с волнистым краем у штамма *B. subtilis* BZR 517. Колонии у штамма *B. subtilis* BZR 336g матовые, кремово-желтого цвета, тогда как у штамма *B. subtilis* BZR 517 колонии матовые в центре, блестящие по краю, кремового или желто-коричневого цвета. Профиль колоний изогнутый. Структура колоний штамма *B. subtilis* BZR 336g крупнозернистая в центре,

мелкозернистая по краю, штамма *B. subtilis* BZR 517 – мелкозернистая. Консистенция мягкая, колонии прилипают к петле. Диаметр колоний штамма *B. subtilis* BZR 336g 4-9 мм, штамма *B. subtilis* BZR 517 – 4-8 мм.

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

3.2 Исследование оптимальных условий культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

3.2.1 Подбор источников углеродного питания для культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

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

В результате проведенных исследований высокое количество клеток в ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g отмечалось на среде, где в качестве источника углерода была использована меласса: $(4,0 \pm 0,14) \times 10^7$ КОЕ/мл. В вариантах с добавлением глюкозы, сахарозы и глицерина титр ЖК оказался на один порядок ниже. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 среда с добавлением мелассы также была наиболее оптимальной для роста, титр ЖК составил $(1,3 \pm 0,09) \times 10^7$ КОЕ/мл (рисунок 1; приложение 2, таблица 1).

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

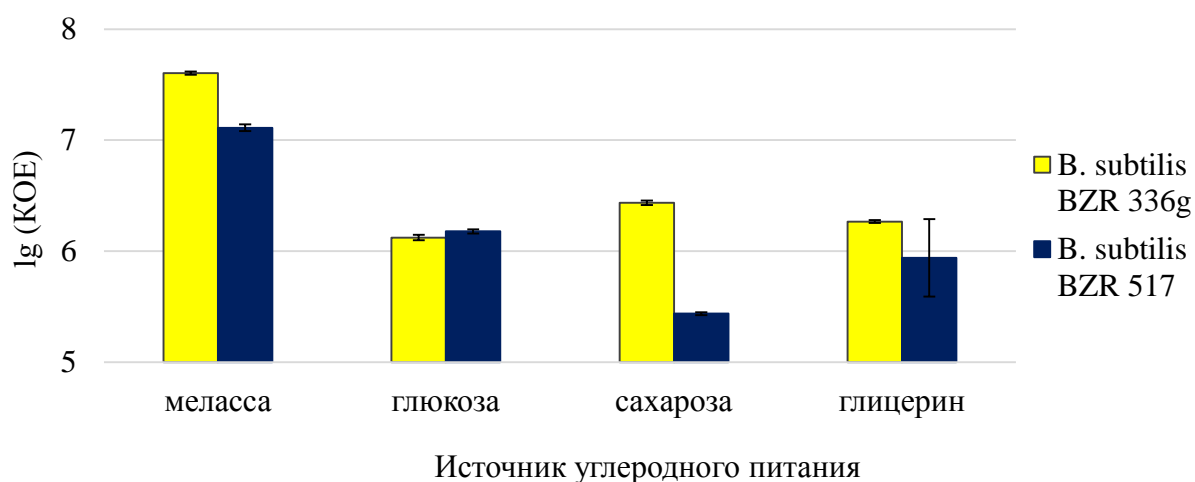


Рисунок 1 – Влияние источников углеродного питания на рост штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в процессе периодического культивирования

Для выявления возможных механизмов антагонистических взаимодействий бактерий с грибами рода *Fusarium* была изучена их антибиотическая активность модифицированным методом разведений (Егоров, 2004). Антибиотическая активность бацилл имеет широкий спектр действия в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов – бактерий, грибов, простейших и вирусов. Образование специфических продуктов обмена – антибиотиков, угнетающих или полностью подавляющих развитие организмов других видов, является наиболее существенной и яркой формой антагонизма, широко распространенной в мире микроорганизмов. Количество изученных антибиотиков, продуцируемых *B. subtilis*, составляет несколько десятков (около 70) (Штерншис, Джалилов, Андреева, 2004). Они продуцируют широкий круг антибактериальных и антифунгальных веществ как рибосомальной природы (субтилин, субтилозин, тасА и субланцин), так и не рибосомальной (хлоротетайн, микобациклин, ризатацин, бациллин, диффицидин, липопротеиды сурфактин, итурин, фенгицин) (Смирнов, Василевская, Резник, 1985; Martin, Abawi, Hoch, 1987; Koumoutsis, Chen, Henne et al., 2004).

Для обоих штаммов максимальное ингибирование *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 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 2-4; приложение 2, таблица 2).

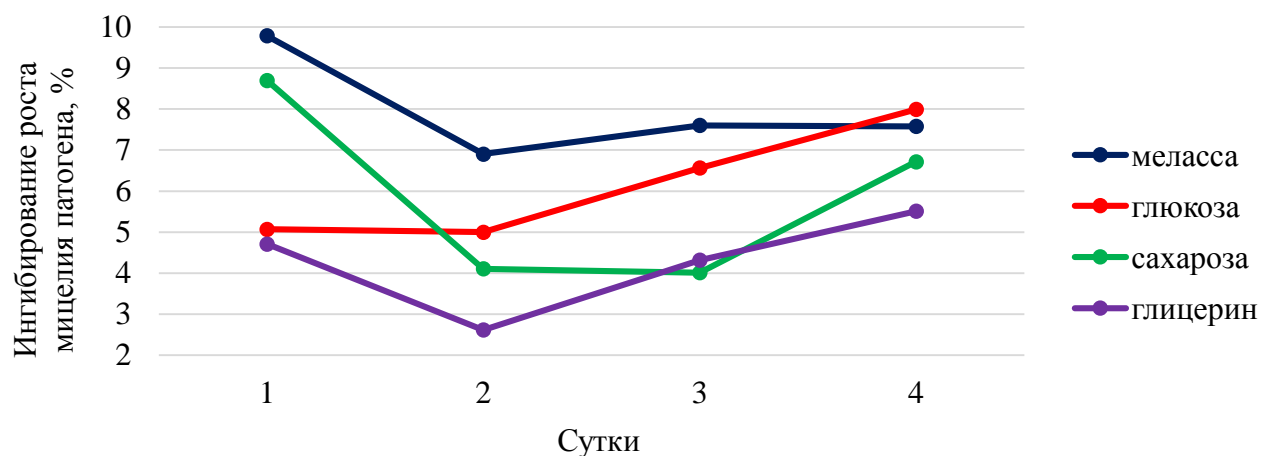


Рисунок 2 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 336g в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от источника углеродного питания

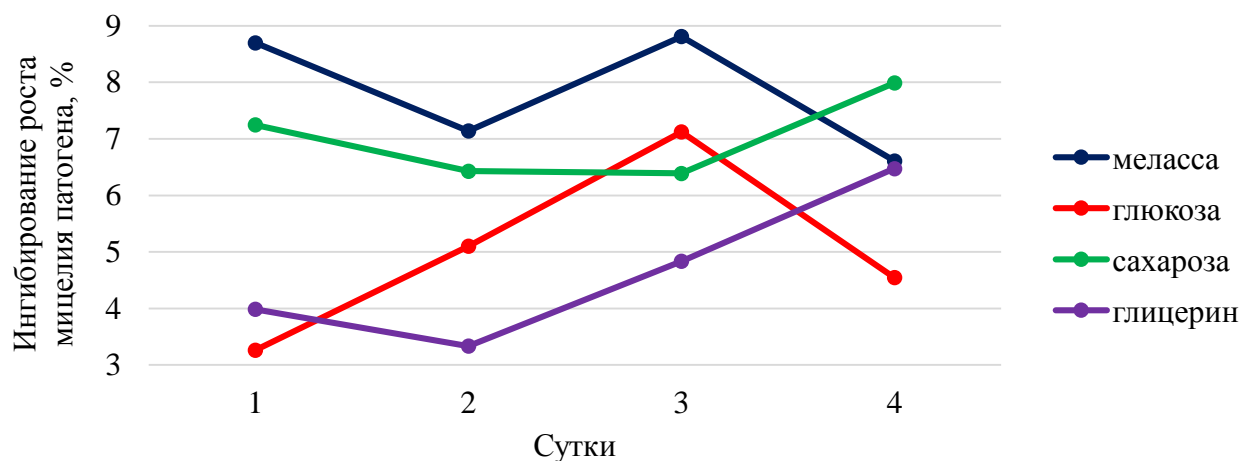


Рисунок 3 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от источника углеродного питания

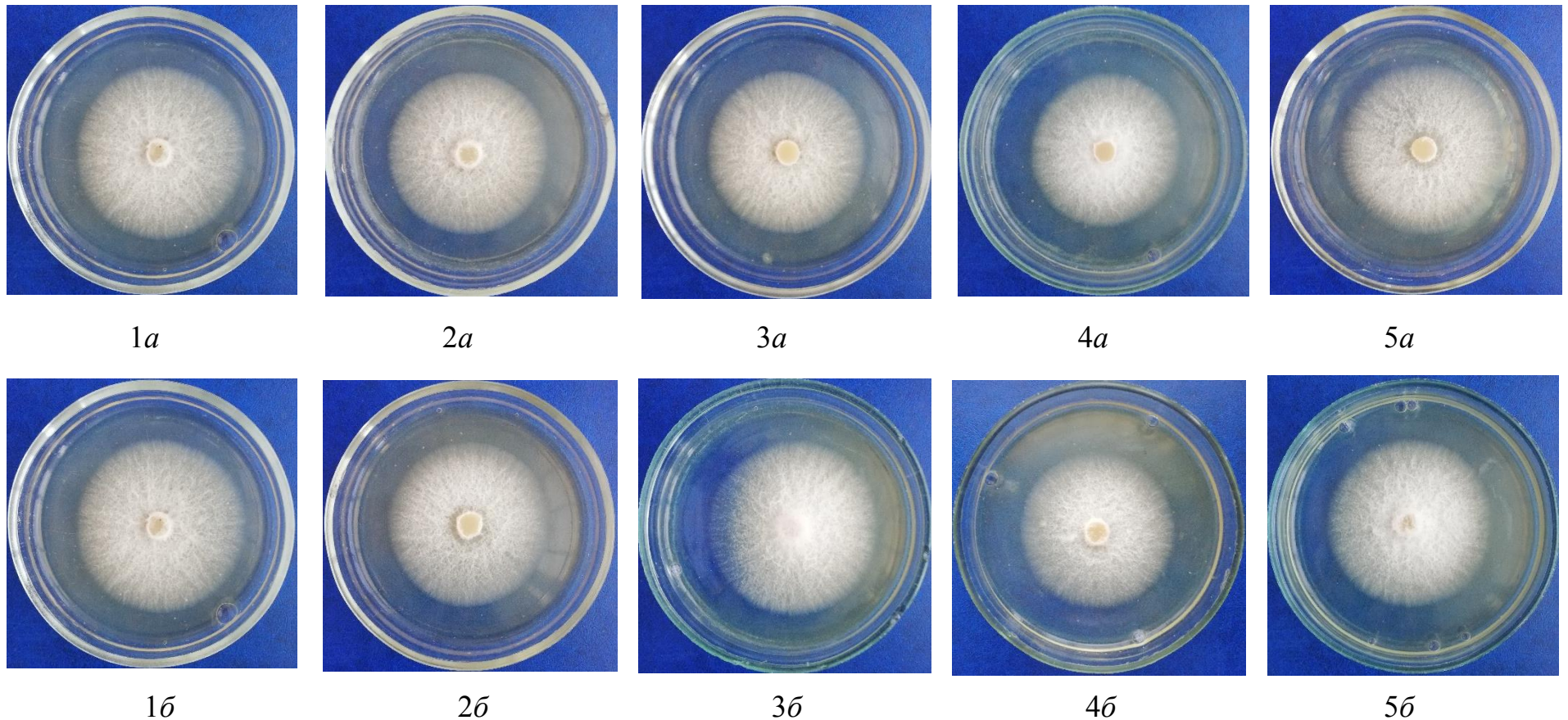


Рисунок 4 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от источника углеродного питания
 1 – контроль; 2 – сахароза; 3 – глюкоза; 4 – меласса; 5 – глицерин;
 а – штамм *B. subtilis* BZR 336g; б – штамм *B. subtilis* BZR 517

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

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

Хроматографический анализ показал, что максимальный синтез обоими штаммами разнообразных метаболитов отмечен на среде с мелассой, тогда как добавление в среду простых сахаров обеспечивало слабый выход метаболитов (рисунок 5, 6). Вероятно, это обусловлено тем, что сам углерод оказывает незначительное влияние на синтез вторичных метаболитов, и большее значение имеют витамины и аминокислоты, входящие в состав мелассы, т.е. необходимо, чтобы источник углерода находился в определенном равновесии с другими элементами питания (например, с азотом).

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

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

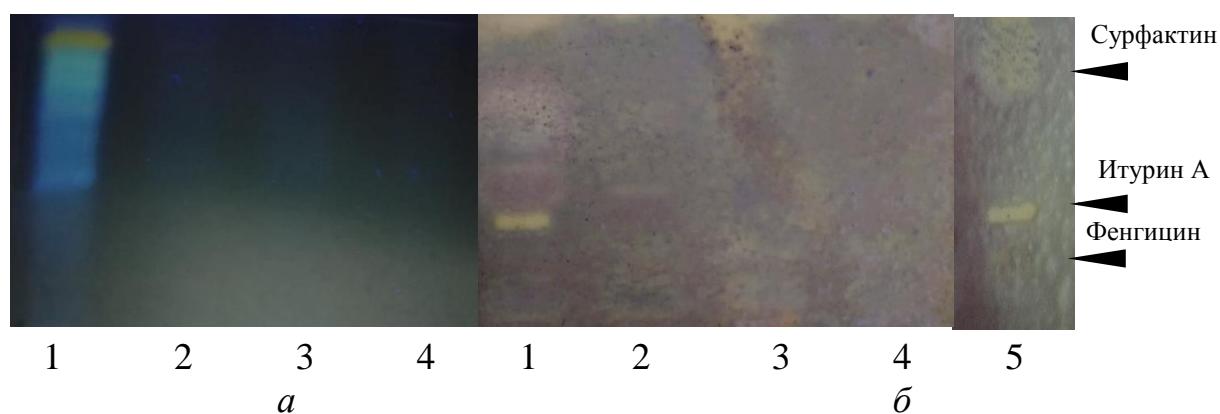


Рисунок 5 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 336g (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6)

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

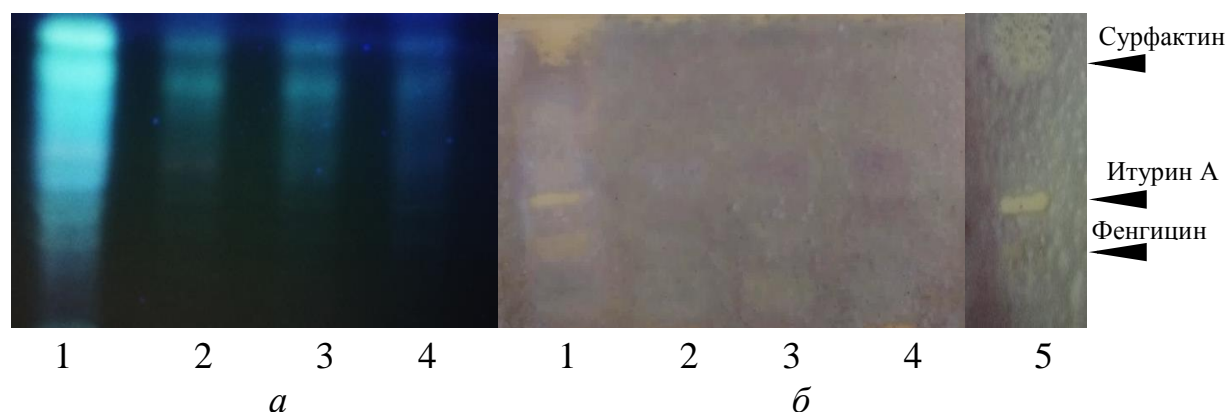


Рисунок 6 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6)

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

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

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

3.2.2 Подбор источников азотного питания для культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

Результаты исследования по определению оптимальных источников азота для культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 представлены на рисунке 7.

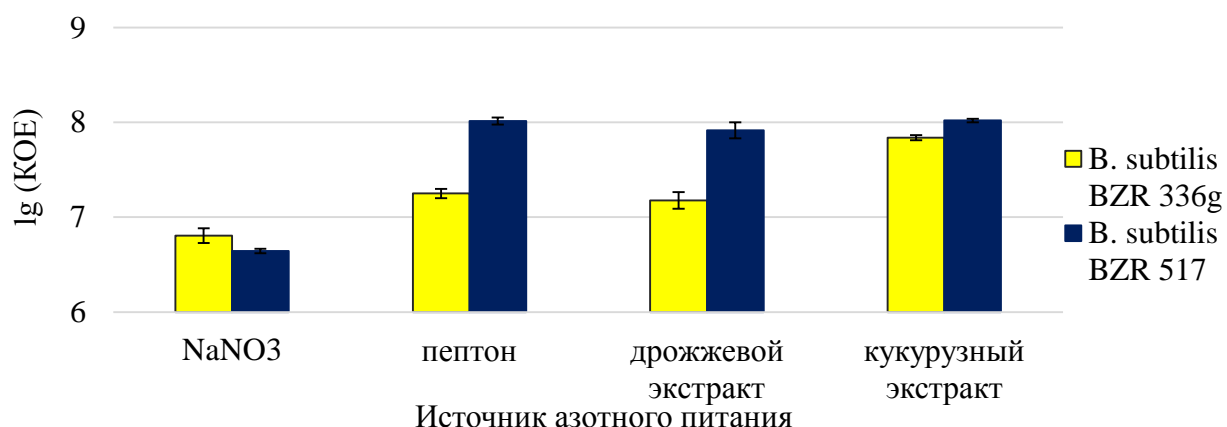


Рисунок 7 – Влияние источников азотного питания на рост штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в процессе периодического культивирования

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 (приложение 3, таблица 1).

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) (рисунок 8; приложение 3, таблица 2). Аналогичные результаты были получены в исследованиях 2021 г., согласно которым добавление в питательные среды для культивирования штамма *Bacillus* sp. Fc11 нитрата натрия, глицина, нитрата аммония и дрожжевого экстракта обеспечивало ингибирование *P. aphanidermatum* на уровне 5-7% (Ravi et al., 2021).

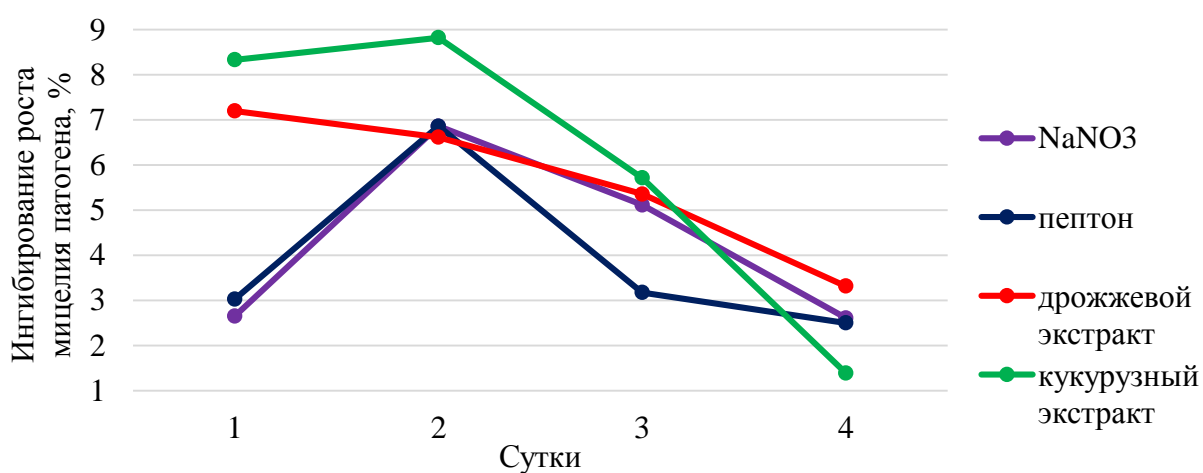


Рисунок 8 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 336g в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от источника азотного питания

Для штамма *B. subtilis* BZR 517 максимальное ингибирование *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 отмечалось на среде с добавлением пептона – 19,12 % (рисунок 9; приложение 3, таблица 2).

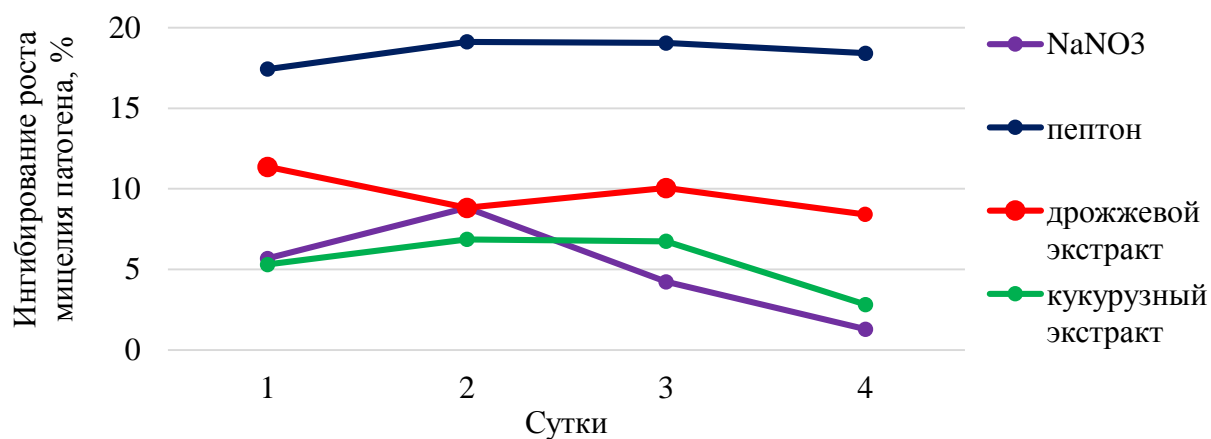


Рисунок 9 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от источника азотного питания

Следует отметить, что, в вариантах с добавлением пептона и кукурузного экстракта не был сформирован воздушный мицелий, что свидетельствует о накоплении в ЖК фунгистатических соединений (рисунок 10).

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

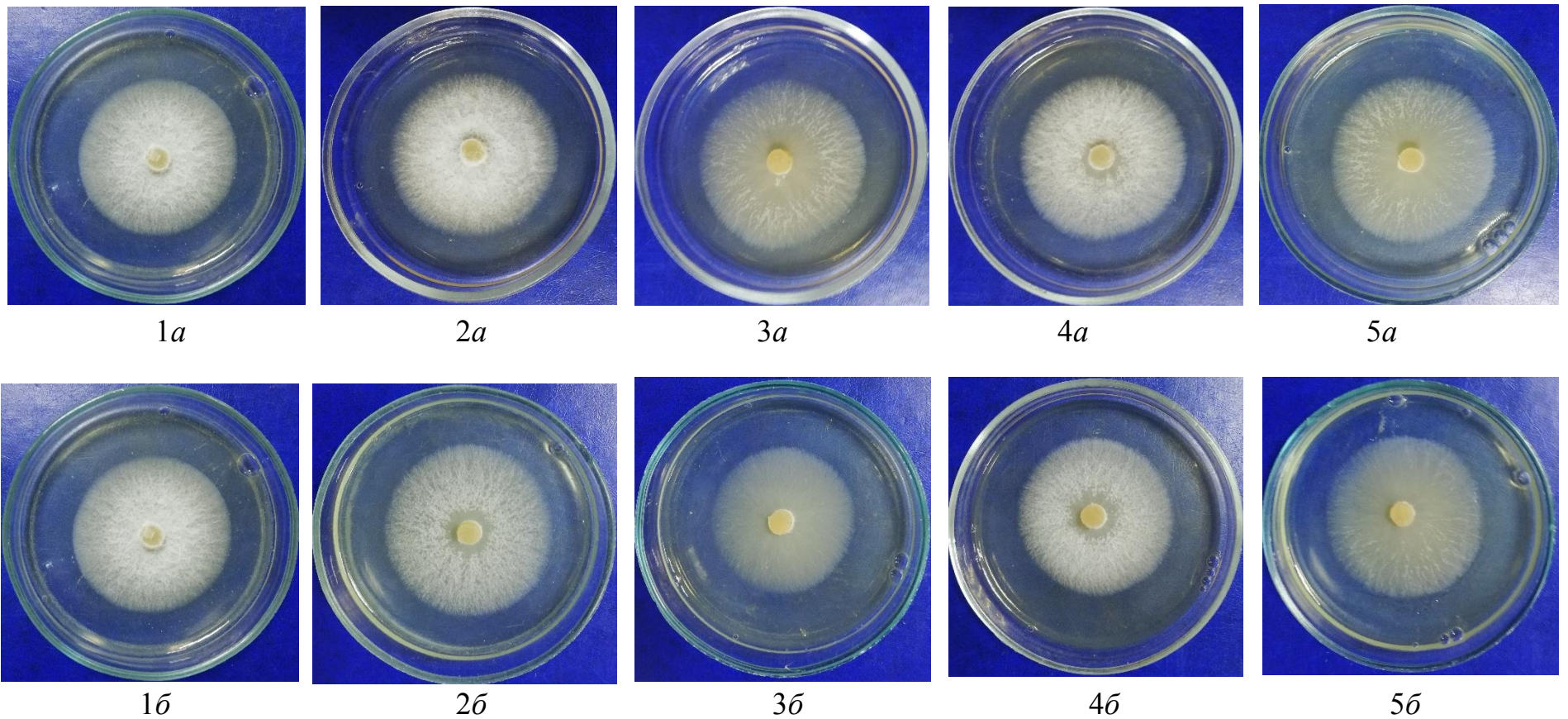


Рисунок 10 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от источника азотного питания
 1 – контроль; 2 – NaNO_3 ; 3 – пептон; 4 – дрожжевой экстракт; 5 – кукурузный экстракт
 а – штамм *B. subtilis* BZR 336g; б – штамм *B. subtilis* BZR 517

Хроматографический анализ выявил увеличение количества полос с «усложнением» состава источника азота (рисунок 11, 12). 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. В исследованиях многих авторов упоминалось, что максимальный выход активных метаболитов отмечался на средах с добавлением в качестве источников азота органических соединений (Parthipan et al., 2017; Osman et al., 2019).

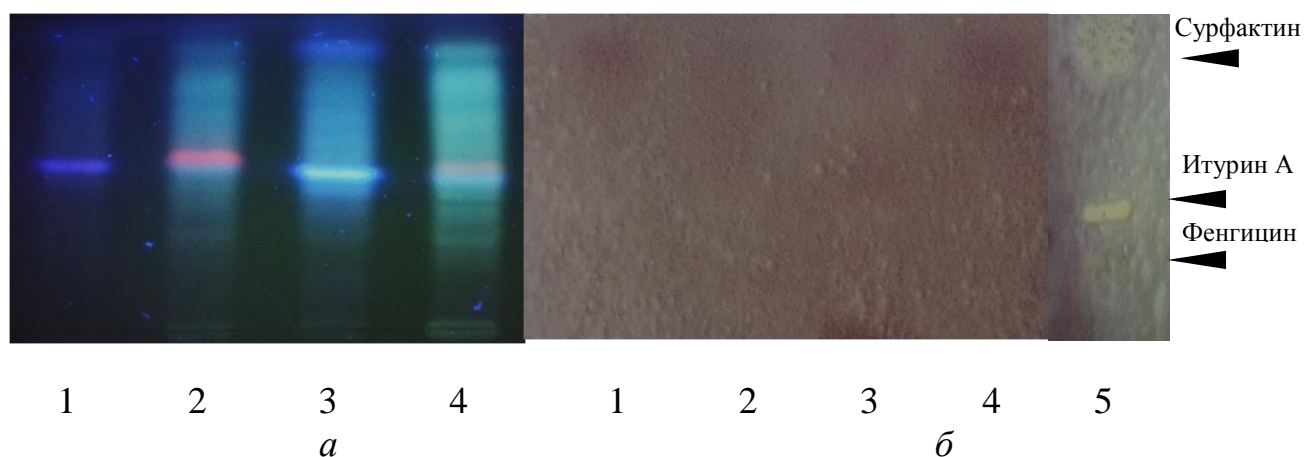


Рисунок 11 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 336g (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6)

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

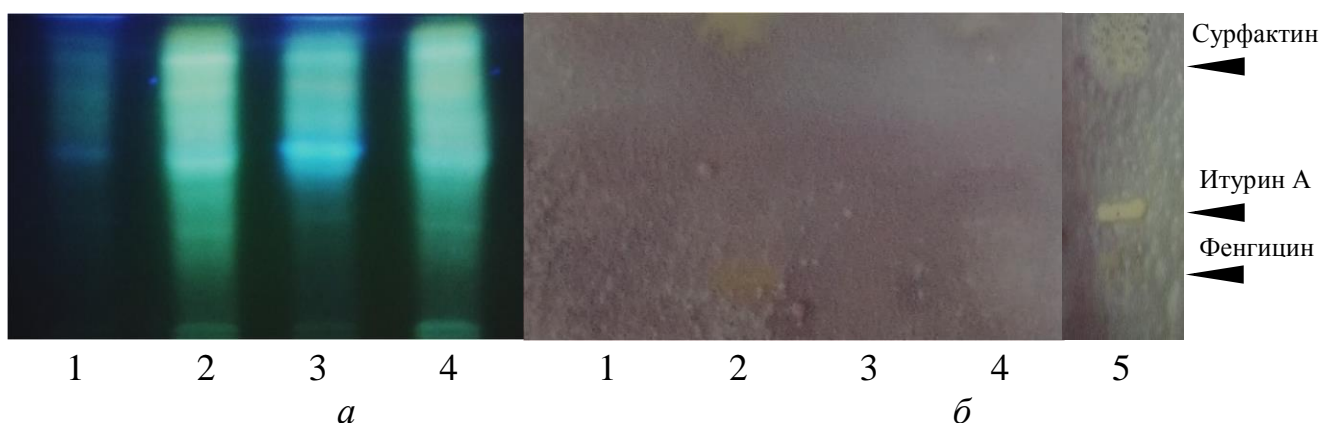


Рисунок 12 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6)

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

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

Таким образом, установлены оптимальные источники питания для культивирования исследуемых штаммов.

3.2.3 Подбор оптимальной температуры культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

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

Известно, что штаммы *B. subtilis* способны расти в температурном диапазоне от 5,5 °C до 55,7 °C (Khadka, Adhikari, Thapa et al., 2020; Gauvry, Mathot, Couvert et al., 2020; Pant, Prakash, Pavani, et al., 2020). В ходе исследований установлено, что для штамма *B. subtilis* BZR 336g оптимальной является температуре культивирования 20,0 и 25,0°C: $(1,7 \pm 0,07) \times 10^9$ и $(1,6 \pm 0,2) \times 10^9$ КОЕ/мл соответственно. Высокий титр ЖК штамма *B. subtilis* BZR 517 отмечен при температуре 30,0 °C: $(8,9 \pm 0,4) \times 10^8$ КОЕ/мл (рисунок 13; приложение 4, таблица 1).

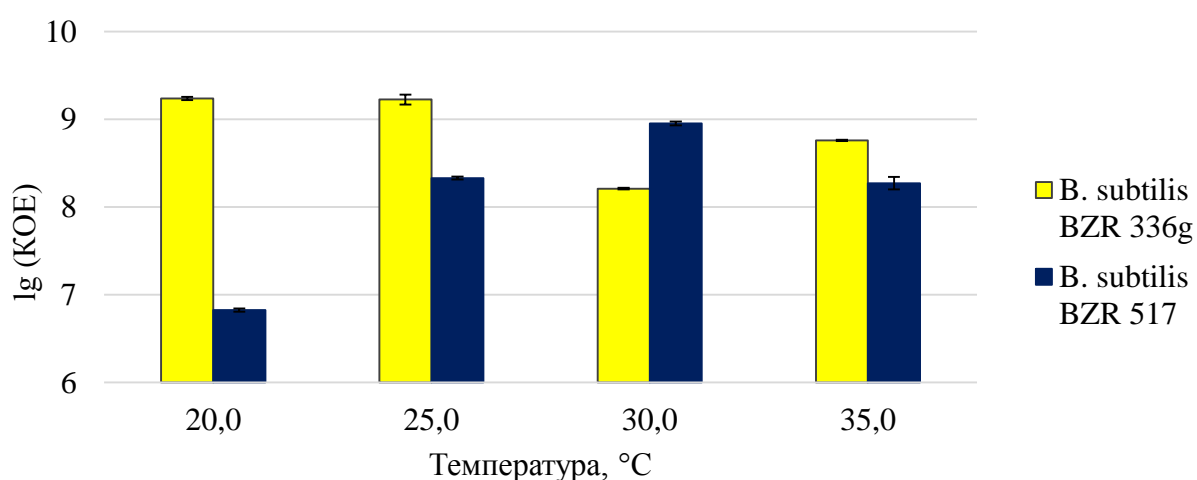


Рисунок 13 – Влияние температуры на рост штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в процессе периодического культивирования

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° C для штамма *B. subtilis* BZR 336g (33,3 % и 32,10 % соответственно) и при 25,0 и 30,0° C для штамма *B. subtilis* BZR 517 (24,43 % и 25,89 % соответственно) (рисунок 14, 15; приложение 4, таблица 2).

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 третьи сутки учета. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 отмечена обратная

закономерность: понижение температуры приводило к существенному снижению антибиотической активности (до 8,73 %).

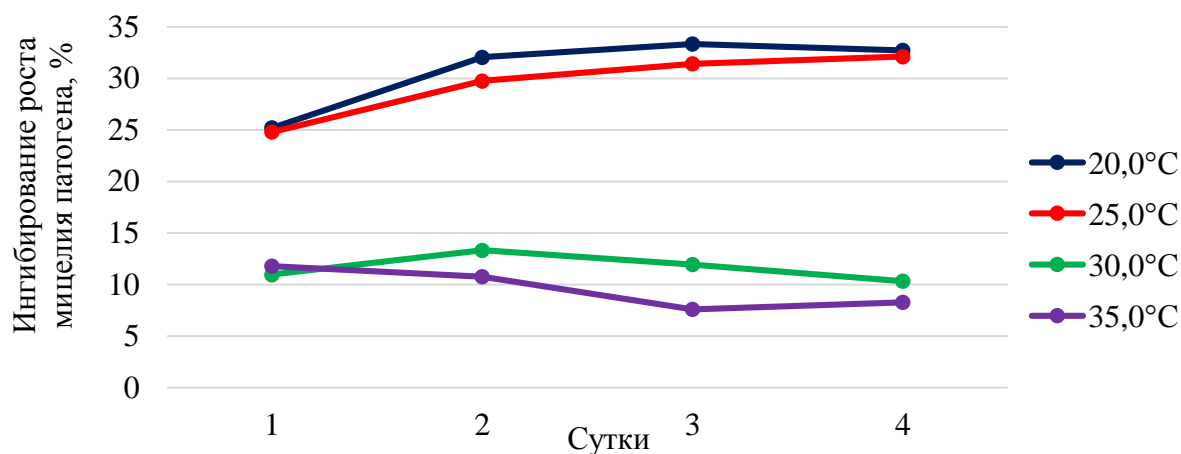


Рисунок 14 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 336g в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от температуры культивирования

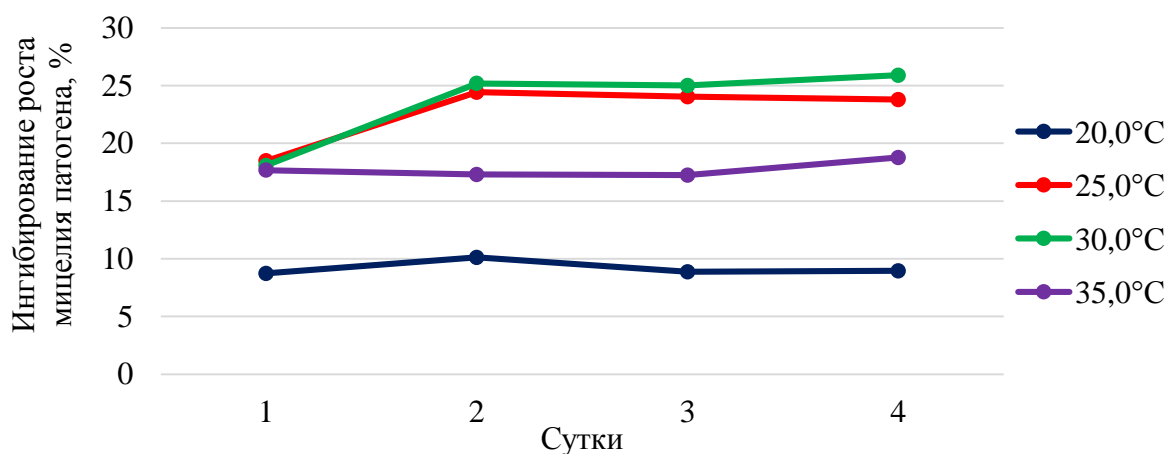


Рисунок 15 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от температуры культивирования

Полученные данные подтверждаются результатами исследований температурных режимов культивирования штамма *Bacillus* sp. 3, обладающего выраженной антифунгальной активностью, согласно которым максимальная антагонистическая активность, соответствующая наибольшему выходу

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

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 (рисунок 16).

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.

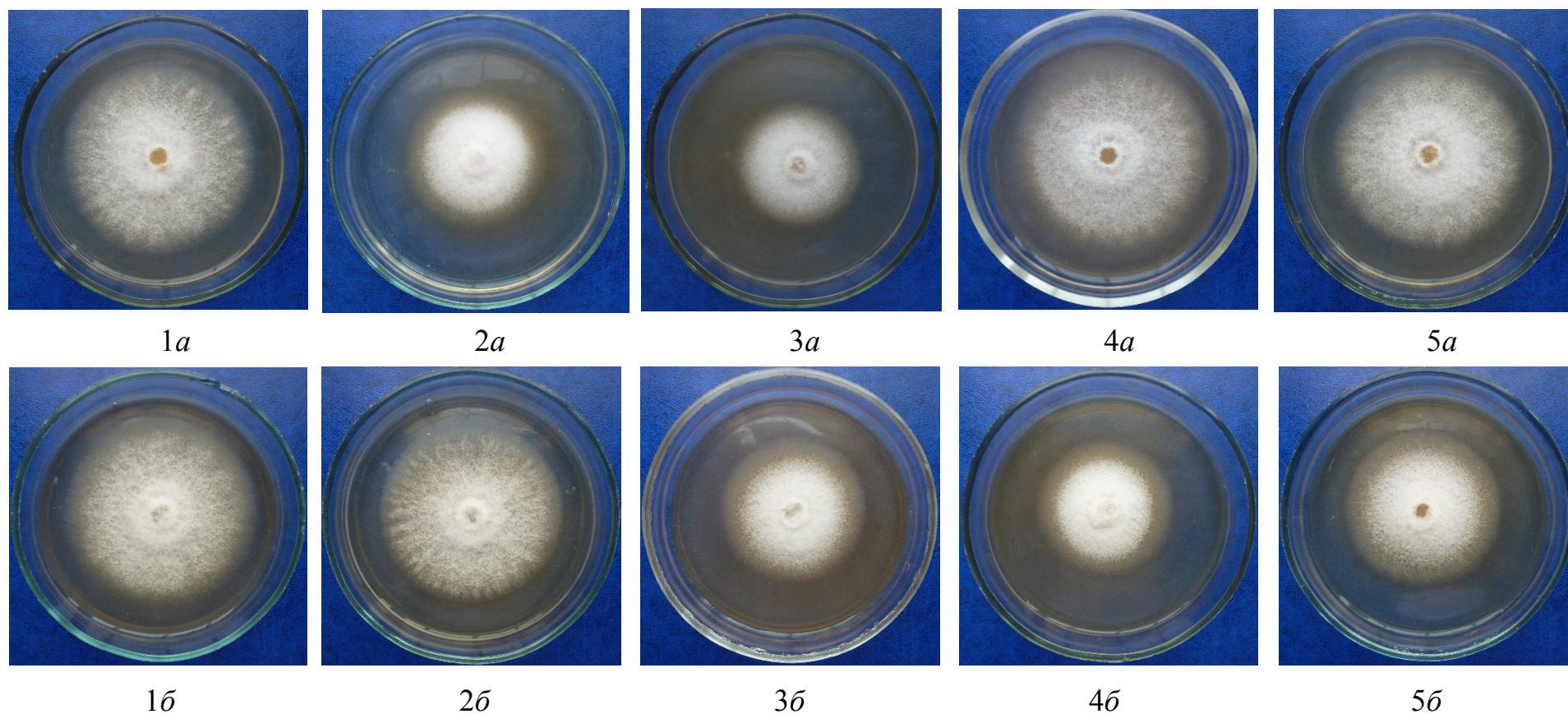


Рисунок 16 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от температуры культивирования
 1 – контроль; 2 – 20,0°C; 3 – 25,0°C; 4 – 30,0°C; 5 – 35,0°C
 а – штамм *B. subtilis* BZR 336g; б – штамм *B. subtilis* BZR 517

Полученные данные подтверждает изучение антибиотической активности исследуемых штаммов методом хроматографии и биоавтографии (рисунок 17, 18). Установлено, что повышение температуры культивирования способствует синтезу ряда соединений, не зафиксированных при 20,0° С – появление желтых полос.

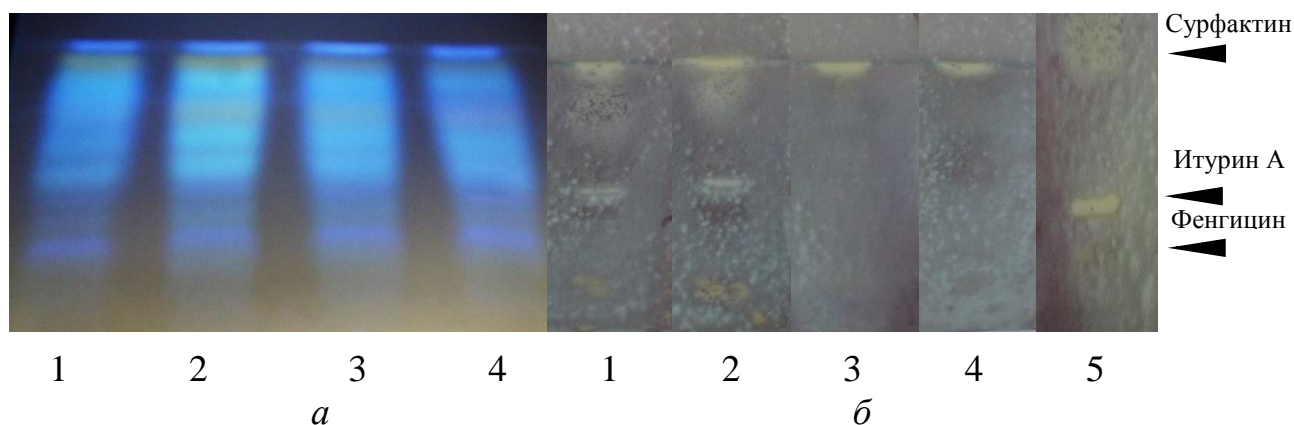


Рисунок 17 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 336g (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6)

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

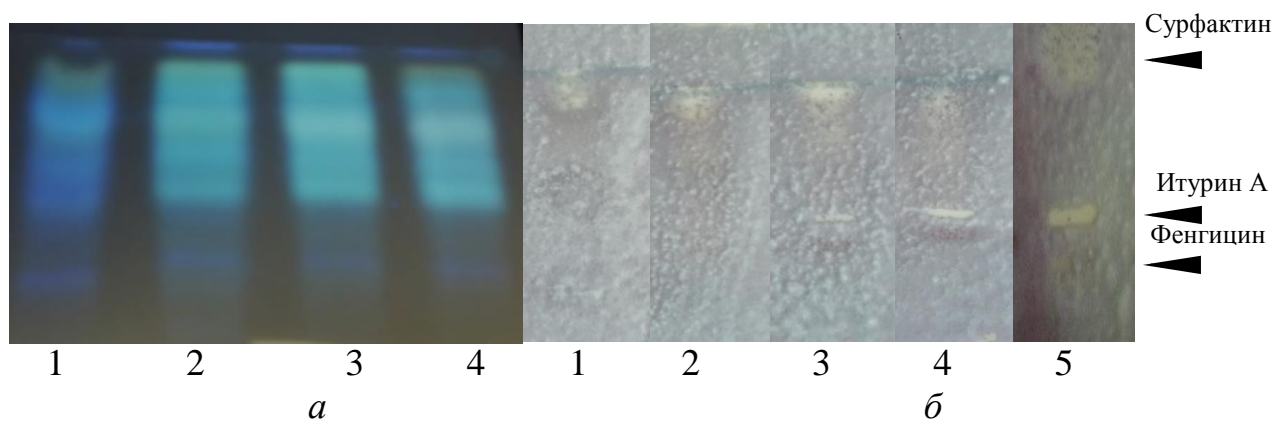


Рисунок 18 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6)

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. Визуальная оценка позволяет сделать вывод, что штамм *B. subtilis* BZR336g накапливает сурфактин и итурин А больше, чем штамм *B. subtilis* BZR517. 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.

3.2.4 Подбор оптимальной pH культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

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 23,19 % 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 19, приложение 5, таблица 1).

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 (рисунок 20, 21; приложение 5, таблица 2). 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). 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, Sharma, 2012).

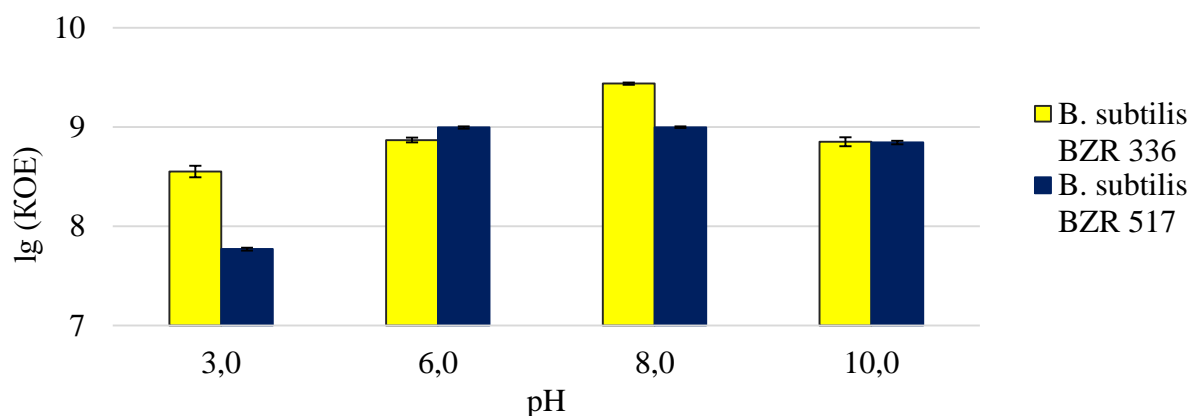


Рисунок 19 – Влияние pH на рост штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в процессе периодического культивирования

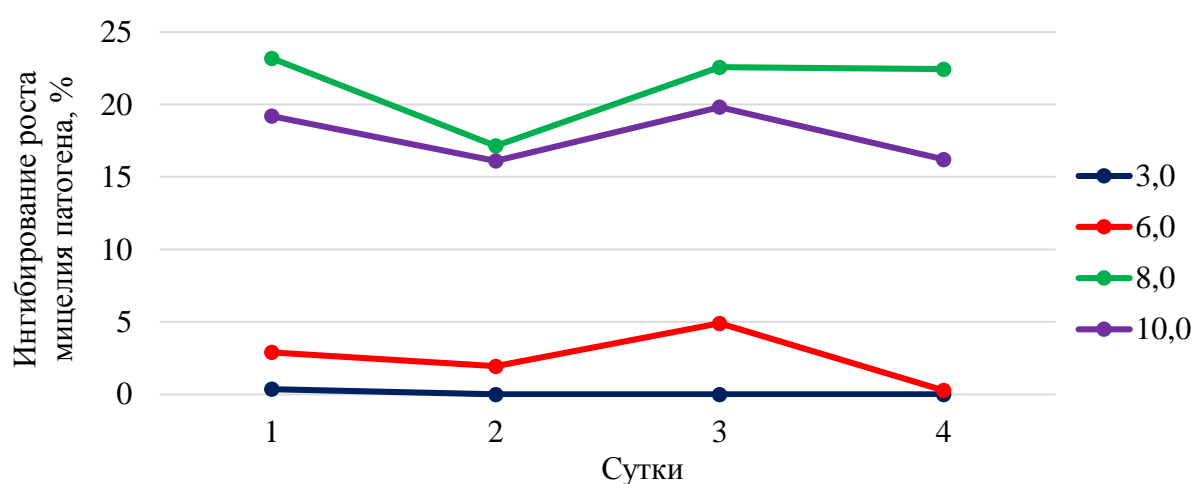


Рисунок 20 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 336g в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от pH

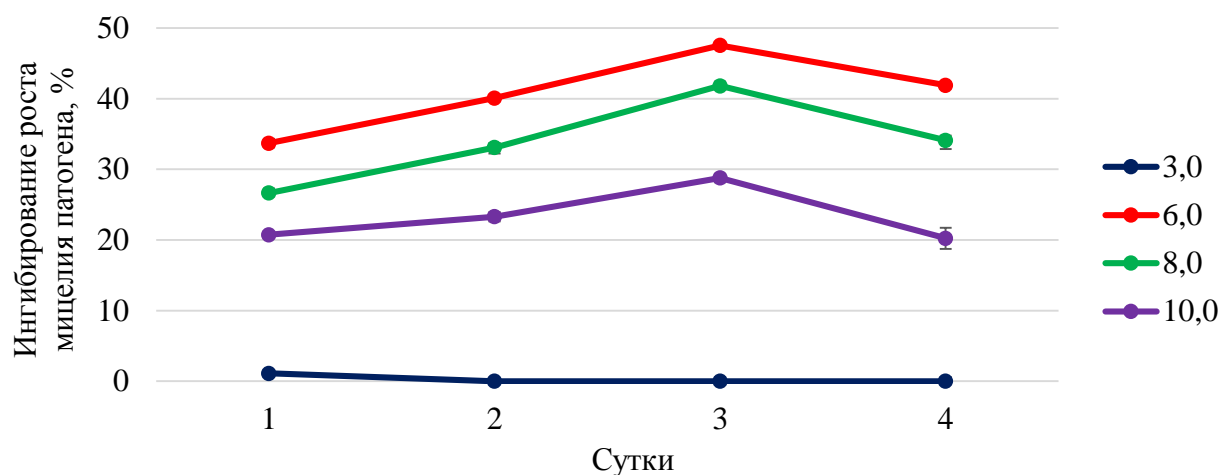


Рисунок 21 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от pH

Лимитирующим для обоих штаммов оказалось значение pH 3,0. При пониженной pH среды существенно снижался синтез антибиотических веществ для подавления роста тест-культуры (рисунок 22).

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).

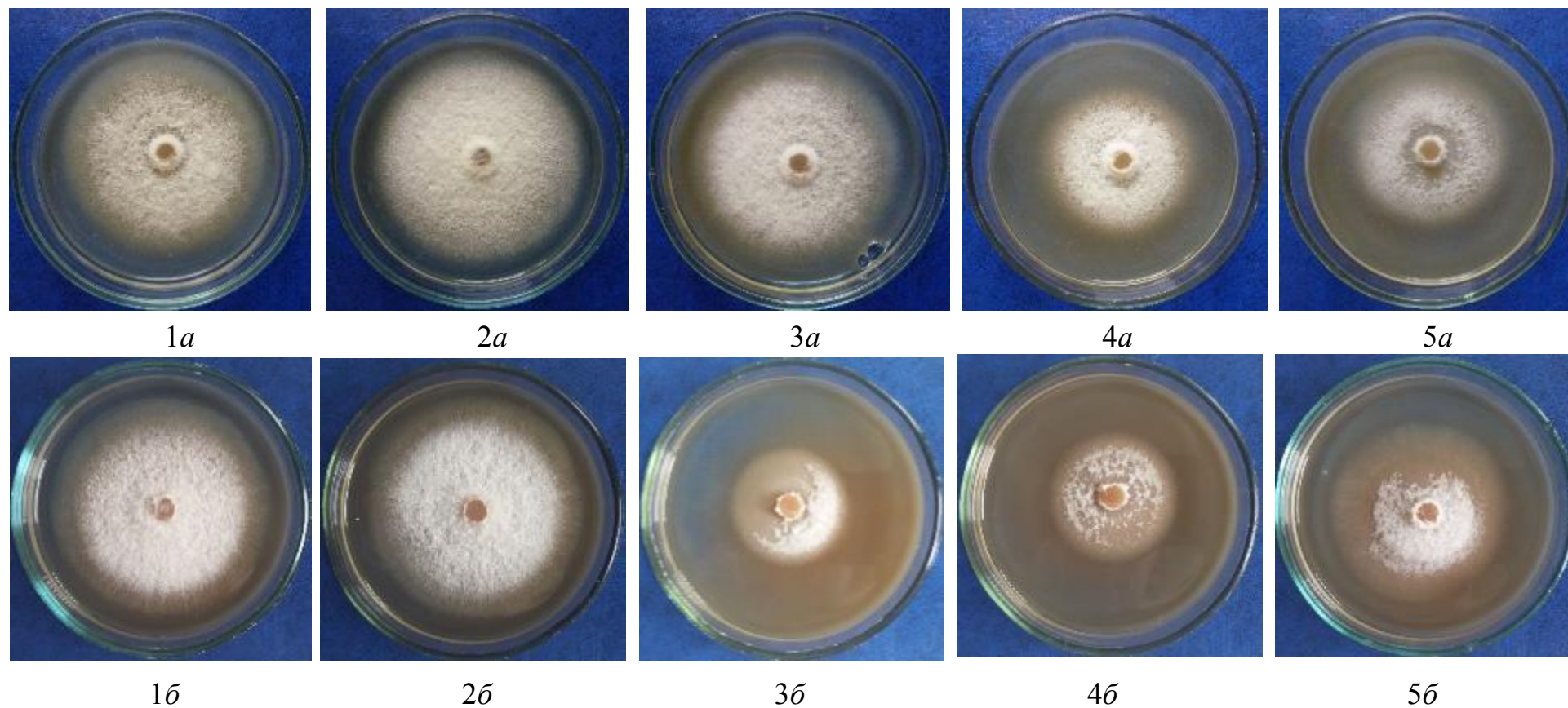


Рисунок 22 – Антибиотическая активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от pH
 1 – контроль; 2 – pH 3,0; 3 – pH 6,0; 4 – pH 8,0; 5 – pH 10,0
 а – штамм *B. subtilis* BZR 336g; б – штамм *B. subtilis* BZR 517

Результаты хроматографических и биоавтографических исследований антибиотической активности исследуемых штаммов в зависимости от pH питательной среды представлены на рисунках 23, 24. 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 6 к пониженной pH среды.

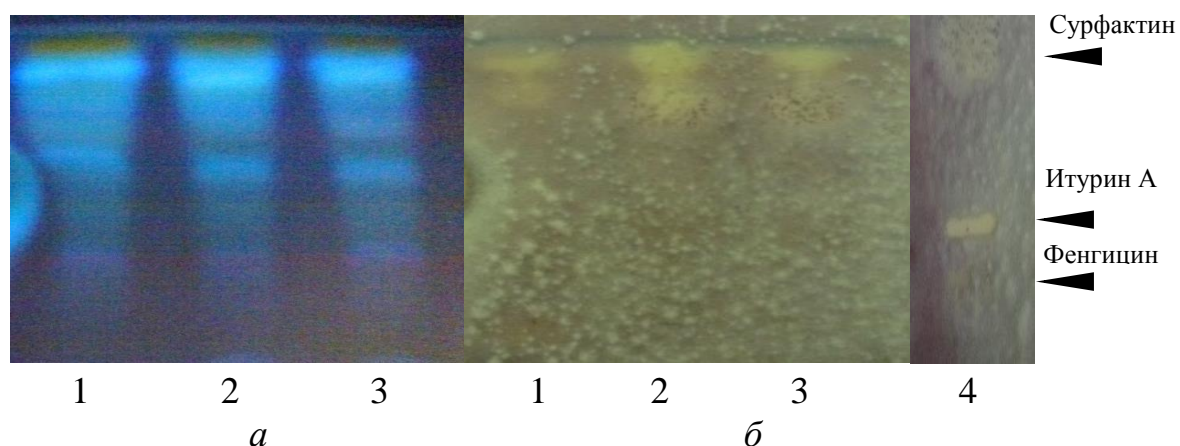


Рисунок 23 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 336g (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6)

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

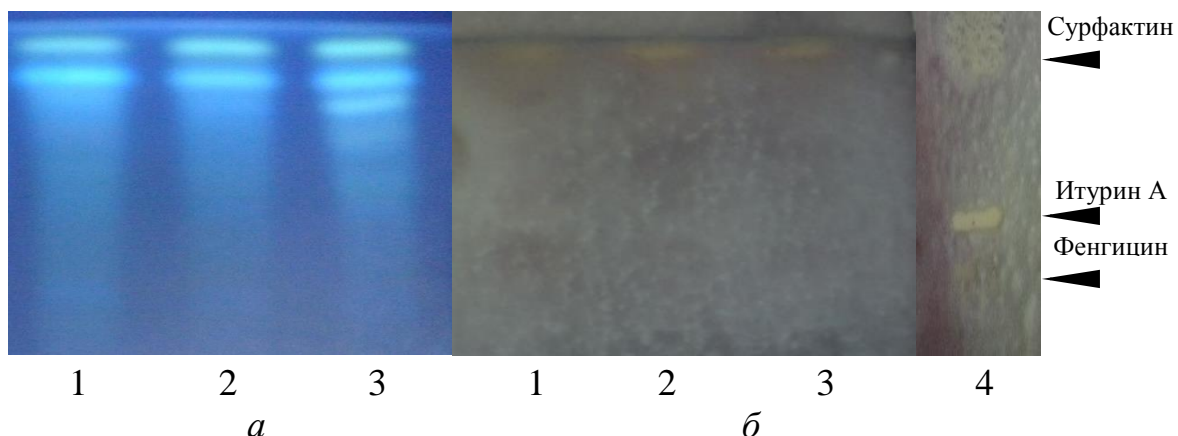


Рисунок 24 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6)

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

Установлено, что максимальное накопление сурфактина и итурина А, оказывающих выраженный фунгицидный эффект, происходит при pH 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 pH питательной среды итурин А продуцировался в следовых количествах или вообще не синтезировался.

3.2.5 Оптимальное время культивирования штаммов

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

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, Otero, 2006; Чеботарь, Завалин, Кипрушкина, 2007; Chen, Wu, Bernard, 2009). Это

демонстрирует важность построение 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 25. 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.

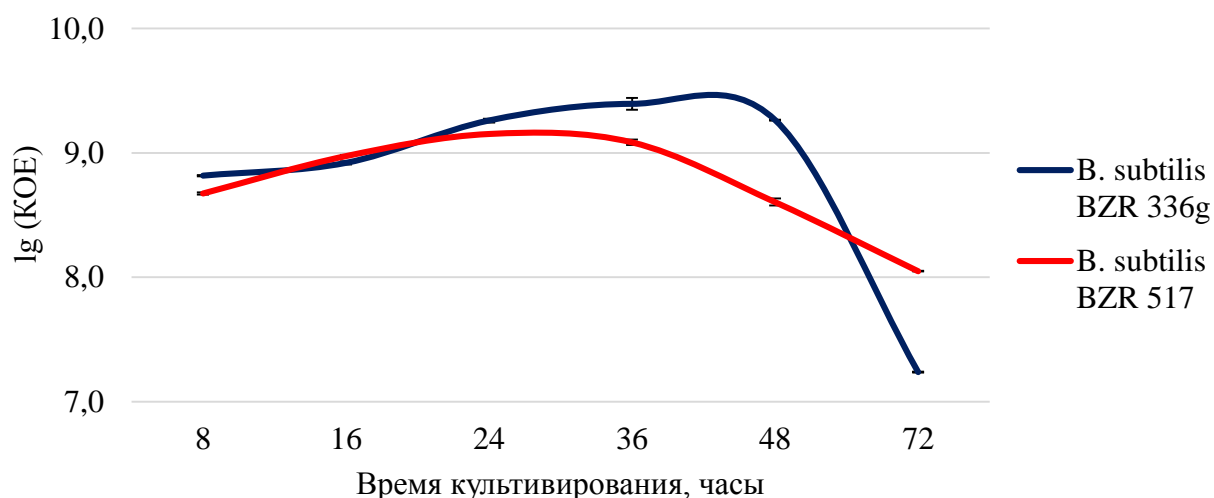


Рисунок 25 – Динамика роста штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 при периодическом культивировании

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 (приложение 6, таблица 1).

Экспоненциальная фаза была зафиксирована в период от 16-и до 36-и часов для штамма *B. subtilis* BZR 336g и от 16-и до 24-х часов для штамма *B. subtilis* BZR 517. Максимальный титр клеток был отмечен именно в данный период и составил $(2,4 \pm 0,24) \times 10^9$ КОЕ/мл у штамма *B. subtilis* BZR 336g и $(1,4 \pm 0,01) \times 10^9$ КОЕ/мл у штамма *B. subtilis* BZR 517.

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

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

Исследование антибиотической активности показало, что начальный синтез антибиотических веществ исследуемых штаммов был отмечен после восьми часов культивирования (рисунок 26-29; приложение 6, таблица 2). 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 многих видов бактерий в стационарной фазе происходит наиболее активный синтез антибиотических соединений (Fira, Dimkić, Berić et al., 2018).

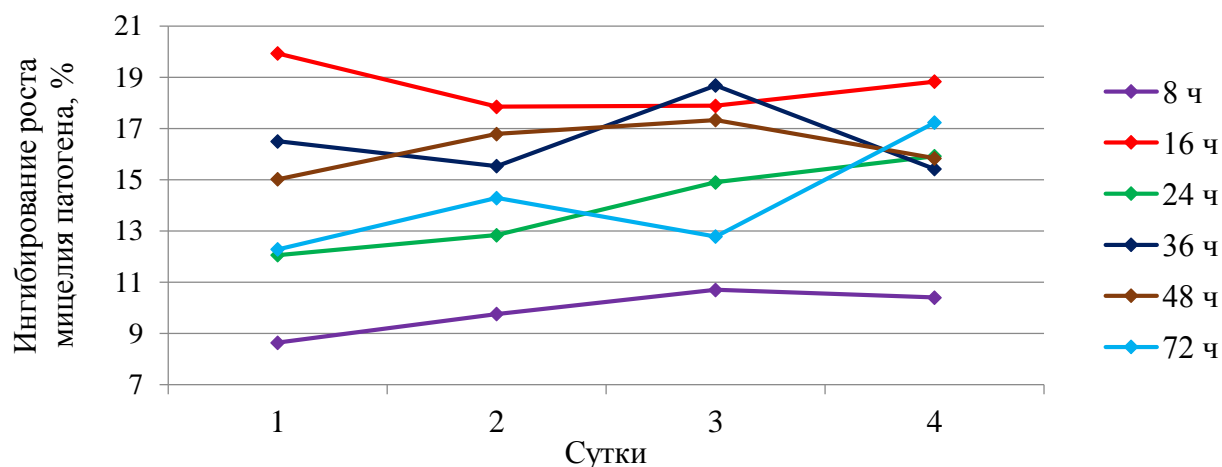


Рисунок 26 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 336g в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от времени культивирования

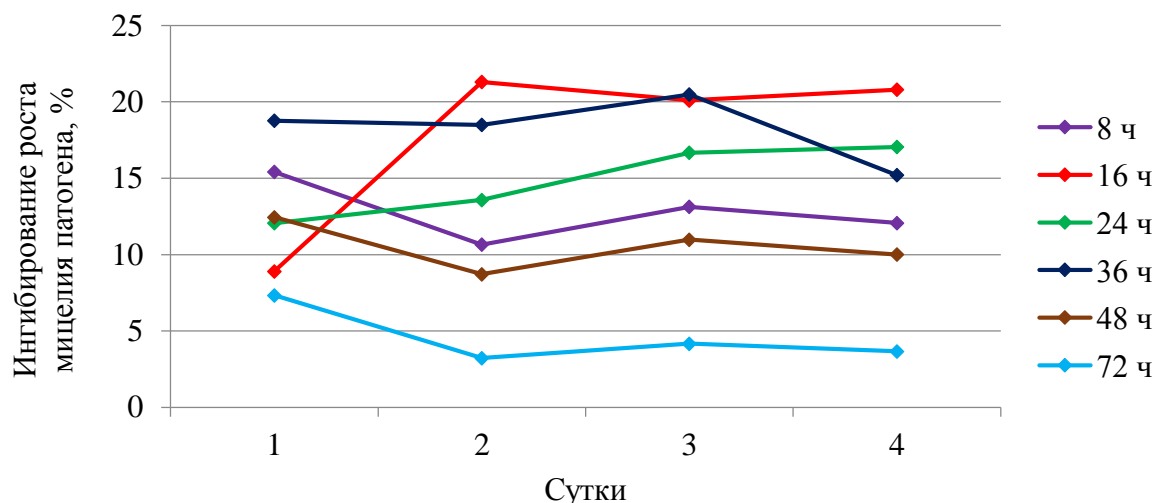


Рисунок 27 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от времени культивирования

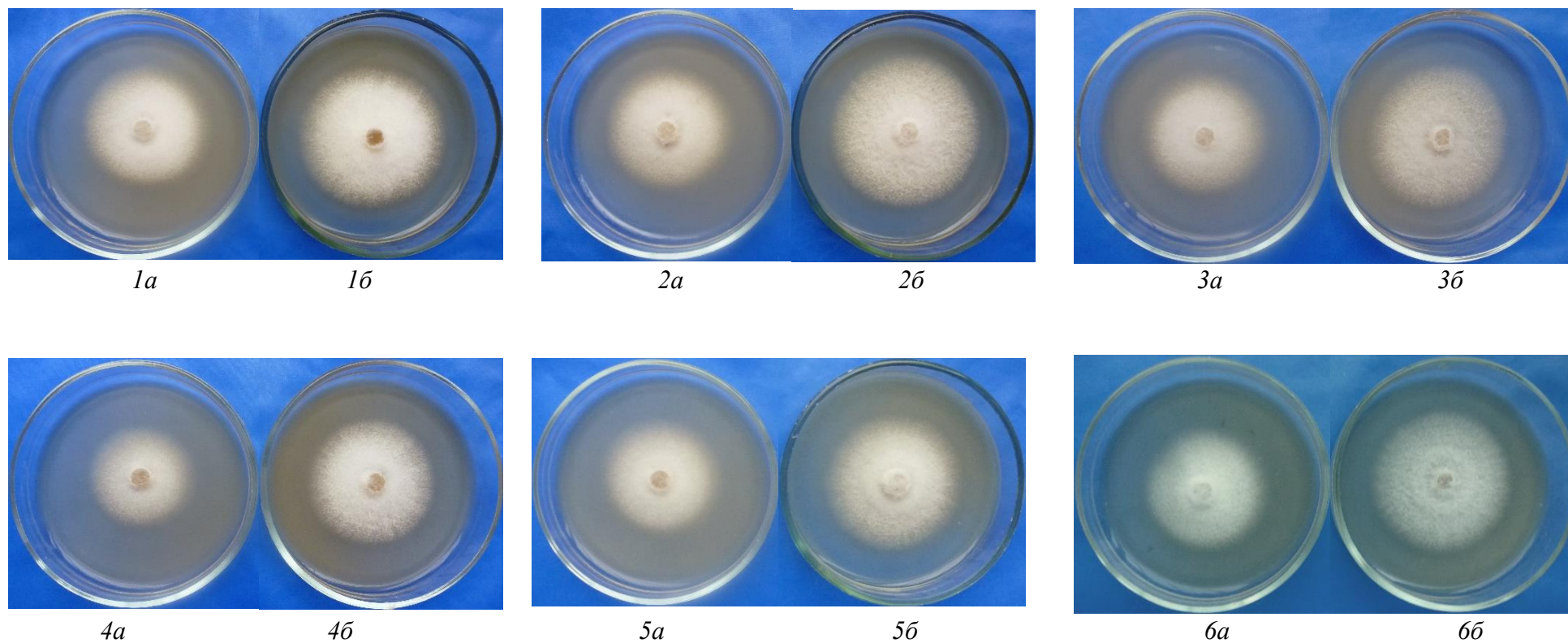


Рисунок 28 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 336g в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от времени культивирования
 1 – 8 часов; 2 – 16 часов; 3 – 24 часа; 4 – 36 часов; 5 – 48 часов; 6 – 72 часа;
a – штамм *B. subtilis* BZR 336g; *б* – контроль.

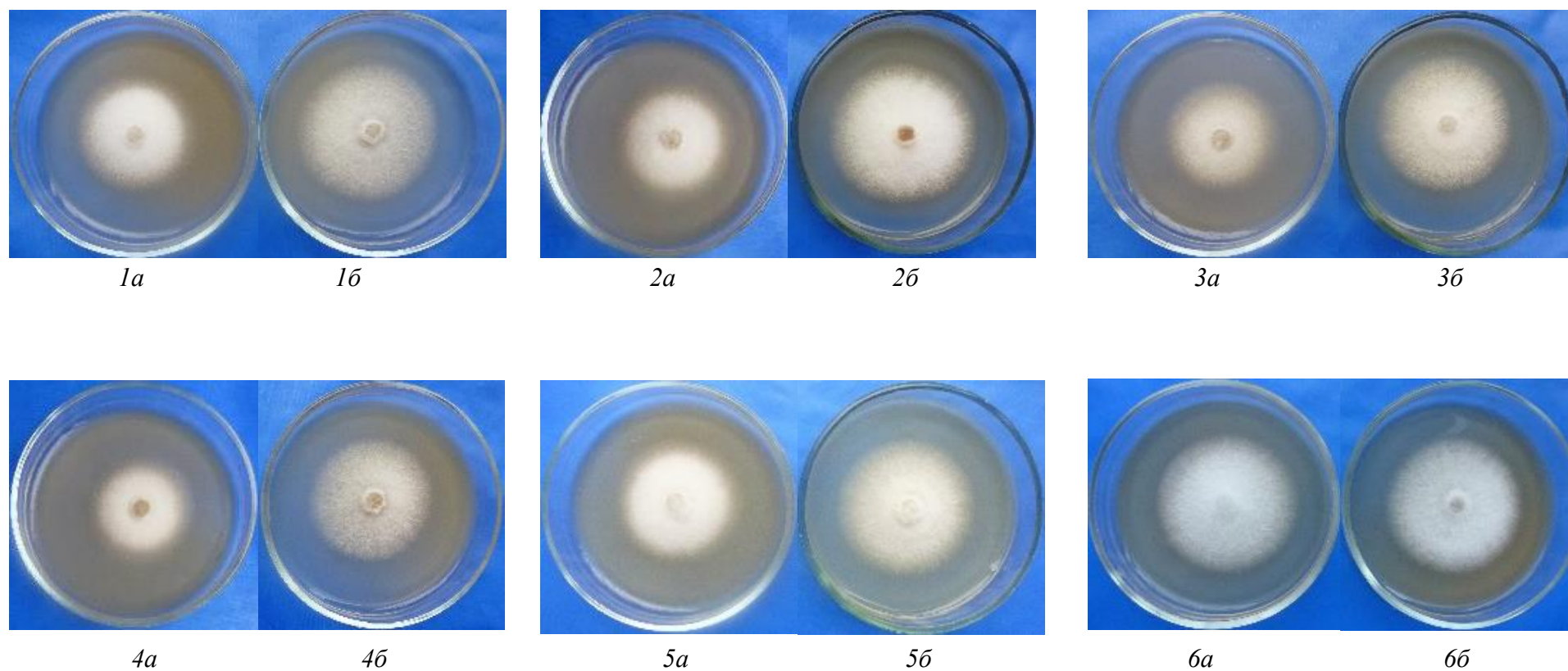


Рисунок 29 – Антибиотическая активность штамма *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6 при периодическом культивировании в зависимости от времени культивирования
 1 – 8 часов; 2 – 16 часов; 3 – 24 часа; 4 – 36 часов; 5 – 48 часов; 6 – 72 часа;
 а – штамм *B. subtilis* BZR 517; б – контроль.

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.

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.

3.3 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. В ее состав вошли следующие компоненты: хлористый калий, магний сернокислый, калий фосфорнокислый, кукурузный экстракт, кальций углекислый, железо сернокислое, меласса. Следует отметить, что среды KB и KГС были выбраны для включения в программу испытаний, в том числе и потому, что исследуемые штаммы были выделены из природных источников на среду KB, а KГС является одной из распространенных сред для работы, в том числе, с бактериями р. *Bacillus*. В ходе исследований установлено, что количество колониеобразующих единиц ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g на оптимизированной среде оказалось на три порядка выше, чем на среде KB и KГС. 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 3). Сотрудниками Казанского федерального университета установлено, что при выращивании *Bacillus sp.* 3 на картофельно-глюкозной среде уровень накопления биомассы составляет $4,6 \pm 0,2$ г/л с титром $(0,27 \pm 0,05) \times 10^{10}$ КОЕ/мл, а содержание спор – 45,3%; на меласной – $5,0 \pm 0,2$ г/л, $(0,98 \pm 0,04) \times 10^{10}$ КОЕ/мл и 52,6 % соответственно, на меласно-кукурузной – $5,1 \pm 0,3$ г/л, $(1,02 \pm 0,06) \times 10^{10}$ КОЕ/мл и 57,3 % соответственно, на пшеничной среде – $5,3 \pm 0,2$ г/л, $(1,04 \pm 0,05) \times 10^{10}$ КОЕ/мл и 83,5 % соответственно (Сираева, 2010).

Таблица 3 – 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
КВ	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^6$ ^a	$(3,3 \pm 0,2) \times 10^6$ ^a
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
Примечание: между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности		

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.

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

Для штамма 336g максимальная антифунгальная активность отмечена на ОПС, тогда как на питательных средах КВ и КГА (картофельно-глюкозный агар) она была значительно ниже. Так, на ОПС антифунгальная активность составила от 76,0 до 90,0 %, на других средах – от 46,1 до 64,0% (рисунок 30).

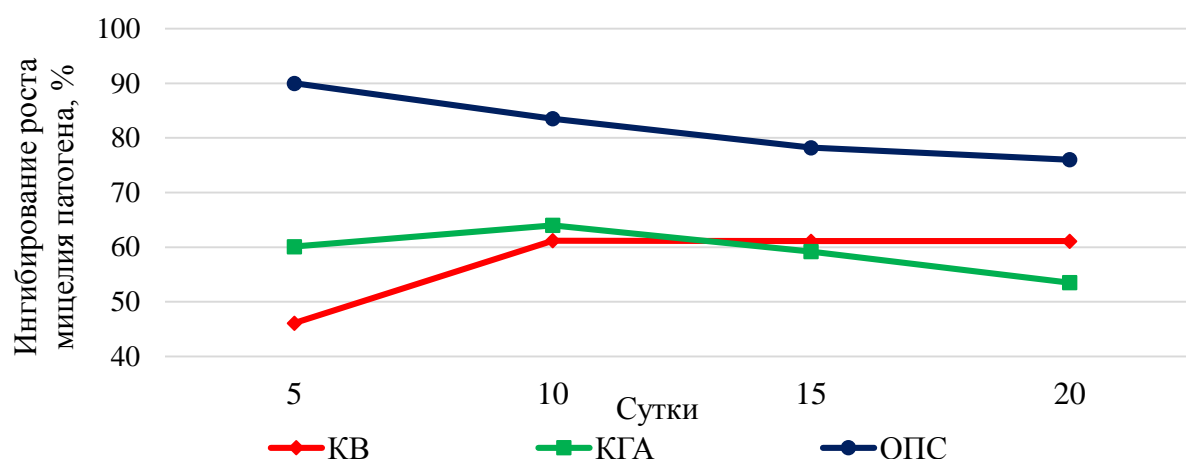


Рисунок 30 – Антифунгальная активность штамма *B. subtilis* BZR 336g в отношении *F. graminearum* BZR 4 в зависимости от питательной среды

Степень ингибирования *F. graminearum* BZR 4 в варианте со штаммом *B. subtilis* 517 к десятым суткам увеличивалась на всех питательных средах, однако существенной разницы как в варианте со штаммом *B. subtilis* 336g, выявлено не было, антифунгальная активность на всех средах колебалась в диапазоне от 46,8 до 64,0 % (рисунок 31). Эти результаты могут быть связаны с увеличением синтеза антифунгальных метаболитов при изменении компонентов питательной среды (предшественники и т.д.) (Xu, Cai, Zhang, 2020). Так, низкие концентрации фенгицинов не оказывают какого-либо влияния на клеточные стенки, в то время, как высокие концентрации вызывают образование крупных пор из-за чего теряется способность удерживать содержимое клеток (Соколова Г.Д., Глинушкин А.П., 2017).

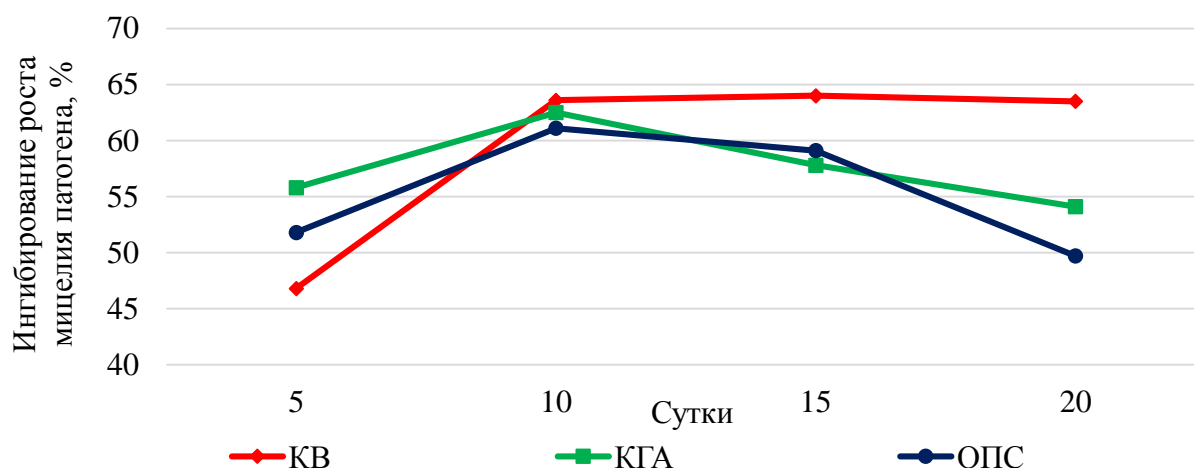


Рисунок 31 – Антифунгальная активность штамма *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. graminearum* BZR 4

При этом важно отметить, что только на оптимизированной среде штамм *B. subtilis* BZR 336g обладал высокой подвижностью – уже на пятые сутки совместной инкубации биоагент занял всю площадь питательной среды, блокируя рост патогена (рисунок 32).

Кроме того, среди особенностей воздействия метаболитов активных штаммов бактерий на *F. graminearum* BZR 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 (Максимов, Веселова, Нужная, 2015).

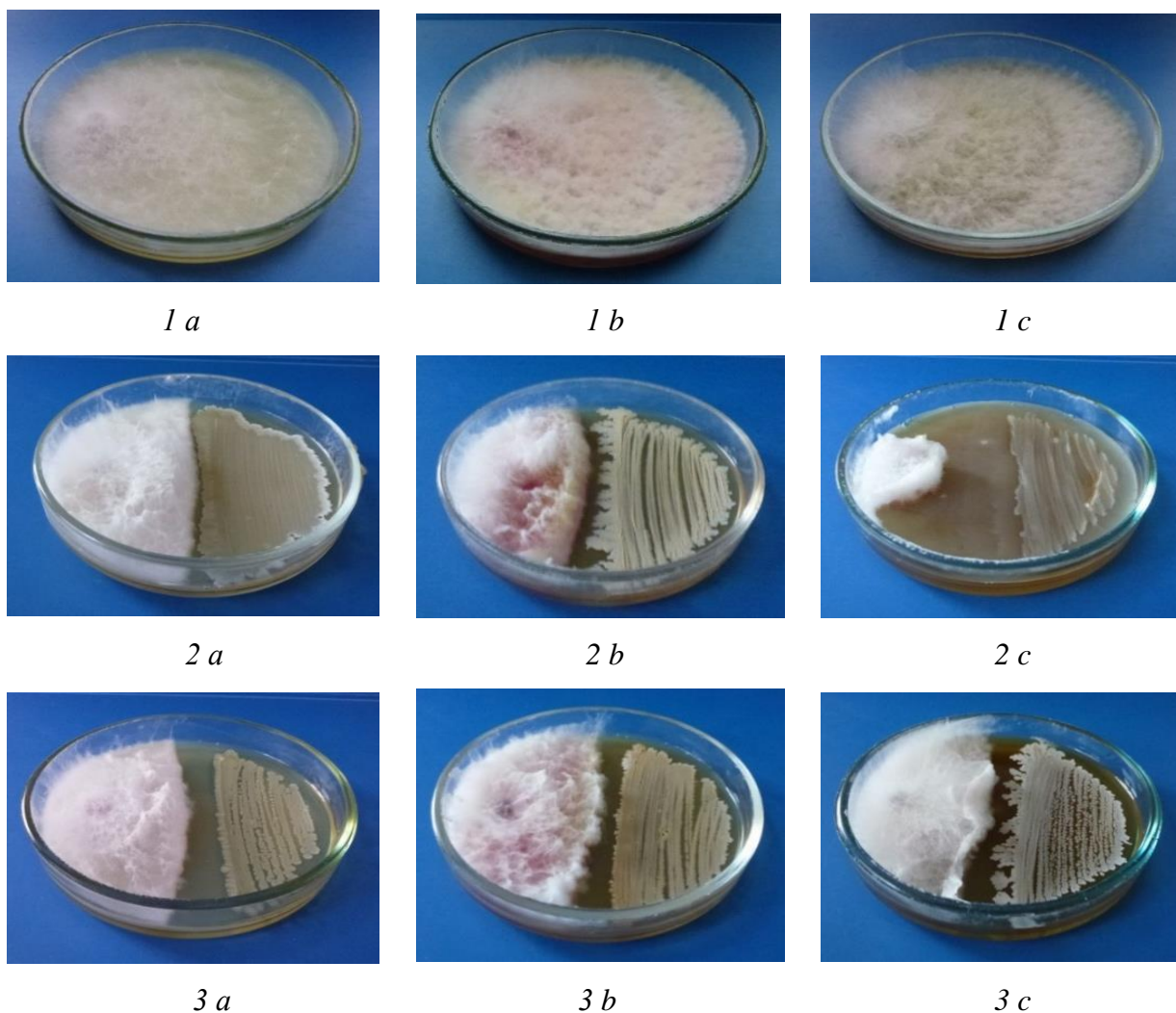


Рисунок 32 – Антифунгальная активность штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. graminearum* BZR 4 на различных питательных средах

a – KB; *b* – КГА; *c* – ОПС;

1 – контроль (чистая культура *F. graminearum* BZR 4 без антагониста); 2 – двойная культура *F. graminearum* BZR 4 и *B. subtilis* BZR 336g; 3 – двойная культура *F. graminearum* BZR 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 33, 34).

Анализ метаболитов под УФ366 светом позволил нам сделать некоторые предположения относительно их химической структуры. 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.

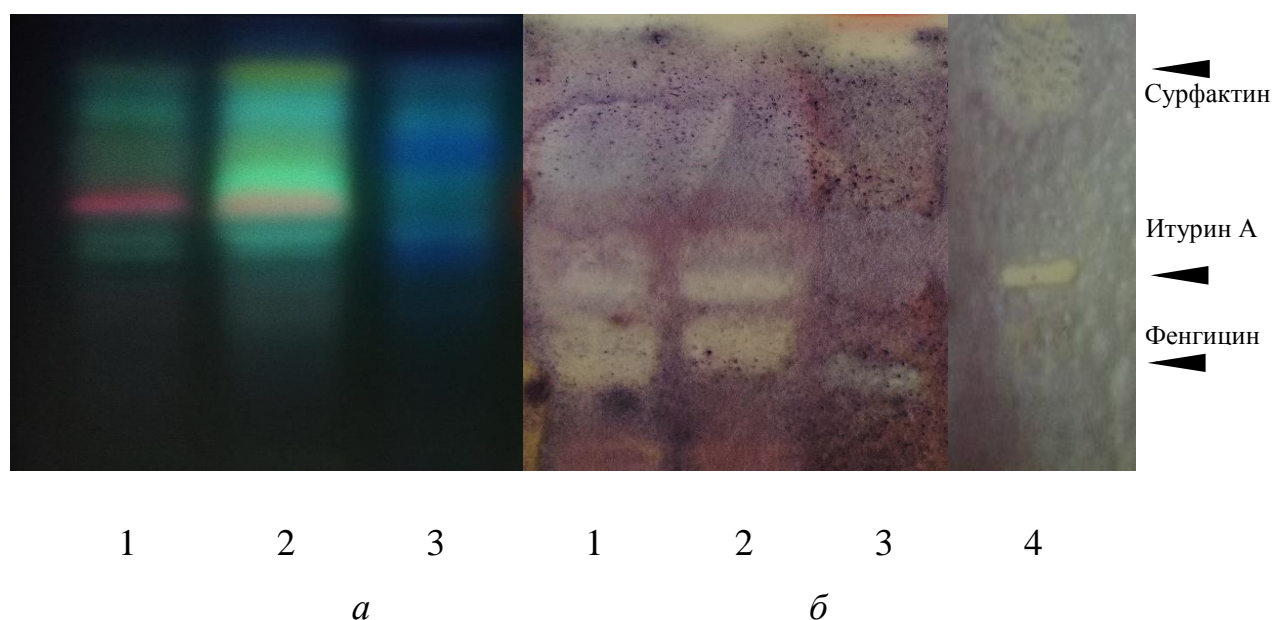


Рисунок 33 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6)

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

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

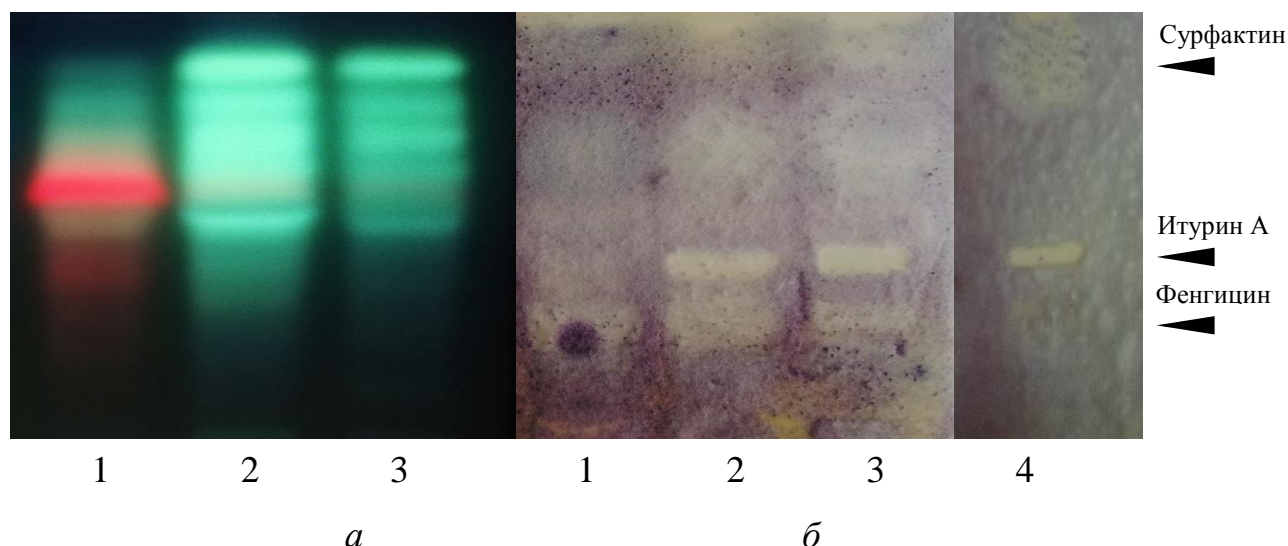


Рисунок 34 – Хроматограмма в УФ 366 (а) и биоавтограмма (б) супернатанта штамма *B. subtilis* BZR 517 (тест-культура *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR 6)

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

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

3.4 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

Многими авторами отмечено положительное влияние предпосевной обработки семян препаратами на основе бактерий рода *Bacillus* (Mahmood, Turgay, Farooq, 2016; Arkhipova, Galimsyanova, Kuzmina, 2019). Мы провели оценку лабораторных образцов биопрепаратов, полученных на стандартных и оптимизированных питательных средах, на фоне искусственного заражения *F. graminearum* BZR 4 в условиях климатической камеры, на растениях озимой пшеницы сорт Батько (таблица 4). 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 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%.

Таблица 4 – 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	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	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}
Примечание: * - 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		

На следующем этапе были проведены исследования влияния ЖК штаммов на рост и развитие проростков озимой пшеницы (таблица 5, рисунок 35).

Таблица 5 – Влияние ЖК штаммов на рост и развитие растений озимой пшеницы на фоне искусственного заражения грибом *F. graminearum* BZR 4 с применением различных питательных сред, климатическая камера, сорт Батько, 2014 г.

Вариант	прибавка массы побега, %	прибавка массы корня, %	прибавка длины побега, %	прибавка длины корня, %
Кинто Дуо, КС, химический эталон, 2,5 л/т	0 ^a	15,5 ^a	0 ^a	20,8 ^{ab}
Фитоспорин-М, Ж, биологический эталон, 2л/т	0,33 ^a	0 ^a	26,8 ^{cd}	1,3 ^{ab}
КВ				
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0 л/т	0 ^a	0 ^a	6,0 ^{abc}	39,6 ^b
<i>B. subtilis</i> BZR 517, 2,0 л/т	0 ^a	0 ^a	15,2 ^{abcd}	8,9 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (3,0+2,0)	0 ^a	2,23 ^a	17,9 ^{abcd}	28,3 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (2,0+1,0)	5,6 ^a	9,97 ^a	4,9 ^{abc}	0 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (1,0+1,0)	16,7 ^b	47,3 ^b	22,3 ^{abcd}	8,8 ^{ab}
КТС				
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0 л/т	21,4 ^b	10,3 ^a	17,0 ^{abcd}	1,7 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 517, 2,0 л/т	24,9 ^b	20,4 ^{ab}	25,6 ^{bcd}	37,3 ^b
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (3,0+2,0)	17,3 ^b	0 ^a	24,7 ^{abcd}	23,8 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (2,0+1,0)	3,72 ^a	0 ^a	9,5 ^{abcd}	2,1 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (1,0+1,0)	16,9 ^b	0 ^a	25,4 ^{bcd}	7,0 ^{ab}
ОПС				
<i>B. subtilis</i> BZR 336g, 3,0 л/т	5,2 ^a	13,4 ^a	15,9 ^{abcd}	19,5 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 517, 2,0 л/т	0,08 ^a	0 ^a	20,5 ^{abcd}	0 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (3,0+2,0)	25,2 ^b	15,7 ^a	30,2 ^d	0 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (2,0+1,0)	9,4 ^a	0 ^a	24,5 ^{bcd}	8,2 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 336g + <i>B. subtilis</i> BZR 517 (1,0+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				

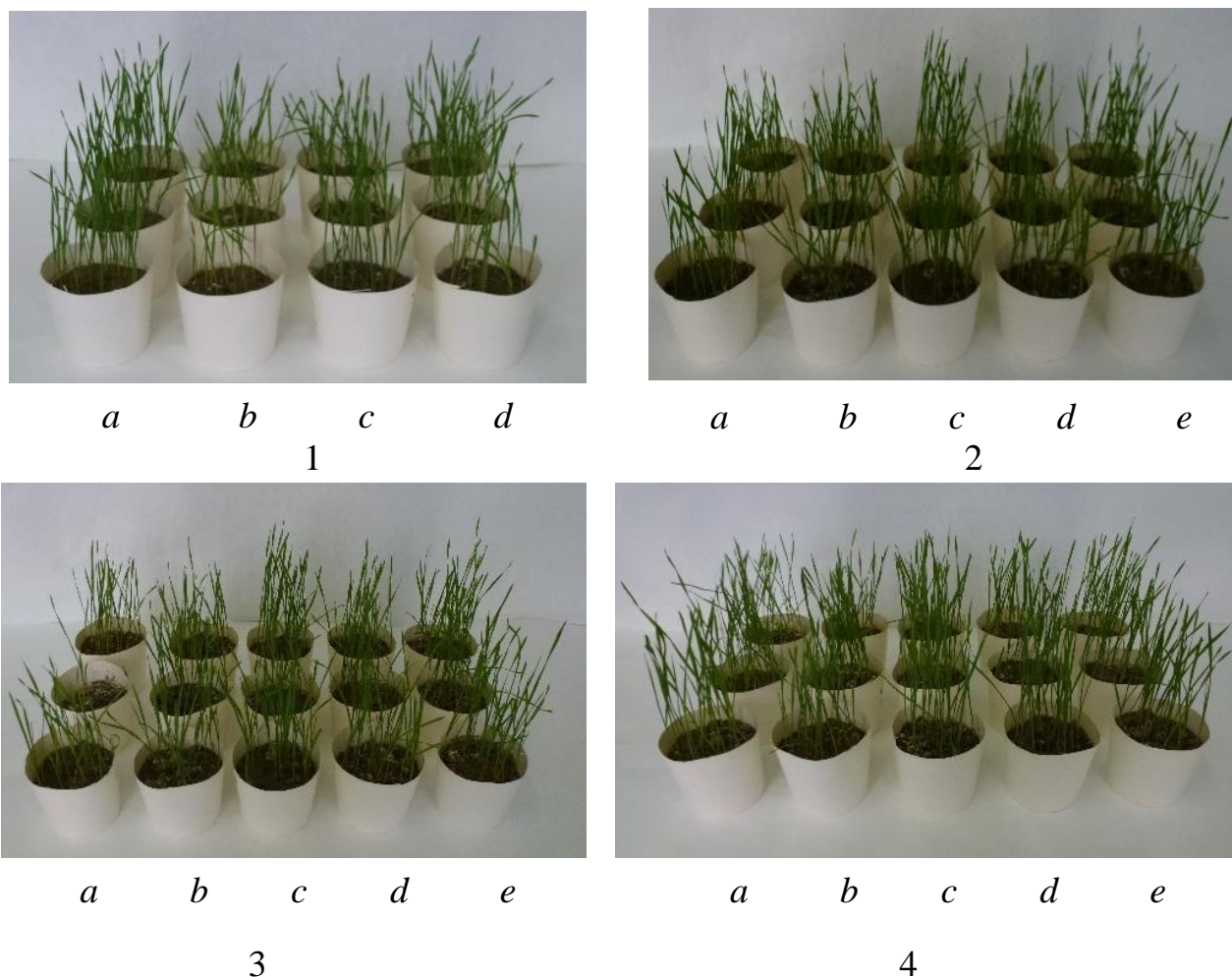


Рисунок 35 – Влияние ЖК штаммов на рост и развитие растений озимой пшеницы на фоне искусственного заражения грибом *F. graminearum* BZR 4 с применением различных питательных сред

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

2 – КГС; 3 – КВ; 4 – ОПС

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

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 (Асатурова, 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 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. Такие результаты обусловлены способностью штаммов бактерий рода *Bacillus* как непосредственно стимулировать рост растений за счет синтеза регуляторов роста (ауксины), так и опосредованной влиять на рост растений за счет синтеза антибиотиков, биосурфактантов и сидерофоров, подавляющих рост и развитие фитопатогенов (Максимов, Веселова, Нужная, 2015).

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

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.

3.5 Контроль качества лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

В производстве биопрепаратов важным завершающим этапом является приготовление препаративной формы. Ее качество – одно из условий высокой эффективности и стабильности биопрепарата. Препаративная форма тесно связана с технологией применения биопрепаратов и их сроком хранения. Правильно подобранная препаративная форма позволяет создать оптимальные условия для доставки к целевому объекту, снизить норму расхода препарата, обеспечить равномерное распределение пестицида по обрабатываемой поверхности, продлить сроки его действия (Штерншис 2012, Новикова 2010). Наибольшее распространение на современном рынке биопрепаратов получила жидкая форма, представляющая собой ЖК с клетками агента установленного титра. Такая форма наименее трудо- и энергозатратна (Саламатова, 2010).

Основными техническими требованиями к биопрепарату являются количество колониеобразующих единиц, антифунгальная активность, однородность состава и растворимость, безопасность (рисунок 36).

Титр (количество колониеобразующих единиц) является одним из важнейших показателей качества биопрепарата. От данного показателя в том числе зависит его эффективность. В ходе исследований установлено, что титр лабораторных образцов биопрепаратов составляет $(2,4 \pm 0,2) \times 10^9$ КОЕ/мл для штамма *B. subtilis* BZR 336g и $(4,1 \pm 0,2) \times 10^8$ КОЕ/мл для штамма *B. subtilis* BZR 517.

*a**b**1**a**b**2*

Рисунок 36 – Лабораторные образцы биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

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

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

Изучение антифунгальной активности лабораторных образцов биопрепаратов на основе исследуемых штаммов показало, что штаммы *B.*

subtilis BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 проявляют высокую антагонистическую активность по отношению к грибам р. *Fusarium* – возбудителям фузариоза зерновых культур. В результате исследований отмечено, что применение лабораторных образцов биопрепаратов обеспечило антагонистическую активность 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.

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

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.

3.6 Разработка технических условий и лабораторных регламентов производства биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517

В результате исследования условий культивирования и оптимизации питательной среды для культивирования штаммов-продуцентов биопрепаратов предложена схема получения комплексного биопрепаратов на основе штамма *Bacillus subtilis* BZR 336g и на основе штамма *Bacillus 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 озимой пшеницы 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 7).

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 (приложение 8);

- патент РФ на изобретение № 2553518 от 20.05.2015 «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* для получения биофунгицида против фитопатогенных грибов» (приложение 9);

- заключение о патогенности штамма *B. subtilis* BZR 336g для теплокровных животных от 17.05.2013 г. (приложение 10).

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 (приложение 8);

- патент РФ на изобретение № 2552146 от 29.04.2015 «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* BZR 517 для получения биофунгицида против фитопатогенных грибов» (приложение 9);

- заключение о патогенности штамма *B. subtilis* BZR 517 для теплокровных животных от 17.05.2013 г. (приложение 10).

- патент РФ на изобретение № 2621356 от 02.06.2017 «Биофунгицид для защиты сельскохозяйственных культур от болезней и повышения урожайности» (приложение 11).

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

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

Для получения комплексных бактериальных биопрепаратов на основе *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 используют оригинальную оптимизированную питательную среду следующего состава: хлористый калий, магний 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 оптимизированной питательной среды 100 мл и последующим культивированием. Агаризованные блоки вырезаются стерильным ланцетом, предварительно прокаленным в стерилизаторе StenMax15. Внесение агаризованных блоков осуществляется в ламинарном шкафу с вертикальным потоком воздуха SafeFAST Elite, для обеспечения стерильности работы. После внесения агаризованных блоков колбы накрываются ватно-марлевыми крышками и плотно завязываются резинками и устанавливаются в термостатированные системы культивации клеток New Brunswick Scientific Excella E25. Инкубация осуществляется при 180 об./ мин. в течение 48 ч. при температуре 30 °С для получения биопрепарата на основе *B. subtilis* BZR 336g и при 36 ч. при температуре 35 °С для получения биопрепарата на основе *B. subtilis* BZR 517.

Комплексные биопрепараты на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 получают внесением маточной культуры (2,0 % от объема питательной среды) в конические колбы (1000 мл) с объемом

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

Далее осуществляются слив и упаковка биопрепаратов в тару из пластических масс, которые являются наиболее гигиеничными, удобными, гарантирующими защиту биопрепарата от вредных воздействий атмосферного воздуха и загрязнения.

Детально проработанны и оформлены лабораторные регламенты на каждый комплексный бактериальный биопрепарат (приложение 12).

Полученные экспериментальные данные в рамках лабораторных регламентов и ТУ будут переданы для последующей разработки передовых технологий: разработка технологии производства биопрепаратов комплексного действия на основе перспективных штаммов бактерий-антагонистов с высокой антифунгальной и ростостимулирующей активностью. Использование данной технологии в перспективе позволит максимально удовлетворять потребности региональных сельхозтоваропроизводителей, что особенно актуально для юга России, так как тенденцией современного этапа развития биологической защиты растений в РФ является существование не только крупнотоннажного производства биопрепаратов, но и их наработка в условиях биолaborаторий или небольших фирм.

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

Испытания лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на фоне естественного заражения в условиях мелких делянок были проведены в течение трех лет в период с 2013 по 2015 гг. на экспериментальной базе ФГБНУ ФНЦБЗР (рисунок 37, таблица 6). Для закладки опыта была использована мягкая озимая пшеница сорта Калым.



Рисунок 37 – общий вид участка (экспериментальная база ФГБНУ ФНЦБЗР, мелкие делянки, 2012 г.) (ориг.)

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.

Таблица 6 – Биологическая и хозяйственная эффективность лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336 g 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, %*	Урожай-ность, т/га	Сохранен-ный урожай, т/га	Масса 1000 зерен, г	БЭ, %	Урожай-ность, т/га	Сохранен-ный урожай, т/га	Масса 1000 зерен, г	БЭ, %	Урожай-ность, т/га	Сохранен-ный 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

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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азизбемян, Р.Р. Использование спорообразующих бактерий в качестве биологических средств защиты растений / Р.Р. Азизбемян // Биотехнология. – 2013. – №1. – С. 69-77.
2. Антонова, Г.Н. Агроэкологическое обоснование применения препаратов на химической и биологической основе в борьбе с болезнями перца / Г. Н. Антонова // Вестник Курганской ГСХА № 4. – 2014. – С. 13-15.
3. Асатулова, А.М. Изучение кинетики роста штаммов бактерий-антагонистов возбудителей фузариоза при периодическом культивировании / А.М. Асатулова // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК. – 2008. – Вып. 1 (138). – С. 79-82.
4. Асатулова, А.М. Перспективные штаммы бактерий – продуценты микробиопрепаратов для снижения вредоносности фузариоза на подсолнечнике: дисс... канд. биол. наук: 06.01.11 / Асатулова Анжела Михайловна. – СПб., 2009. – 176 с.
5. Асатулова, А.М. Физиологические признаки перспективных штаммов бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas* – продуцентов микробиопрепаратов / А.М. Асатулова // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК. – 2009. – Вып. 2 (141). – С. 60-66.
6. Асатулова А.М. Отбор перспективных агентов биологического контроля для защиты озимой пшеницы от возбудителей фузариоза [электронный ресурс] / А.М. Асатулова, В.М. Дубяга, Н.С. Томашевич, М.Д. Жарникова // Электронный политематический научный журнал КубГАУ. – 2012. – №75 (01). Режим доступа [<http://ej.kubagro.ru/2012/01/pdf/37.pdf>].
7. Астарханова, Т.С. Биометод в защите винограда / Т.С. Астарханова, И.Р. Астарханов, Э.А. Савзиева, А.К. Балаханов // Защита и карантин растений. – 2010. – №7. – С. 30-31.

8. 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
9. Белошапкина, О.О. Биопрепараты в защите садовых растений против фитопатогенных грибов / О.О. Белошапкина // «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем» с молодежной стратегической сессией «Кадры, ресурсы, возможности, инновации». Материалы Международной научно-практической конференции. – Краснодар. – 2016. – С. 533-537.
10. Биологическая защита растений / под ред. М.В. Штерншис. – М.: Колос. 2004. – 264 с.
11. Бирюков, В.В. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза / В.В. Бирюков, В.М. Кантере – М.: Наука, 1985. – 296 с.
12. Борисовец, Д.С. Оптимизация состава среды для культивирования штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из донных отложений пресноводных водоемов / Д.С. Борисовец, Е.С. Журавлева, Т.А. Зуйкевич, П.А. Красочко, Я.П. Яромчик, А.М. Морозов, И.А. Курбат // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2020. – № 2. – С. 3-12.
13. Бугрова, А.Н. Химические пестициды и их влияние [Электронный ресурс] / А.Н. Бугрова, А.А. Власова, В.А. Ротанова, А.С. Сочнева, А.И. Торопова // Современные научные исследования и инновации. – 2020. – № 12. Режим доступа: <http://web.snauka.ru/issues/2020/12/94226>
14. 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 ОГУ. – 2012. – №10 (146). – С61-65.

15. Ваксман З.А. Антагонизм микробов и антибиотические вещества / З.А. Ваксман – М.: Гос.изд-во иностр. лит., 1947. – 391 с.
16. Ванюшина, О. И. Органическое сельское хозяйство в России: особенности и перспективы развития / О. И. Ванюшина // Актуальные вопросы развития современного общества. – 2019. – С. 72-75.
17. Власова, О. И. Эффективность использования биопрепаратов при возделывании озимой пшеницы / О. И. Власова, Е. А. Данилец, В. М. Передериева, И. А. Вольтерс // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2019. – № 149. – С. 23-30. DOI: 10.21515/1990-4665-149-011
18. Высоцкая, Е.А. Анализ технологических приемов и технических средств предпосевной обработки семян биопрепаратами / Е.А. Высоцкая, М.А. Крекотень // Вестник Воронежского Государственного Аграрного Университета. – 2015. – № 4-2 (47). – С. 100-104.
19. 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. – 2011. – № 2. – С. 7-14.
20. ГОСТ 2.114-95 Технические условия. – Минск.: ИПК Издательство стандартов № 1995. 1995. – 25 с.
21. ГОСТ Р 54763-2011 Средства лекарственные для ветеринарии. Технологические регламенты производства. – М.: Стандартинформ. 2013. – 79 с.
22. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Ч.1. М.: Министерство сельского хозяйства. 2022. – 820 с.
23. Градова, Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии / Н.Б. Градова, И.Б. Бабусенко, Н.Б. Горнова – М.: ДеЛи принт. 2004. – 144 с.

24. Давлетшин, Ф.М. Использование биопрепарата Фитоспорин при возделывании яровой пшеницы в южной лесостепи Республики Башкортостан / Ф.М. Давлетшин, Х.М. Сафин, Д.С. Аюпов // Достижения науки и техники АПК. – 2010. – №10. – С. 12-14.

25. Дрегваль, О.А. Підбір оптимальних режимів кислотності середовища та аерації при глибинному культивуванні *Bacillus thuringiensis* та *Beauveria bassiana* / О.А. Дрегваль, Н.В. Черевач, А.І. Вінніков // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2010. – Вип. 18. – Т. 1. – С. 15–19.

26. Дроздова, Н. И. Влияние биопрепарата инсектицидного действия Фитоверм на активность липазы / Н. И. Дроздова, Е. В. Сорокина // Эпоха науки. – 2019. – №20. – С. 604-607.

27. Долженко, В.И. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве / В.И. Долженко. – Спб. 2009. – 280 с.

28. 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.

29. Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров – М.: Изд-во МГУ; Наука. 2004. – 528 с.

30. Емельяненко, В.А. Зависимость жизнедеятельности бифидобактерий от кислотности среды культивирования / В.А. Емельяненко, А.М. Королюк // Наука и современность. – 2010. – № 2 (1). – С.23-28.

31. Ефремов, Н.А. Индустрия органики: мировой опыт и российские перспективы / Н.А. Ефремов, М.П. Чердакова // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 5. – С. 405-409.

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

33. Зими́на, М.И., Исследование процесса синтеза бактериоцинов / М.И. Зими́на, А.Ф. Газиева // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2017. – №3-1. – 3 с.
34. Кириченко, К.С. Почвы Краснодарского края / К.С. Кириченко. - Краснодар: Крайгосиздат, 1953. – 236 с.
35. Кирсанова, Е.В. Изучение эффективности использования биопрепаратов на зерновых, зернобобовых и крупяных культурах / Е.В. Кирсанова // Вестник Орел ГАУ. – 2011. – № 5(32). – С. 111-116.
36. Коноваленко, Л. Ю. Биологические средства защиты растений для органического земледелия / Л. Ю. Коноваленко // Итоги и перспективы развития агропромышленного комплекса. – 2018. – С. 26-36.
37. Коробова, Л.Н. Агроэкологический аспект защиты яровой пшеницы от болезней с помощью биопрепаратов / Л.Н. Коробова, Т.В. Гаврилец // Вестник Новосибирского ГАУ. – № 3. – 2005. – С. 15-23.
38. 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.
39. Лобанов, В.Г. Структурно-функциональные характеристики гуминовых кислот почвы Краснодарского края / В.Г. Лобанов, А. В. Александрова, К. Н. Шурай, А. С. Авдеев, И. Д. Рашид // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского Государственного Аграрного Университета. – 2015. – № 109. – С. 1016-1025.
40. Лысак, Л.В. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий Изд. и перераб. доп. / Л.В. Лысак, Т.Г. Добровольская, И.Н. Скворцова – М.: Макс Пресс, 2003. – 120 с.
41. Майоров, А.А. Анализ параметров существования и размножения микроорганизмов / А.А. Майоров // Техника и технология пищевых производств. – 2012. – № 3. – С. 1-5.

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

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

44. Маркетинговые исследования российского рынка биологических средств защиты растений. Research Techart. 2012. – 41 с.

45. Маслиенко, Л.В. Обоснование и разработка микробиологического метода борьбы с болезнями подсолнечника: автореф. дис. ... док. биол. наук: 06.01.11 / Маслиенко Любовь Васильевна. – Краснодар, 2005. – 49 с.

46. 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. 5-9.

47. Митина, Н.Л. Биоорганическое земледелие: история, проблемы и перспективы / Н.Л. Митина, С.В. Резвякова // Экология ЦЧО РФ. – 2012. – № 2 (29). – С. 135-136.

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

49. 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.

50. Новикова, И.И. Биологическое обоснование создания и применения полифункциональных биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем: автореф. дис. ... док. биол. наук: 06.01.11 / Новикова Ирина Игоревна. – СПб., 2005. – 46 с.

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

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

53. Павлюшин, В. А. Научное обеспечение защиты растений и продовольственная безопасность России / В.А. Павлюшин // Защита и карантин растений. – 2010. – № 2. – С. 11-15.

54. Пакина, Е.Н. Сравнительная оценка влияния биологических и химического препаратов на развитие всходов капусты / Е.Н. Пакина, Т.А. Сысолятина, К.В. Слободянюк // Вестник РУДН. Серия: Агрономия и животноводство. – 2011. – №1. – С. 28-33

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

56. Патент на изобретение №2552146 от 29.04.2015 «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* BZR 517 для получения биопрепарата против фитопатогенных грибов».

57. Патент на изобретение №2553518 от 20.05.2015 «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* BZR 336g для получения биопрепарата против фитопатогенных грибов».

58. Перерва, Т.П. Оптимизация бактериальных питательных сред экстрактом *Ungerniia viictoriis* / Т.П. Перерва, Г.Ю. Мирюта, А.С. Дворник, Л.П. Можилевська, В. А. Кунах // Біотехнологія. – 2011. – Т. 4. – №4. – С. 59-64.
59. Перт, С.Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С.Д. Перт – М.: Мир, 1978. – 333 с.
60. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608с.
61. Пусенкова, Л.И. Повышение адаптивного потенциала посевов сахарной свеклы микробными биопрепаратами в условиях биотических и абиотических стрессов / Л.И. Пусенкова, Е.Ю. Ильясова, И.В. Максимов, О.В. Ласточкина // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – №1. – С. 115-123.
62. Разина, А.А. Влияние азотных удобрений на рентабельность протравливания / А.А. Разина, О.Г. Дятлова // Защита и карантин растений. – 2015. – №2. – С. 18-19
63. Резанова, Г.И. Роль биопрепаратов при возделывании озимой пшеницы / Г.И. Резанова // Научно-агрономический журнал. – 2013. – №1 – (92). – С. 20-22
64. 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. – Т. 89. – №. 3. – С. 140-142.
65. Российский рынок биологических средств защиты растений. Research Techart. 2014. – 29 с. Режим доступа:
<http://techart.ru/files/publications/publication-674.pdf>
66. Рубанов, Н.И. Рынок биопродуктов в растениеводстве / Н.И. Рубанов, А.А. Фомин // Московский экономический журнал. – 2018. – №3. – С. 76-96. DOI 10.24411/2413-046X-2018-13002

67. Санин, С.С. Эффективность биопестицидов и регуляторов роста растений в защите пшеницы от болезней / С.С. Санин, Л.Н. Назарова, Н.П. Неклеса, Т.М. Полякова, С. Гудвин // Защита и карантин растений. – 2012. – №3. – С. 16-18
68. Саубенова, М.Г. Влияние состава среды на антагонистическую активность молочнокислых микроорганизмов / М.Г. Саубенова, Е.А. Олейникова // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – №3. – С. 83-86.
69. Сидорова, Т.М. Выделение и характеристика антигрибных метаболитов штаммов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus subtilis* BZR 517 модифицированным методом биоавтографии / Т.М. Сидорова, А.М. Асатурова, А.И. Хомяк, Н.С. Томашевич // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т. 54. – № 1. – С. 178-185. doi: 10.15389/agrobiology.2019.1.178eng
70. Скворцова, И.Н. Методы идентификации и выделения почвенных бактерий рода *Pseudomonas* / И.Н. Скворцова – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981. – 78 с.
71. Сложенкина, М.И. Некоторые экологические проблемы при производстве продуктов питания / М.И. Сложенкина, И.Ф. Горлов // Пищевая индустрия. – 2017. – № 3(43). – С. 24-26.
72. 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.
73. Соколова, Г.Д. Антагонисты фитопатогенного гриба *Fusarium graminearum* / Г.Д. Соколова, А.П. Глинушкин // Микология и фитопатология. – 2017. – Т. 51. – № 4. – С. 191-201.
74. Соболева, О.М. Роль ризосферных бактерий в повышении экологизации агроценозов / О.М. Соболева // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – №5. – С. 19-22.

75. Стамо, П.Д. Применение фунгицидов должно быть рациональным / П.Д. Стамо, О.В. Кузнецова // Защита и карантин растений. – 2012. – №2. – С. 5-8

76. 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.

77. Терентьев, С. Е. Развитие органического сельского хозяйства в Российской Федерации / С. Е. Терентьев, А. Е. Ковалёва // Научное обеспечение устойчивого развития агропромышленного комплекса горных и предгорных территорий. – 2018. – С. 161-164.

78. Уромова, И.П. Влияние биопрепаратов на продуктивность и качество картофеля / И.П. Уромова, А.В. Козлов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2020. – № 5. – С. 77-81.

79. Усанов, В.С. 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.Ю. Татаренко // Дальневосточный аграрный вестник. – 2020. – № 3 (55). – С. 117-124. DOI: 10.24411/1999-6837-2020-13040

80. Фань, С. Оптимизация производства липопептидов, синтезируемых *Bacillus amyloliquefaciens* B15, методом анализа на поверхности отклика / С. Фань, Х. Чжу, Д. Го, С.Н. Золотухин, Т.Г. Юдина, Д. Ван // Вестник Ульяновской ГСХА. – 2015. – №1 (29). – С. 51-58.

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

82. 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

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

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

85. Цыпышева, М.Ю. Эффективность применения биопрепаратов и листовых фунгицидов на яровой пшенице / М.Ю. Цыпышева // Известия ОГАУ. – 2014. – №4 (48). – С. 51-53.

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

87. Чекалова, К.В. Разработка новой препаративной формы биологических фунгицидов на основе клеток микроорганизмов *Trichoderma viride* и *Pseudomonas fluorescens*: автореф. дис.... канд. биол. наук: 03.00.23 / Чекалова Ксения Владимировна. – М., 2007. – 20 с.

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

89. Шешегова, Т.К. Применение биопрепаратов в технологии возделывания озимой ржи и озимой тритикале / Т.К. Шешегова, Л.М. Щеклеина, Л.И. Кедрова // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – №6. – С. 48-50.

90. Штерншис, М.В. Тенденция развития биотехнологии микробных средств защиты растений в России / М.В. Штерншис // Вестник Томского ГУ. Биология. – 2012. – №2(18). – С. 92-100.

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

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

93. 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

94. Якуба, Г.В. Разработка элементов технологии применения перспективных микробиологических препаратов при защите яблони от парши и мучнистой росы / Г.В. Якуба, Д.Н. Гусин // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Материалы международной научно-практической конференции. Краснодар, 2010. – С. 342-345.

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

96. Abas, M.R. 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, A.A. Hamid, M.H.M. Isa // International

Conference on Food and Agricultural Sciences. – 2013. – Vol. 55. – № 17. – P. 87-93.

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

98. Abriouel, H. Diversity and application of *Bacillus bacteriocins* / H. Abriouel, C.M. Franz, N.B. Omar, A. Galvez // FEMS Microbiology Reviews. – 2011. – Vol. 35. – P.201-232.

99. 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.

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

101. Al-Bahry, S.N. 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, A.S. Al-Bemani, S.J. Joshi, H.S. Al-Makhmari, H.S. Al-Sulaimani // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2013. – № 81. – P. 141-146.

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

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

104. Arkhipova, T. Effect of seed bacterization with plant growth-promoting bacteria on wheat productivity and phosphorus mobility in the rhizosphere / T. Arkhipova, N. Galimsyanova, L. Kuzmina, L. Vysotskaya, L. Sidorova, I. Gabbasova, A. Melentiev, G. Kudoyarova // Plant Soil Environmental. – 2019. – Vol. 65. – P. 313-319. <https://doi.org/10.17221/752/2018-PSE>

105. Arnaouteli, S. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions / S. Arnaouteli, N.C. Bamford, N.R. Stanley-Wall, Á. T. Kovács // Nature Reviews Microbiology. – 2021. – P. 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00540-9>

106. Asaturova, A.M. Development of environmentally friendly bacterial biopreparations for the protection of fall wheat from *Fusarium* pathogens and other diseases / A.M. Asaturova, V.M. Dubyaga, N.S. Tomashevich, M.D. Zharnikova, N.A. Zhevnova, A.I. Homyak // 10th International conference on plant diseases. – 2012. – P. 709-716.

107. 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>.

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

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

110. Casals, C. The combination of curing with either chitosan or *Bacillus subtilis* CPA-8 to control brown rot infections caused by *Monilinia fructicola* / C.

Casals, P.A.G. Elmer, I. Vinas // Postharvest Biology and Technology. – 2012. – № 64. – P. 126-132.

111. 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.

112. Chen, X. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot / X. Chen, Y. Zhang, X. Fu, Y. Li, Q. Wang // Postharvest Biology and Technology. – 2016. – Vol. 115. – P. 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.021>.

113. 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.

114. Constantinescu, F. In vitro compatibility between chemical and biological products used for seed treatment / F. Constantinescu, O.A. Siciua, C. Fatu, M. M. Dinu, A.M. Andrei, C. Mincea // Scientific Papers. Series A. Agronomy. – 2014. – Vol. 57. – P. 146-151.

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

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

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

118. Diaz de Velegas, M. Influencia del pH y la temperatura en la produccion de las fitotoxinas producidas por la *Pseudomonas aeruginosa* PSS.

Evaluacion de su efectividad en el control de malezas / M. Diaz de Velegas, A. Garsia, B. Seijas // Fitosanidad. – 2005. – Vol. 9. – №3. – P. 41-49.

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

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

121. Dunlap, C.A. Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of Fusarium head blight / C.A. Dunlap, D.A. Schisler, N.P. Price, F. Vaughn // Journal of Microbiology. – 2011. – Vol. 49. – № 4. – P. 603-610.

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

123. 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>

124. 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.

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

126. Fira, D. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species / D. Fira, I. Dimkić, T. Berić, J. Lozo, S. Stanković // Journal of biotechnology. – 2018. – Vol. 285. – P. 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
127. Gašić, S. Biopesticide formulations, possibility of application and future trends / S. Gašić, B. Tanović // Pesticides And Phytomedicine. – 2013. – Vol. 28. – № 2. – P. 97-102.
128. 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.
129. 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.
130. Glare, T. Have biopesticides come of age / T. Glare, J. Caradus, W. Gelernter, T. Jackson, N. Keyhani, J. Kohl, A. Stewart // Trends in Biotechnology. – 2012. – Vol. 30. – № 5. – P. 250-258.
131. Glick, B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications / B.R. Glick // Hindawi Publishing Corporation, Scientifica. – 2012. – Vol. 2012. – 15 p. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>
132. Grover, M. Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24 / M. Grover, L. Nain, S.B. Singh, A.K. Saxena // Current Microbiology. – 2010. – Vol. 60(2). – P. 99-106.
133. Gauvry, E. 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, I. Leguérinel, L. Coroller // International Journal of Food Microbiology. – 2020. – № 337. – P. 108915. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108915>

134. Gojgic-Cvijovic, G. D. Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium / G. D. Gojgic-Cvijovic, D. M. Jakovljevic, B. D. Loncarevic, N. M. Todorovic, M. V. Pergal, J. Ciric, K. Loosc, V.P. Beskoski, M. M. Vrvic // International journal of biological macromolecules. – 2019. – V. 121. – P. 142-151. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.019>
135. 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.
136. He, Z. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymixa* strain that corproduces a novel lantibiotic and polymyxin / Z. He, D. Kislá, L. Zhang // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73. – № 1. – P. 168-178.
137. Hernández, C.A. Ethanol induction of laccase depends on nitrogen conditions of *Pycnoporus sanguineus* / C.A. Hernández, N. Sandoval, J. Mallerman, J.A. García-Pérez, A.-M. Farnet, I. Perraud-Gaime, E. Alarcón // Electronic Journal of Biotechnology. – 2015. – № 18. – P. 327–332.
138. Hinarejos, E. *Bacillus subtilis* IAB/BS03 as a potential biological control agent / E. Hinarejos, M. Castellano, I. Rodrigo, J. M. Bellés, V. Conejero, M. P. López-Gresa, P. Lisón // European Journal of Plant Pathology. – 2016. – № 146. – P. 597-608. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0945-3>
139. Horak, I. 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, S. Claassens // Journal of Applied Microbiology. – 2019. – Vol. 127. – №2. – P. 326-343. <https://doi.org/10.1111/jam.14218>
140. Hubbard, M. The biochemistry behind biopesticide efficacy / M. Hubbard, R.K. Hynes, M. Erlandson, K.L. Bailey // Sustainable Chemical Processes. – 2014. – № 2. – P. 18.
141. Ibrahim, A.S.S. 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, A. A. Al-Salamah // Electronic Journal of Biotechnology. – 2011. Режим доступа: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v14n5-4>.

142. Jemil, N. Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain / N. Jemil, A. Manresa, F. Rabanal, H. Ben Ayed, N. Hmidet, M. Nasri // Journal of Chromatography B. – 2017. V. 1060. – P. 374-386. DOI:10.1016/j.jchromb.2017.06.013

143. Ji, X. 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, S. Zhang, B. Dong, K. Qiao // Plant disease. – 2019. – V. 103. – № (8). – P. 1991-1997. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0143-RE>

144. Jorjani, M. Controlling sugar beet mortality disease by application of new bioformulations / M. Jorjani, A. Heydari, H.R. Zamanizadeh, S. Rezaee, L. Naraghi, P. Zamzami // Journal of plant protection research. – 2012. – V. 52. – № 3. – P. 303-307.

145. Kambourova, M. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* / M. Kambourova, N. Kirilova, R. Mandeva, A. Derekova // Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic. – 2003. – V. 7. – № 22. – P. 307-313.

146. 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.

147. Khadka, S. Screening and optimization of newly isolated thermotolerant *Lysinibacillus fusiformis* strain SK for protease and antifungal activity / S. Khadka, S. Adhikari, A. Thapa, R. Panday, M. Adhikari, S. Sapkota,

R. S. Regmi, N. P. Adhikari, R. Proshad, N. Koirala // *Current Microbiology*. – 2020. – V. 77. – P. 1558–1568. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01976-7>

148. 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.

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

150. Kilani-Feki, O. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease / O. Kilani-Feki, S. B. Khedher, M. Dammak, A. Kamoun, H. Jabnoun-Khiareddine, M. Daami-Remadi, S. Tounsi // *Biological Control*. – 2016. – V. 95. – P. 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.005>

151. Kim, M.H. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin GO5 by *Micrococcus* sp. GO5 / M.H. Kim, Y.J. Kong, H. Baek, H.H. Hyun // *Journal of Biotechnology*. – 2006. – № 121. – P. 54-61.

152. 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.

153. Klein, W. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures / W. Klein, W. M. H. Weber, M. A. Marahiel // *Journal of Bacteriology*. – 1999. – Vol. 181. – P. 5341–5349.

154. Köhl, J. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria / J. Köhl, J. Postma, P. Nicot, M. Ruocco, B. Blum // *Biological Control*. – 2011. – Vol. 57. – №1. – P. 1-12.

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

156. 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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461929>

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

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

159. Lahlali, R.L. 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, L. McGregor, F.Q. Yu, R.K. Hynes, S.F. Hwang, M.R. McDonald, S.M. Boyetchko // Phytopathology. – 2013. – № 103(3). – P. 245-254.

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

161. Lee, S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli* / S.Y. Lee // Trends Biotechnol. – 1996. – V. 14. – № 1. – P. 98-105.

162. Lengai, G.M.W. Biopesticides and Their role in sustainable agricultural production / G.M.W. Lengai, J.W. Muthomi // Journal of Biosciences and Medicines. – 2018. – № 6. – P. 7-41. <https://doi.org/10.4236/jbm.2018.66002>

163. 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.

164. Leng, P. Applications and development trends in biopesticides / P. Leng, Z. Zhang, P. Guangtang, M. Zhao // African Journal of Biotechnology. – 2011. – V. 10(86). – P. 19864-19873.

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

166. Mandelli, F. 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 // Brazilian Journal of Microbiology. – 2012. – Vol. 43. – P. 126-134.

167. 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.

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

169. Medeot, D. B. 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, F. Alvarez, M. L. Flores-Cáceres, E. Jofré // Biological control. – 2017. – V. 115. – P. 119-128.

<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.10.002>

170. Meena, K. R. 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, S. S. Kanwar // Journal of King Saud University-Science. – 2020. – V. 32(1). – P. 337-348. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.025>

171. Mishra, J. Biopesticides: Where We Stand? // N.K. Arora (ed.), Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets, 2015. – P. 37-75.

172. Moghannem, S. A. Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design / S. A. Moghannem, M. Farag, A. M. Shehab, M. S. Azab // Brazilian Journal of Microbiology. – 2018. – V. 49. – P. 452-462. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.012>

173. 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.

174. Moita, C. Optimisation of physical factors on the production of active metabolites by *Bacillus subtilis* 355 against wood surface contaminant fungi / C. Moita, S.S. Feio, L. Nunes, M.J.M. Curto, J.C. Roseiro // International Biodeterioration and Biodegradation. – 2005. – № 55. – P. 261-269.

175. 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.

176. Mousivand, M. Characterization and antagonistic potential of Some native biofilm – forming and surfactant – producing *Bacillus subtilis* strains against six pathotypes of *Rhizoctinia solani* / M. Mousivand, G.S. Jouzani, M. Monazah, M. Kowsari // Journal of Plant Pathology. – 2012. – №94 (1). – P.171-180.

177. Ndolo, D. Research and development of biopesticides: challenges and prospects / D. Ndolo, E. Njuguna, C. O. Adetunji, C. Harbor, A. Rowe, A. Den Breeyen, J. Sangeetha, G. Singh, B. Szewczyk, T. S. Anjorin, D. Thangadurai, R. Hospet // *Outlooks on Pest Management*. – 2019. – T. 30. – №. 6. – C. 267-276. https://doi.org/10.1564/v30_dec_08

178. Nihorimbere, V. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health / V. Nihorimbere, M. Ongena, M. Smargiassi, P. Thonart // *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*. – 2011. – № 15. – P. 327–337.

179. 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. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6162>

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

181. Palazzini, J.M. Potential biocontrol agents for *Fusarium* Head Blight and deoxynivalenol production in wheat / J.M. Palazzini, M.L. Ramirez, A.M. Torres, S.N. Chulze // *Crop Protection*. – 2011. – № 26. – P. 1702-1710.

182. Pant, G. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis* / G. Pant, A. Prakash, J. V. P. Pavani, S. Bera, G. V. N. S. Deviram, A. Kumar, M. Panchpuri, R. G. Prasuna // *Journal of Taibah University for Science*. – 2015. – № 9(1). – P. 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.010>

183. Parthipan, P. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1 / P. Parthipan, E. Preetham, L. L. Machuca, P. K. S. M. Rahman, K. Murugan, A. Rajasekar // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 193.

184. 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>

185. Perez-Garcia, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture / A. Perez-Garcia, D. Romero, A. de Vicente // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2011. – № 22. – P. 187-193.

186. Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management /Edited by M. Stoytcheva. InTech. – 2011. – 520 p.

187. Płaza, G.A. Antifungal and antibacterial properties of surfactin isolated from *Bacillus subtilis* growing on molasses / G.A. Płaza, A. Turek, E. Król, R. Szczygłowska // *African Journal of Microbiology Research*. – 2013. – V. 7(25). – P. 3165-3170.

188. 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. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.02.011>

189. Punja, Z. K. Efficacy of *Bacillus subtilis* strain QST 713 (Rhapsody) against four major diseases of greenhouse cucumbers / Z. K. Punja, A. Tirajoh, D. Collyer, L. Ni // *Crop Protection*. – 2019. – №. 124. – P. 104845. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104845>

190. Quimby, P.C. Jr. Enhancing biological control through superior formulations: a worthy goal but still a work in progress / P.C. Jr. Quimby, G. Mercadier, W. Meikle // *Enhancing biocontrol agents and handling risks*. Amsterdam: IOS Press. – 2001. – P. 86-95.

191. Ravi, A. 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, S. A. Salim, N. K. Khalid, C. T. Aravindakumar, R. E. Krishnankutty // *Pest*

Management Science. – 2021. – V. 77(2). – P. 1035-1041.
<https://doi.org/10.1002/ps.6118>

192. 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.

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

194. Sabarwalab, A. Hazardous effects of chemical pesticides on human health–Cancer and other associated disorders / A. Sabarwalab, K. Kumara, R.P. Singh // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2018. – V. 63. – P. 103-114. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018>

195. 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.

196. Shafi, J. 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, L. Xiuwei, G. Zumin, L. Xinghai, Z. Yang, Q. Peiwen, T. Hongzhe, C. Wunan, W. Kai // Archives of Biological Sciences. – 2017. – Vol. 69. – №. 3. – P. 469-480.
<https://doi.org/10.2298/ABS160421122S>

197. Shafi, J. 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, Z. Gu, W. Ahmad // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2018. – Vol. 32. – № 1. – P. 58-68, DOI: 10.1080/13102818.2017.1379359

198. 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.

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

200. 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. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-67>

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

202. 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.

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

204. The Handbook of Microbial Bioresources (eds V.K Gupta et al.), V. K. Gupta, G. D. Sharma, M. G. Tuohy, R. Gaur. Publisher: CAB International – 2015. – 656 p.

205. Thomson, M. Environmental Friendly Bio-pesticides: A Review / M. Thomson, A. Vijan // Research and Reviews Journal of Agriculture and Allied Sciences. – 2016. – Vol. 5. – № 2. – P. 31-39.

206. Toral, L. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea* / L. Toral, M. Rodríguez, V. Béjar, I. Sampedro // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – № 9. – P. 1315. doi: 10.3389/fmicb.2018.01315
207. Trejo, M. The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study / M. Trejo, L. Serrano-Carreón, M. Patiño, R. Allende, C. Jurado, E. Rayo, M. A. Wong, E. Galindo, K. Balderas, D. Isauro, C. R. Gutiérrez // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2013. – Vol. 16. – №3. – P. 1-23.
208. Tsitsigiannis, D.I. Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops / D.I. Tsitsigiannis, M. Dimakopoulou, P.P. Antoniou, E.C. Tjamos // *Phytopathologia Mediterranea*. – 2012. – Vol. 51. – №1. – P. 158-174.
209. 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.
210. 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. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0384-RE>
211. Vejan, P. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability [электронный ресурс] / P. Vejan, R. Abdullah, T. Khadiran, S. Ismail, B.A. Nasrulhaq // *Review. Molecules*. – 2016. – № 21(5):573. – 17 p. Режим доступа <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/573/pdf>
212. Villa-Rodríguez, E. *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, J. López-Cervantes, S. Santos-Villalobos // *Biological Control*. – 2019. – V. 132. – P. 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.012>.

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

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

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

216. 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.

217. Xu, Y. Enhanced production of iturin A in *Bacillus amyloliquefaciens* by genetic engineering and medium optimization / Y. Xu, D. Cai, H. Zhang, L. Gao, Y. ang, J. Gao, Y. Yanga, J. Gaoe, Y. Lib, C. Yangb, Z. Jid, J. Yub, S. Chen // *Process Biochemistry*. – 2020. – №. 90. – P. 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.017>

218. Xu, Z. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation / Z. Xu, J. Shao, B. Li, X. Yan, Q. Shen, R. Zhang // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – V. 79(3) – P.808-815.

219. Yue, H. Optimization of iturin A production from *Bacillus subtilis* ZK-H2 in submerge fermentation by response surface methodology / H. Yue, J. Zhong, Z. Li, J. Zhou, J. Yang, H. Wei, D. Shu, D. Luo, H. Tan //

Biotechnology. – 2021. – № 11. – P. 36 <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02540-7>

220. 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.

221. 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.

222. Zhang, N. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization of *Bacillus subtilis* N11 / N. Zhang, K. Wu, X. He, S. Li, Z. Zhang, B. Shen, X. Yang, R. Zhang, Q. Huang, Q. Shen // Plant Soil. – 2011. – V. 344 – P. 97.

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

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

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

226. Zhong, J. Optimization of *Bacillus subtilis* cell growth effecting jiean-peptide production in fed batch fermentation using central composite design / J. Zhong, X. Zhang, Y. Ren, J. Yang, H. Tan, J. Zhou // Electronic Journal of Biotechnology. – 2014. – № 17. – P. 132-136.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

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

Показатели	2012 г.			2013 г.			2014 г.			2015 г.		
	среднее значение за год	мини- мальное значе- ние /дата	макси- мальное значе- ние /дата	среднее значе- ние за год	мини- мальное значе- ние /дата	макси- мальное значе- ние /дата	среднее значе- ние за год	мини- мальное значе- ние /дата	макси- мальное значе- ние /дата	среднее значе- ние за год	мини- мальное значе- ние /дата	макси- мальное значе- ние /дата
Темпера- тура воз- духа, °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)
Относи- тельная влаж- ность воз- духа, %	66	13 (04.05.2 012)	-	67	14 (08 и 15.03)	-	66	13 (03 - 04.08)	-	64	10 (10.08)	-
Количе- ство осад- ков, мм/ количе- ство дней с осад- ками	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	темпера-тура 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

Источник питания	Титр ЖК, КОЕ/мл	
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g	<i>B. subtilis</i> BZR 517
глюкоза	(1,4±0,08) x 10 ^{6 a}	(1,5±0,07) x 10 ^{6 a}
сахароза	(2,7±0,13) x 10 ^{6 b}	(2,7±0,07) x 10 ^{5 b}
меласса	(4,0±0,14) x 10 ^{7 c}	(1,3±0,09) x 10 ^{7 c}
глицерин	(1,8±0,6) x 10 ^{6 a}	(8,7±0,4) x 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

Источник питания	Ингибирование патогена, %, сутки							
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g				<i>B. subtilis</i> BZR 517			
	1	2	3	4	1	2	3	4
глюкоза	5,07 ^{bc}	5,00 ^{ab}	6,56 ^a	7,99 ^a	3,26 ^a	5,10 ^{ab}	7,12 ^b	4,55 ^c
сахароза	8,70 ^{ab}	4,11 ^a	4,02 ^b	6,71 ^b	7,25 ^b	6,43 ^a	6,39 ^c	7,99 ^a
меласса	9,78 ^a	6,90 ^b	7,60 ^a	7,58 ^a	8,70 ^b	7,14 ^c	8,81 ^a	6,61 ^{ab}
глицерин	4,71 ^c	2,62 ^c	4,32 ^b	5,51 ^b	3,99 ^a	3,33 ^b	4,84 ^d	6,47 ^b
Примечание: между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности								

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		

Источник питания	Ингибирование патогена, %, сутки							
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g				<i>B. subtilis</i> BZR 517			
	1	2	3	4	1	2	3	4
пептон	3,03 ^a	6,86 ^a	3,17 ^a	2,50 ^a	17,42 ^c	19,12 ^b	19,05 ^c	18,41 ^c
NaNO ₃	2,65 ^a	6,86 ^a	5,11 ^b	2,61 ^a	5,68 ^a	8,82 ^a	4,23 ^a	1,30 ^a
дрожжевой экстракт	7,20 ^b	6,62 ^a	5,36 ^b	3,32 ^a	11,36 ^b	8,82 ^a	10,05 ^b	8,41 ^b
кукурузный экстракт	8,33 ^b	8,82 ^a	5,71 ^b	1,39 ^a	5,30 ^a	6,86 ^a	6,75 ^a	2,83 ^a
Примечание: между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности								

Температура, °C	Титр ЖК, КОЕ/мл	
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g	<i>B. subtilis</i> BZR 517
20,0	$(1,7 \pm 0,07) \times 10^9$ ^a	$(6,6 \pm 0,3) \times 10^6$ ^b
25,0	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^9$ ^a	$(2,1 \pm 0,09) \times 10^8$ ^a
30,0	$(1,6 \pm 0,03) \times 10^8$ ^b	$(8,9 \pm 0,4) \times 10^8$ ^c
35,0	$(5,7 \pm 0,07) \times 10^8$ ^c	$(1,8 \pm 0,26) \times 10^8$ ^a
Примечание: между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности		

[illegible]

рН	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

рН	Ингибирование патогена, %, сутки							
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g				<i>B. subtilis</i> BZR 517			
	1	2	3	4	1	2	3	4
3,0	0,36 ^a	0,0 ^b	0,0 ^a	0,0 ^a	1,11 ^a	0,0 ^a	1,46 ^c	0,0 ^a
6,0	2,90 ^a	1,94 ^c	4,90 ^b	0,28 ^a	33,70 ^d	40,10 ^d	47,54 ^b	41,90 ^d
8,0	23,19 ^b	17,14 ^a	22,57 ^d	22,44 ^c	26,67 ^c	33,08 ^c	41,80 ^{ab}	34,11 ^c
10,0	19,20 ^b	16,11 ^a	19,82 ^c	16,21 ^b	20,74 ^b	23,31 ^b	28,78 ^a	20,25 ^b
Примечание: между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности								

Время культивирования, ч	Титр ЖК, КОЕ/мл	
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g	<i>B. subtilis</i> BZR 517
8	$(6,5 \pm 0,1) \times 10^8$ ^c	$(4,7 \pm 0,09) \times 10^8$ ^c
16	$(8,3 \pm 0,2) \times 10^8$ ^d	$(9,4 \pm 0,15) \times 10^8$ ^d
24	$(1,8 \pm 0,07) \times 10^9$ ^a	$(1,4 \pm 0,01) \times 10^9$ ^f
36	$(2,4 \pm 0,24) \times 10^9$ ^e	$(1,2 \pm 0,06) \times 10^9$ ^e
48	$(1,8 \pm 0,01) \times 10^9$ ^a	$(4,0 \pm 0,23) \times 10^8$ ^b
72	$(1,7 \pm 0,01) \times 10^7$ ^b	$(1,1 \pm 0,01) \times 10^8$ ^a

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

Время культиви- рования, ч	Ингибирование патогена, %, сутки							
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g				<i>B. subtilis</i> BZR 517			
	1	2	3	4	1	2	3	4
8	8,6 ^a	9,7 ^d	10,7 ^c	10,4 ^c	15,4 ^{bd}	10,6 ^{ab}	13,1 ^a	12,0 ^c
16	19,9 ^d	17,8 ^c	17,8 ^{ab}	18,8 ^b	8,9 ^{ac}	21,3 ^c	20,1 ^b	20,7 ^f
24	12,0 ^{ab}	12,8 ^a	14,9 ^{ad}	15,9 ^a	12,1 ^{ab}	13,5 ^b	16,6 ^d	17,0 ^e
36	16,4 ^{cd}	15,5 ^{abc}	18,6 ^d	15,4 ^a	18,7 ^d	18,5 ^c	20,4 ^b	15,2 ^d
48	15,1 ^{bc}	16,7 ^{bc}	17,3 ^{ab}	15,8 ^a	12,4 ^{ab}	8,7 ^a	10,9 ^a	10,0 ^b
72	12,2 ^{ab}	14,2 ^{ab}	12,7 ^{cd}	17,2 ^{ab}	7,3 ^c	3,2 ^d	4,1 ^c	3,6 ^a
Примечание: между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности								

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. Асатунова

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. Асатурова

личная подпись

Младший научный сотрудник

А.И. Хомяк

личная подпись

Краснодар 2015



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ
(ГНУ ВНИИСХМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин, 8
шоссе Подбельского, 3
Телефон 8-812-470-51-00; Факс 470-43-62
E-mail: arriam@arriam.spb.ru

Выдано в ГНУ ВНИИБЗР
Россельхозакадемии

5 декабря 2012 № 629/12

СПРАВКА

о депонировании культуры микроорганизмов в Ведомственной
коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного
назначения Россельхозакадемии (RCAM).

1. Депозитеры: Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИБЗР Россельхозакадемии), 350039, г. Краснодар, п/о 39 ВНИИБЗР.
2. Авторы: Асатунова А.М., Дубяга В.М.
3. Штамм *Bacillus subtilis* BZR 336g является антагонистом фитопатогенов *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *Microdochium nivale* (anamorph: *Fusarium nivale*) и *Pyrenophora tritici-repentis*. Штамм перспективен для производства биопрепарата для защиты сельскохозяйственных культур от грибных болезней.
4. Штамм *Bacillus subtilis* BZR 336g депонирован 5 декабря 2012 г. под регистрационным номером RCAM01729.
5. Адрес коллекции: 196608, Санкт - Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии; тел. (812) 476-28-02, факс (812) 470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru. Информация о штамме доступна на сайте <http://www.arriam.spb.ru/>

Директор ГНУ ВНИИСХМ,
академик Россельхозакадемии

Заведующая RCAM, к.б.н.



И.А. Тихонович

В.И. Сафронова



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ
(ГНУ ВНИИСХМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин, 8
шоссе Подбельского, 3
Телефон 8-812-470-51-00; Факс 470-43-62
E-mail: arriam@arriam.spb.ru

Выдано в ГНУ ВНИИБЗР
Россельхозакадемии

5 декабря 2012 № 639/12

СПРАВКА

о депонировании культуры микроорганизмов в Ведомственной
коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного
назначения Россельхозакадемии (RCAM).

1. Депозиторы: Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИБЗР Россельхозакадемии), 350039, г. Краснодар, п/о 39 ВНИИБЗР.
2. Авторы: Асатурова А.М., Дубяга В.М.
3. Штамм *Bacillus subtilis* BZR 517 является антагонистом фитопатогенов *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *Microdochium nivale* (anamorph: *Fusarium nivale*) и *Pyrenophora tritici-repentis*. Штамм перспективен для производства биопрепарата для защиты сельскохозяйственных культур от грибных болезней.
4. Штамм *Bacillus subtilis* BZR 517 депонирован 5 декабря 2012 г. под регистрационным номером RCAM01728.
5. Адрес коллекции: 196608, Санкт - Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии; тел. (812) 476-28-02, факс (812) 470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru. Информация о штамме доступна на сайте <http://www.arriam.spb.ru/>

Директор ГНУ ВНИИСХМ,
академик Россельхозакадемии

Заведующая RCAM, к.б.н.



И.А. Тихонович

В.И. Сафронова



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2552146

**ШТАММ БАКТЕРИЙ *Bacillus subtilis* BZR 517 ДЛЯ
ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА ПРОТИВ
ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ**

Патентообладатель(и): *Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский институт
биологической защиты растений Российской академии
сельскохозяйственных наук (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2013151375

Приоритет изобретения 20 ноября 2013 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации 29 апреля 2015 г.

Срок действия патента истекает 20 ноября 2033 г.



*Врио руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Л.А. Кирий

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
(SFBS "RCT&HRB of FMBA of RUSSIA")

142253 РОССИЯ Московская область Серпуховский р-н, об. Давыдова ул. Пенна 102А
тел./факс (4967)399738 код из Москвы -27 E-mail: toxic@online.stock.net

102А, Lenin str., Serpukhov, Moscow, Region 142 253, 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 10^5 , 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 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 336g оценивали путем внутрибрюшинного введения мышам взвеси агаровой культуры микроорганизмов, приготовленной на стерильном физиологическом растворе и инактивированной нагреванием при 70° С в течение 30 минут, в концентрациях 10^8 и 10^9 микробных клеток на животное (по 6 особей на дозу). В течение срока наблюдения -15 суток - гибели мышей не было. Таким образом, компоненты бактериальной клетки испытуемого штамма не являются токсичными для лабораторных животных.

Токсигенность штамма *Bacillus subtilis* BZR 336g изучали на мышах при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении стерильного фильтрата культуральной жидкости 3-х и 7-и суточных культур. Фильтрат 3-х суточной культуры вводили по 1,0; 1,6 и 2,0 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 о/с: Давыдовка ул. Ленина 102А
тел./факс (4967)399738 код из Москвы -27 E-mail: toxic@online.stock.net

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

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

Н.Р.Дядищев

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

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

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

Для изучения **диссеминации** через 30 суток после введения культуры штамма *Bacillus subtilis* BZR 517 делали посев методом отпечатков из внутренних органов белых мышей (сердца, легких, печени, почек и селезенки) на чашки Петри с агаризованной средой. Рост культуры *Bacillus subtilis* BZR 517 в 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

А.В.Воробьев

17.05.2013

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2621356

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

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

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2015151901

Приоритет изобретения 03 декабря 2015 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 02 июня 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 03 декабря 2035 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ильев

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 336g в
препаративной форме жидкая культура

Разработчики:

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

 А.М. Асатунова

Младший научный сотрудник

 А.И. Хомяк

Краснодар 2015

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



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

В.Д. 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