

На правах рукописи

МАЛКОВА АНГЕЛИНА ВЛАДИМИРОВНА

**РАЗРАБОТКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА
НА ОСНОВЕ НОВЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* И ОЦЕНКА
ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТИ**

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2023

Работа выполнена в лаборатории Инжинирингового центра «Промбиотех» и на кафедре экологии, биохимии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Барнаул, Алтайский край

Научный руководитель:

Ирkitова Алена Николаевна, кандидат биологических наук (1.5.11. Микробиология), доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра экологии, биохимии и биотехнологии, доцент кафедры.

Официальные оппоненты:

Манучарова Наталия Александровна, доктор биологических наук (1.5.11. Микробиология), Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», кафедра биологии почв Факультета почвоведения, профессор кафедры, г. Москва;

Асатурова Анжела Михайловна, кандидат биологических наук (4.1.3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологической защиты растений» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, директор, г. Краснодар.

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Казань

Защита состоится «16» февраля 2024 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования.

Микробные биопрепараты нашли широкое применение в различных областях народного хозяйства – медицине, сельском хозяйстве и пр. (Муродова, Давранов, 2014; Коломиец, 2018; Гуревич и др., 2019; Дятлов, 2021). В соответствии с ключевыми направлениями развития биотехнологий и импортозамещения в Российской Федерации, принятыми на государственном уровне (Указ Президента РФ № 642, ФЗ № 280, ФЗ № 175), разработка и внедрение новых биопрепаратов для растениеводства относится к приоритетным направлениям научно-технологического развития России. Широкое применение микробных препаратов может поспособствовать переходу к высокопродуктивному и экологически безопасному сельскому хозяйству.

При создании микробиологических препаратов для растениеводства в основном используются ризосферные бактерии, обладающие антагонистическим эффектом по отношению к фитопатогенам, оказывающие положительное влияние на растения и повышающие их продуктивность. Эти микроорганизмы принято называть PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). К ним относятся представители родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и др. Особый интерес вызывают бациллы из-за своей высокой биологической активности, а также способности к спорообразованию, повышающей их устойчивость к неблагоприятным факторам среды, в том числе при производстве биопрепаратов на их основе и при хранении (Алексеева, Потатуркина-Нестерова, 2014; Basu et al., 2021; Vocciante et al., 2022).

Первые биопрепараты для растений выпустили на основе бактерий рода *Bacillus*. Так, в состав микробного удобрения «Alinit» (Германия, 1897 г.) входил штамм *B. ellenbachensis*. А в состав первого биоинсектицида «Sporine» (Франция, 1938 г.) включен штамм *B. thuringiensis*. Один из первых советских биопрепаратов на основе бацилл – «Энтобактерин», содержащий штамм *B. thuringiensis* subsp. *galleriae*. С тех пор линейка биоинсектицидов широко представлена на мировом и отечественном рынках (Штерншис и др., 2004; Radhakrishnan et al., 2017; Долженко, 2021).

Биофунгициды стали выпускаться значительно позже, чем инсектициды, и сейчас их доля на общем рынке фунгицидов составляет 1–5 %. В бактериальных фунгицидах в качестве действующего компонента чаще всего выступают бактерии вида *B. subtilis*. В «Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов (2022)» также представлены препараты с антигрибной активностью на основе *B. amyloliquefaciens*. Однако другие виды бацилл, как и поликомпонентные биопрепараты встречаются реже. При этом имеются исследования, выявляющие преимущества полиштаммовых препаратов над моноштаммовыми и свидетельствующие о высокой

эффективности в растениеводстве других видов бацилл, в частности *B. pumilus* (Kumar et al., 2011; Win et al. 2021; Долженко, Лаптиев, 2021; Lahlali et al., 2022).

В связи с вышеперечисленным, выделение и изучение свойств новых штаммов бацилл и разработка поликомпонентных микробных биопрепаратов на их основе является актуальным направлением для исследований. Это важно в связи с постоянной необходимостью ротации штаммов в составе действующих препаратов из-за возникающих устойчивостей со стороны тест-культур, а также возможности утраты жизнеспособности или эффективности у микроорганизмов.

Цель исследования: разработать прототип биологического препарата для растениеводства на основе новых штаммов бактерий рода *Bacillus* и оценить его эффективность.

Задачи исследования:

1. Выделить из ризосферы растений, произрастающих на территории Алтайского края, штаммы бактерий рода *Bacillus*, перспективные для включения в состав биологических препаратов для сельского хозяйства.

2. Охарактеризовать экологические, морфолого-культуральные, физиологические и биохимические свойства новых штаммов рода *Bacillus*, а также установить их биосовместимость и антагонистическую активность по отношению к фитопатогенным грибам при тестировании *in vitro*.

3. Получить прототип бактериального препарата для предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур на основе консорциума из 3 биосовместимых штаммов *Bacillus* spp., обладающих антимикотическими свойствами.

4. Установить спектр антагонистического действия опытного образца полиштаммового биопрепарата, а также его биологическую эффективность при инокуляции семян культурных растений в лабораторных и полевых исследованиях.

5. Определить расчетную экономическую эффективность применения разработанного прототипа бациллярного биопрепарата при протравливании семян перед посевом *in vivo*.

Научная новизна исследования.

Выделено и охарактеризовано 9 новых штаммов бактерий *Bacillus* spp. из ризосферы растений Алтайского края, для 4-х из них научно-практическая значимость подтверждена патентами РФ (Пат. 2693439, Пат. 2694522, Пат. 2797825, Пат.2797699). Впервые создан опытный образец биопрепарата на основе консорциума из 3-х депонированных штаммов *Bacillus pumilus* (RCAM05516, ВКПМ В-13250, RCAM05517) для защиты и стимуляции роста сельскохозяйственных растений. Впервые подтверждена антагонистическая активность разработанного прототипа препарата по отношению к различным грибным фитопатогенам. В лабораторных и

полевых условиях установлена стимулирующая активность предложенного опытного образца биопрепарата «Фитопумилин» при выращивании ценных сельскохозяйственных культур – рапса, овса, гречихи и подсолнечника.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Установленные в ходе диссертационного исследования результаты расширяют сложившиеся представления о свойствах и характеристиках ризосферных бацилл, а также об особенностях их взаимодействия с другими микроорганизмами и макроорганизмами. Полученные данные могут быть использованы в качестве рекомендаций сотрудникам сельскохозяйственных предприятий для рационального применения биопрепаратов с целью повышения урожайности и снижения заболеваемости растений.

Отечественные коллекции полезных микроорганизмов (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) и Сетевая биоресурсная коллекция в области генетических технологий для сельского хозяйства (RCAM)) пополнены 5 новыми культурами бактерий рода *Bacillus* (*B. toyonensis* ВКПМ В-13249, *B. pumilus* ВКПМ В-13250, *B. pumilus* RCAM05516, *B. pumilus* RCAM05517, *B. toyjavensis* RCAM05965), что имеет значение как для фундаментальных, так и прикладных исследований в области микробиологии и создания биопрепаратов для сельского хозяйства – Федеральный уровень внедрения.

Разработанный в рамках диссертационной работы прототип бактериального препарата для защиты и стимуляции роста растений прошел 2 года полевых испытаний на опытном поле Федерального Алтайского научного центра агроботехнологий и в хозяйстве «АгроУспех» (Алтайский край) (приложение А). Получены положительные результаты по воздействию опытного образца биопрепарата на биологическую урожайность таких культур, как рапс, гречиха и подсолнечник. На производство опытных партий препарата также сформированы первичные технические условия (ТУ 20.15.80-002-02067818-2022, введено впервые 23.09.2022г.) – Федеральный уровень внедрения; технологическая инструкция (ТИ, приказ ректора от 31.10.2022г. №1551/п) – Учрежденческий уровень внедрения; зарегистрирован каталожный лист продукции (№ 080.007967) с присвоением опытному образцу препарата наименования «Фитопумилин» – Федеральный уровень внедрения.

Материалы диссертационного исследования использованы в ходе научных практик, а также на лабораторных занятиях студентов Алтайского государственного университета по таким дисциплинам, как «Микробиология и вирусология», «Пищевая микробиология», «Санитарная микробиология», «Пищевая биотехнология» (приложение А) – Учрежденческий уровень внедрения.

Методология и методы исследования.

При подготовке диссертационной работы использовали как общие, так и специальные методы научного познания. Из теоретических методов в основном применяли анализ и классификации, а из эмпирических – эксперимент и сравнение. Среди специальных методов преимущественно использовали классические и современные методы микробиологических и биотехнологических исследований. Полученные результаты подтверждены методами статистической обработки.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Из ризосферы растений Алтайского края выделено и описано 9 новых штаммов споровых бактерий *Bacillus* spp., три из которых (*Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250, *Bacillus pumilus* RCAM05516, *Bacillus pumilus* RCAM05517) перспективны для разработки поликомпонентного биопрепарата для сельского хозяйства на основании их биосовместимости и антагонистической активности по отношению к микромицетам *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria* sp. и *Phytophthora infestans*.

2. Разработана технология полупромышленного производства опытных партий биопрепарата для растениеводства на основе микробного консорциума из трех ризосферных штаммов *Bacillus pumilus* в виде лиофилизированного порошка с сохранением численности жизнеспособных клеток не менее 1×10^{11} колониеобразующих единиц на грамм при хранении в течение 2-х лет.

3. Прототип биопрепарата на основе композиции из трех природных штаммов *Bacillus pumilus* обладает широким спектром антагонистической активности против фитопатогенных грибов (*Phytophthora infestans*, *Penicillium* spp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Alternaria solani*, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria brassicae*, *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum*, *Pythium* sp., *Botrytis* sp.), совместимостью с рядом коммерческих биологических и химических пестицидов («Триходерма вериде», «Алирин-Б», «Лепидоцид», «Круйзер», «Престиж», «Инстиво» и «Винцит») для протравливания семян, а также стимулирующей активностью в отношении культурных растений, установленной в лабораторных и полевых условиях.

Апробация работы.

Работа выполнена на базе Инжинирингового центра «Промбиотех» и кафедре экологии, биохимии и биотехнологии Алтайского государственного университета в 2017–2023 гг. (Научно-исследовательская, опытно-конструкторская и технологическая работа № 122111600022-8 в Единой государственной информационной системе учета). Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечена использованием в работе современных методов микробиологии, а также достаточным количеством полученных данных.

Материалы диссертации апробировали на 9 научных конференциях: XVI Международная научно-практическая конференция «Пища. Экология. Качество» (24–

26 июня 2019 г., Барнаул); VII Региональная молодежная конференция «Мой выбор – НАУКА!» (20–24 апреля 2020 г., Барнаул); BIO Web of Conferences «International Scientific and Practical Conference “Fundamental Scientific Research and Their Applied Aspects in Biotechnology and Agriculture» (FSRAABA 2021) (19–21 июля 2021 г., Тюмень); IV Межрегиональная научно-практическая конференция (с международным участием) «От биопродуктов к биоэкономике» (23–26 сентября 2021 г., Барнаул); Всероссийская конференция с международным участием «Экотоксикология – 2021» (7–8 октября 2021 г., Тула); Международная научная конференция «Агробиотехнология – 2021» (24–25 ноября 2021 г., Москва); X Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (12–16 сентября 2022 г., Алушта); Международная научно-практическая конференция «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем» (13–15 сентября 2022 г., Краснодар); VIII Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» и Школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие» (6–8 декабря 2022 г., Пущино).

Публикации.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 20 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах, 4 патента РФ на штаммы микроорганизмов и 12 работ – в сборниках и материалах конференций и других научных изданиях.

Личное участие автора в получении результатов.

Личный вклад автора в подготовку диссертационной работы заключался в поиске и анализе литературных данных, постановке цели и задач исследования, подборе исследовательских методик, планировании и проведении экспериментов, статистической обработке данных, а также в подготовке материалов для публикаций и их апробации.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 178 страницах, содержит 36 рисунков, 37 таблиц и 4 приложения. Состоит из таких частей, как введение, обзор и анализ литературы, материалы и методы исследования, трех глав результатов исследования, а также выводов и списка использованной литературы, включающего 434 источника, в том числе 179 – на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР И АНАЛИЗ ЛИТЕРАТУРЫ

В главе описали основные свойства бактерий рода *Bacillus* (систематическое положение, морфолого-культуральную характеристику, особенности

взаимоотношений с другими организмами и пр.), а также классификацию и особенности производства микробных биопрепаратов, в том числе на основе бацилл (краткий исторический очерк и перечень биопестицидов, разрешенных для применения на территории Российской Федерации). Помимо этого, привели сведения о болезнях растений и некоторых фитопатогенных микроорганизмах. Также осветили основные мероприятия, реализуемые для защиты и стимуляции роста растений в современном сельском хозяйстве.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве **объектов исследования** отобрали 9 штаммов бактерий рода *Bacillus* из коллекции ИЦ «Промбиотех» (АлтГУ). В качестве тест-культур для определения антагонизма или биосовместимости отобранных культур и прототипа биопрепарата на их основе использовали следующие штаммы: *Phytophthora infestans*, *Alternaria sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium solani*, *Pythium sp.*, *A. niger*, *A. solani*, *F. graminearum*, *A. tenuissima*, *Penicillium sp. 1*, *F. sporotrichioides*, *Botrytis sp.*, *Penicillium sp. 2*, *A. brassicae*, *B. subtilis* В-10 («Алирин-Б»), *B. subtilis* 26Д («Фитоспорин М»), *B. subtilis* Ч-13 («Экстрасол»), *B. thuringiensis var. kurstaki* («Лепидоцид»), *Metarhizium anisopliae* («Метаризин»), *Trichoderma viride* 471 («Триходерма вериде»), *T. harzianum* Г 30 ВИЗР («Трихоцин»), *T. harzianum* 18 ВИЗР («Глиокладин»).

Для прототипа биопрепарата определили возможность совместного использования с пестицидами («Престиж», «Инстиво», «Баритон», «Винцит» и «Максим»). Эффективность опытного образца препарата при проращивании растений установили с семенами, полученными из ФГБНУ «ФАНЦА». В работе задействовали следующие культуры: рапс (сорт «АНИИСХ 4», протравленный инсектицидом «Круйзер»), овес (сорт «Корифей»), гречиха (сорт «Дизайн») и подсолнечник (сорт «Кулундинский 1»).

Ключевые методы исследования. Для первичной идентификации объектов исследования использовали определитель Берджи (Vos et al., 2009) и тест-систему Microgen BACILLUS-ID. Отобранные штаммы бацилл в РСАМ идентифицировали до вида с использованием тест-системы The Biolog Gen III Microplate. Генетическую идентификацию некоторых объектов исследования произвели с помощью анализа генов 16S РНК и ПЦР анализа в ВКПМ.

Установление типа взаимоотношений бактерий рода *Bacillus* и прототипа биопрепарата на основе отобранных штаммов с другими микроорганизмами осуществили с использованием методов перпендикулярных и параллельных штрихов, лунок, блоков и колодцев (Ирkitова, Каган, 2012; Чеботарь и др., 2015). Для получения готовой формы прототипа биопрепарата провели ферментации отобранных штаммов бацилл в 15 л биореакторе с последующей лиофилизацией биомассы спор и клеток.

Эффективность нового опытного образца препарата при проращивании семян в лабораторных условиях установили с помощью методов влажных камер (рапс, гречиха, подсолнечник) и рулонов (овес) (ГОСТ 12038-84, ГОСТ 12044-93). Полевые испытания прототипа биопрепарата в посевах рапса, овса и гречихи в 2021–2022 гг. провели на опытном поле ФГБНУ «ФАНЦА» вблизи города Барнаул, а подсолнечника – в Первомайском районе Алтайского края в хозяйстве «АгроУспех» методом делянок (Литвинов, 2011).

Математическую обработку полученных результатов произвели в программе Microsoft Excel – 2020. Для оценки целесообразности применения опытного образца биопрепарата в растениеводстве установили расчетные экономический эффект и ресурсоотдачу (экономическую эффективность) по биологической урожайности каждой из исследуемых сельскохозяйственных культур.

ГЛАВА 3. ПРИРОДНЫЕ БАКТЕРИИ РОДА *BACILLUS*

Из 108 образцов растений (107 образцов ризосферы и 1 филлосферы) для дальнейших исследований по морфолого-культуральным и тинкториальным свойствам, а также по способности к спорообразованию, отсутствию роста в анаэробных условиях, положительной реакции на каталазу и отрицательной на лецитиназу отобрали 9 штаммов бацилл. В результате первичной биохимической идентификации данных штаммов с помощью тест-системы Microgen Bacillus-ID 5 из них определили как вид *B. pumilus*, 3 штамма – как *B. licheniformis* и 1 штамм – как *B. lentus* (таблица 1), однако программное обеспечение признало его слабо идентифицируемым (Дудник и др., 2019). В дальнейшем штамм *B. lentus* 15 с помощью генетической идентификации по 16S рРНК и с использованием специфических праймеров VTf и VTг переидентифицировали как *B. toyonensis* (Пат. 2693439), а для *B. pumilus* 16 после идентификации по 16S рРНК и с использованием специфических праймеров Pum-f и Pum-g подтвердили верность определения принадлежности к данному виду с помощью Microgen Bacillus-ID (Пат. 2694522).

Таблица 1 – Видовая принадлежность природных штаммов *Bacillus* spp., установленная с помощью Microgen Bacillus-ID

№ образца растений	Установленный вид бактерий	Вероятность верной идентификации, %	№ штамма в коллекции ИЦ «Промбиотех»
4	<i>B. pumilus</i>	64,84	16
5	<i>B. lentus</i>	42,95	15
28	<i>B. pumilus</i>	94,61	4
29	<i>B. pumilus</i>	95,08	5
30	<i>B. pumilus</i>	94,61	6
31	<i>B. pumilus</i>	94,61	7
32	<i>B. licheniformis</i>	63,27	8
33	<i>B. licheniformis</i>	89,45	9
108	<i>B. licheniformis</i>	78,64	10

Для всех отобранных штаммов бацилл провели оценку на их биосовместимость с использованием методов перпендикулярных штрихов и лунок. Штамм *B. licheniformis* 8 оказался самым сильным антагонистом по отношению ко всем изучаемым представителям рода *Bacillus*. А для всех штаммов вида *B. pumilus* подтвердили биосовместимость обоими используемыми методами (Малкова и др., 2022).

Антифунгальное действие природных штаммов бацилл против *Alternaria sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.* и *P. infestans* установили с помощью метода агаровых блоков (бактерии засеяли газоном, а микромицеты установили в виде блоков). По результатам исследования все 9 изучаемых штаммов проявили антагонистический эффект против всех исследуемых тест-культур на идентичном уровне. По отношению к *P. infestans* зафиксировали абсолютный антимикотический эффект. Против *Alternaria sp.* оказались наиболее активны штаммы вида *B. licheniformis* и *B. toyonensis* 15. В течение первых суток культивирования в опытных чашках штаммы *Penicillium sp.* и *Aspergillus sp.* продуцировали в среду антибактериальные соединения, в виду чего зафиксировали отсутствие роста штаммов *Bacillus spp.* вокруг блоков с микромицетами. Однако на 3 день эксперимента культуры бактерий рода *Bacillus* распространились в направлении блоков с микроскопическими грибами, тем самым препятствуя их росту. По отношению к плесневым грибам (*Penicillium sp.* и *Aspergillus sp.*) штаммы *B. licheniformis* 9* и *B. licheniformis* 10 (рисунок 1) показали самый слабый угнетающий эффект, а штаммы *B. pumilus* – самый сильный (Малкова и др., 2021).

* *Примечание:* штамм *B. licheniformis* 9 позднее депонировали в RCAM и переидентифицировали как *B. mojavensis* (RCAM05965).

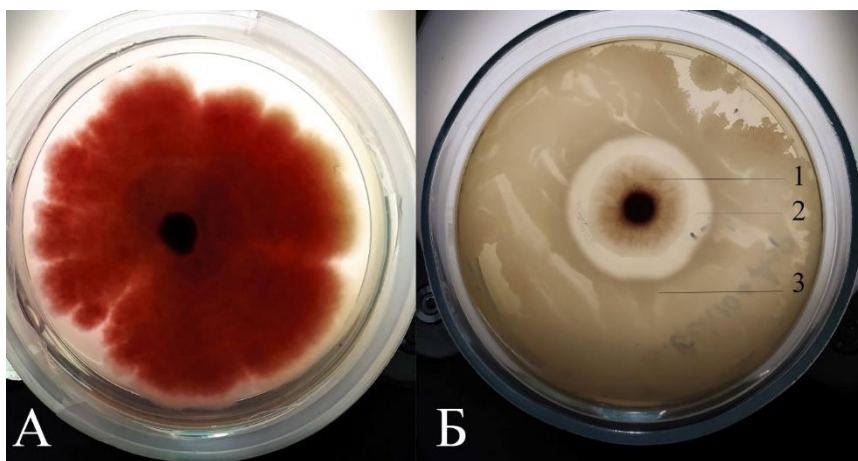


Рисунок 1 – Сравнение роста *Aspergillus sp.* в опыте и контроле на 14 сутки эксперимента: А – контрольная чашка, Б – опытная чашка. 1 – культура *Aspergillus sp.*, 2 – зона подавления роста бацилл, 3 – газон *B. licheniformis* 10

С учетом полученных данных в качестве действующего компонента разрабатываемого прототипа биологического препарата для защиты растений выбрали три штамма: *B. pumilus* 4, *B. pumilus* 7 и *B. pumilus* 16. Данные штаммы отобрали в том числе в виду того, что их выделили из растений тех же семейств, что рапс (семейство *Brassicaceae*, как и икотник – источник штамма *B. pumilus* 4), гречиха (семейство *Polygonaceae*, как и щавель – источник штамма *B. pumilus* 7) и подсолнечник

(семейство *Asteraceae*, как и цикорий – источник штамма *B. pumilus* 16), которые задействовали в следующих экспериментах (рисунок 2).

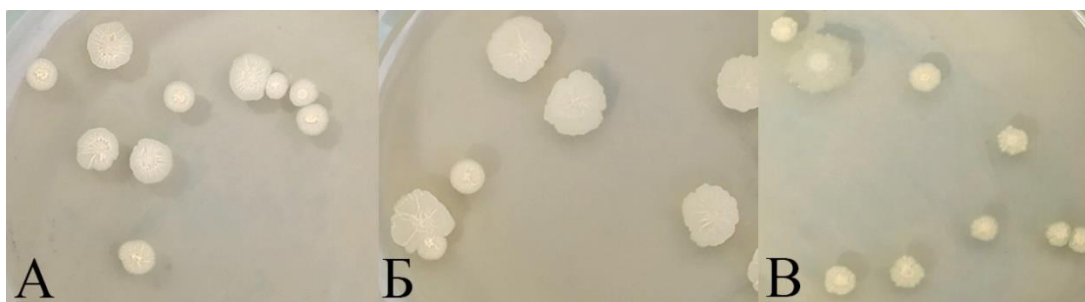


Рисунок 2 – Морфология колоний штаммов *Bacillus* spp., входящих в состав прототипа биопрепарата: А – штамм *B. pumilus* 4, Б – штамм *B. pumilus* 7, В – штамм *B. pumilus* 16

Для отобранных штаммов провели фенотипическую идентификацию с помощью тест-системы The Biolog Gen III Microplate. В результате анализов подтвердили принадлежность всех штаммов к виду *B. pumilus* (для штамма *B. pumilus* 4 вероятность составила 77,5 %, для *B. pumilus* 7 – 89,4 %, а для *B. pumilus* 16 – 95,4 %). Все штаммы из состава опытного образца биопрепарата депонировали в отечественных коллекциях микроорганизмов и запатентовали: *B. pumilus* 16 – в ВКПМ под номером В-13250 (Пат. 2694522), а *B. pumilus* 4 и *B. pumilus* 7 – в РСАМ под номерами РСАМ05516 (Пат. 2797825) и РСАМ05517 (Пат. 2797699) соответственно.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МИКРОБНОГО БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Опытный образец разработанного препарата является поликомпонентным, однако штаммы для его создания прокультивировали отдельно. Первоначально осуществили подбор условий для культивирования посевного материала. В качестве питательных сред рассмотрели L, YEP и питательный бульоны. Для YEP-бульона выявили наименьшую пригодность для культивирования штаммов *B. pumilus* 4 и *B. pumilus* 7, так как титр на нем оказался на порядок ниже (10^8 КОЕ/мл), чем на других бульонах. А для штамма *B. pumilus* 16 на всех питательных средах определили численность не менее 10^9 КОЕ/мл. Также на YEP-бульоне к окончанию культивирования водородный показатель составил меньше 5 у всех штаммов, что неблагоприятно для развития большинства нейтрофильных бацилл. В ходе микроскопии микропрепаратов всех штаммов после роста на питательном бульоне отметили различную морфологию клеток *B. pumilus*, чего не зафиксировали на других средах. Это может ввести в заблуждение в ходе производственного процесса. Поэтому L-бульон отобрали в качестве питательной среды для выращивания посевного материала всех штаммов (Малкова, 2022).

Общая схема получения прототипа микробного биопрепарата для защиты и стимуляции роста растений представлена на рисунке 3. Все штаммы

прокультивировали отдельно в биологическом реакторе объемом 15 л (ООО «Сторге», г. Санкт-Петербург). При этом процесс можно охарактеризовать как глубинный, аэробный, динамический и полупериодический. Ферментации произвели на ферментативной питательной среде в течение 24 ч при 37 °С, со скоростью перемешивания – 250 об/мин.

Этапы 1 – 5 реализуются по каждому штамму отдельно



Рисунок 3 – Схема получения прототипа биопрепарата для растениеводства

В ходе культивирования в биологическом реакторе зафиксировали изменение показателей ферментации отобранных штаммов *Bacillus* spp. (таблица 2). Численность клеток каждого штамма к окончанию процесса достигла 10^{10} КОЕ/мл.

Таблица 2 – Показатели ферментации штаммов *B. pumilus* (M±m)

Показатель	Штаммы	Время культивирования, ч			
		2	4	6	18–24
Оптическая плотность	<i>B. pumilus</i> 4	0,649±0,123	1,401±0,183	1,592±0,370	2,314±0,213
	<i>B. pumilus</i> 7	0,708±0,147	1,294±0,192	1,654±0,302	2,296±0,113
	<i>B. pumilus</i> 16	0,659±0,136	1,184±0,149	1,676±0,256	2,393±0,040
Водородный показатель	<i>B. pumilus</i> 4	6,99±0,18	6,80±0,02	6,99±0,27	7,93±1,00
	<i>B. pumilus</i> 7	7,10±0,28	7,07±0,26	7,47±0,53	8,15±0,88
	<i>B. pumilus</i> 16	6,93±0,03	7,39±0,25	7,70±0,15	8,04±0,21

После центрифугирования культуральной жидкости с ферментера клеточную биомассу смешали с защитной средой, заморозили и лиофилизировали. В среднем с биореактора вышло 113,28 г концентратов каждого из штаммов *B. pumilus*. Готовый опытный образец препарата получили путем смешивания концентратов всех штаммов в соотношении 1:1:1. Титр первой партии составил $1,29 \times 10^{12}$ КОЕ/г при запланированном не менее 1×10^{11} КОЕ/г (Malkova et al., 2021). В ходе хранения пробы прототипа биопрепарата при 4–6 °С и 25 °С в течение 2-х лет титр менее 1×10^{11} КОЕ/г не зафиксировали.

На основе полученных данных сформировали первичные ТУ (ТУ 20.15.80-002-02067818-2022, введено впервые 23.09.2022г.), ТИ (приказ ректора от 31.10.2022г. №1551/п) на производство опытных партий препарата, зарегистрировали каталожный лист продукции (№ 080.007967) на опытный образец препарата «Фитопумилин». Для получения рабочего раствора необходимо 1 г концентрата смешать со 100 мл воды, чего достаточно для обработки 10 кг семян.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗРАБОТАННОГО ОПЫТНОГО ПРЕПАРАТА

Антагонистическую активность разработанного прототипа препарата по отношению к тем же тест-культурам, что и для штаммов по отдельности, установили методами блоков и параллельных штрихов. При использовании первой техники гибель *P. infestans* в опытных чашках произошла на 7-е сутки эксперимента, в то время как штаммам по отдельности на это потребовалось около 2-х недель (Малкова и др., 2021). В эксперименте с *Alternaria sp.* рост мицелия в чашках с отобранными штаммами *B. pumilus* по отдельности продолжился и на 14-сутки опыта, а с опытным образцом биопрепарата диаметр микроциета перестал увеличиваться с 10-го дня исследования (Малкова и др., 2021). Также композиция из штаммов *B. pumilus* оказалась более устойчивой к антибиотикам, выделяемым *Penicillium sp.* и *Aspergillus sp.* уже с 1 дня опыта. Все это косвенно указывает на синергизм 3-х штаммов *B. pumilus* при антагонистическом взаимодействии с фитопатогенными грибами.

При использовании метода параллельных штрихов антигрибковый эффект опытного образца препарата оказался не столь абсолютным, как с методом блоков. Показатель подавления роста грибов в опыте по сравнению с контролем составил для *P. infestans* – 96,03 %, *Alternaria sp.* – 69,14 %, *Penicillium sp.* – 33,69 %, *Aspergillus sp.* – 62,71 %. Дополнительно антагонистическую активность прототипа биопрепарата установили и против других фитопатогенов в лаборатории Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСХМ) (рисунки 4 и 5).

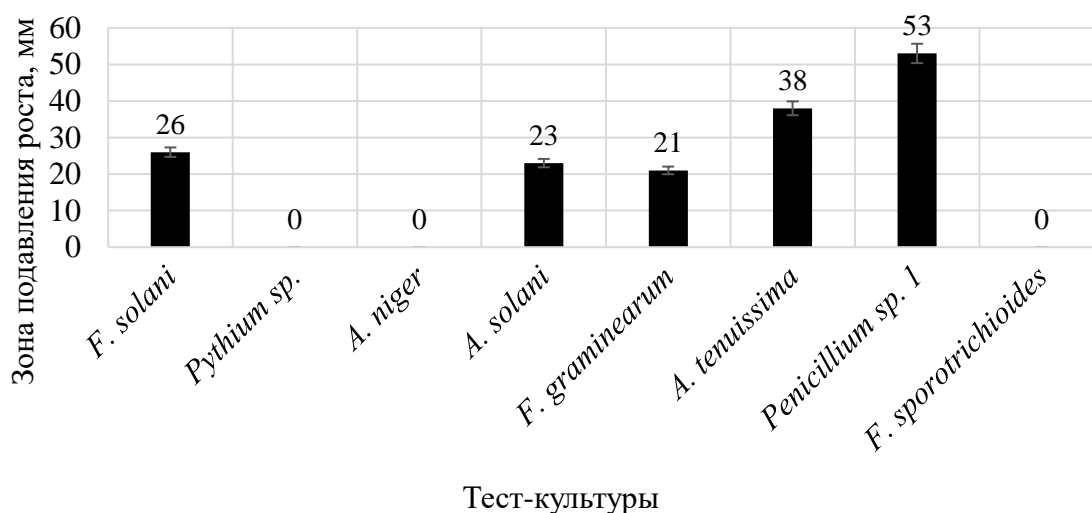


Рисунок 4 – Антифунгальная активность прототипа биопрепарата, установленная методом колодцев

Для опытного образца биопрепарата зафиксировали антагонистическую активность почти ко всем исследованным тест-штаммам грибов, исключение составили *A. niger* и *F. sporotrichioides*.

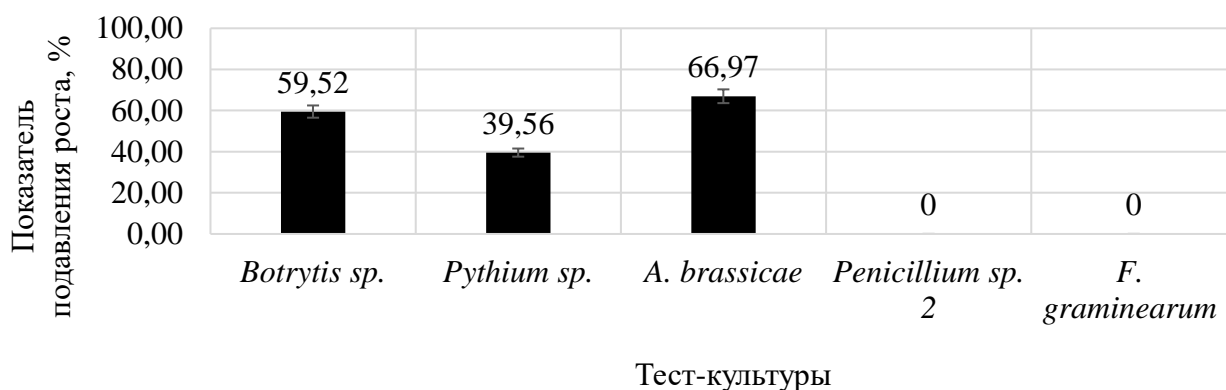


Рисунок 5 – Антифунгальная активность прототипа биопрепарата, установленная методом параллельных штрихов

Антимикотический эффект бацилл проявился по-разному – в виде образования зон отсутствия роста грибов (рисунок 6), уменьшения размера их колоний и снижения интенсивности окраски мицелия (со штаммом *Penicillium sp.* 2).

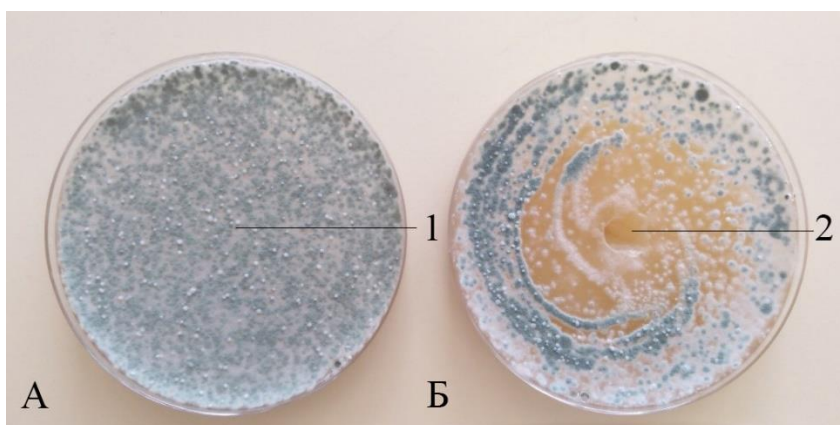


Рисунок 6 – Антагонистическая активность бацилл из прототипа биопрепарата против *Penicillium sp.* 1: А – контрольная чашка, Б – опытная чашка. 1 – газон микромицета, 2 – колодец с бактериальным консорциумом

Методами перпендикулярных и параллельных штрихов для опытного образца препарата в лабораторных условиях зафиксировали биосовместимость со штаммами, входящими в состав коммерческих препаратов «Триходерма вериде» (*T. viride* 471), «Алирин-Б» (*B. subtilis* В-10), «Лепидоцид» (*B. thuringiensis var. kurstaki*), а также с фунгицидом «Фитоспорин М» (*B. subtilis* 26Д) при соблюдении очередности обработки растений биопрепаратами. Со штаммами из препаратов «Экстрасол» (*B. subtilis* Ч-13), «Метаризин» (*M. anisopliae*), «Трихоцин» (*T. harzianum* Г 30 ВИЗР) и «Глиокладин» (*T. harzianum* 18 ВИЗР) выявили антагонистические взаимоотношения. Микробный консорциум из опытного препарата также оказался способным к сохранению численности бактерий (не менее 10^9 КОЕ/мл) после 24 ч выдерживания в рабочих растворах химических пестицидов «Престиж», «Инстиво» и «Винцит». При этом хранение прототипа препарата в рабочем растворе химиката «Максим» недопустимо на срок более нескольких часов, так как выявили снижение титра на 1 порядок. С пестицидом «Баритон» аналогичный негативный эффект на консорциум штаммов *Bacillus spp.* установили уже после часа выдержки (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние протравителей на численность бактерий из опытного образца биопрепарата (M±m)

Вариант	Титр бактерий через час после смешивания, КОЕ/мл*	Титр бактерий через сутки после смешивания, КОЕ/мл
1. Контроль (с водой)	$1,70(\pm 0,42) \times 10^9$	$1,14(\pm 0,33) \times 10^9$
2. Престиж	$2,05(\pm 0,64) \times 10^9$	$1,37(\pm 0,24) \times 10^9$
3. Инстиво	$1,80(\pm 0,42) \times 10^9$	$1,53(\pm 0,18) \times 10^9$
4. Баритон	$8,50(\pm 2,12) \times 10^8$	$2,80(\pm 0,28) \times 10^8$
5. Винцит	$2,45(\pm 0,78) \times 10^9$	$1,12(\pm 0,30) \times 10^9$
6. Максим	$1,30(\pm 0,42) \times 10^9$	$4,53(\pm 1,46) \times 10^8$

*: КОЕ – колониобразующие единицы

Для бактерий из опытного образца биопрепарата также установили хорошую приживаемость на семенах рапса, овса, гречихи (рисунок 7) и подсолнечника. Колониальная морфология микроорганизмов в контроле оказалась различной, и колонии выросли не возле каждого семени (с рапсом). В опыте же вокруг всех семян отметили рост бактерий с характерной морфологией штаммов *B. pumilus*. В чашках с семенами подсолнечника помимо бактериальной флоры выросли и микромицеты, благодаря чему дополнительно подтвердили антагонистический эффект бактерий из прототипа биопрепарата по отношению к микроскопическим грибам – в опытных образцах мицелий фактически не развивался.

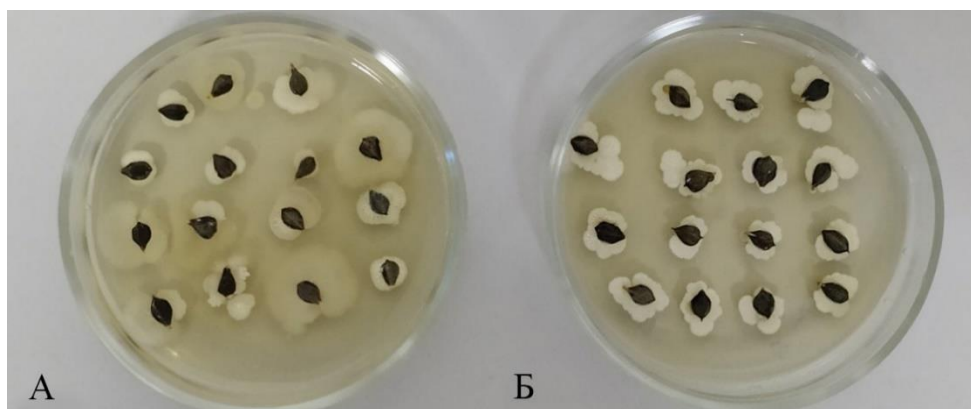


Рисунок 7 – Семена гречихи на агаризованной L-среде после 3 суток культивирования: А – контрольная чашка, Б – опытная чашка

При установлении микробной нагрузки опытных семян сразу после обработки опытным образцом биопрепарата зафиксировали увеличение численности микроорганизмов по отношению к контрольным образцам на 2–3 порядка (до 10^6 КОЕ/г) (таблица 4). После хранения опытных семян с внесенным прототипом средства для растений в течение суток и недели снижение титра бактерий не выявили (Малкова и др., 2022). Следовательно, посев семян в полевых условиях возможно производить как в первые часы после обработки, так и после хранения сроком не менее 7 дней, что практично для промышленного возделывания культур.

Таблица 4 – Влияние прототипа биопрепарата на микробную нагрузку семян ($M \pm m$)

Культуры	Численность микроорганизмов на семенах, КОЕ/г*			
	Необработанные (контроль)	Обработанные, посев сразу	Обработанные, посев через 24 ч	Обработанные, посев через 7 суток
Овес	$5,25(\pm 1,06) \times 10^3$	$3,03(\pm 0,18) \times 10^6$	$1,93(\pm 0,11) \times 10^6$	$1,18(\pm 0,23) \times 10^6$
Рапс	$1,20(\pm 0,28) \times 10^4$	$6,30(\pm 1,84) \times 10^6$	$2,23(\pm 0,33) \times 10^6$	$3,77(\pm 0,21) \times 10^6$
Подсолнечник	$1,11(\pm 0,16) \times 10^4$	$1,60(\pm 0,42) \times 10^6$	$3,35(\pm 0,92) \times 10^6$	$2,93(\pm 0,81) \times 10^6$
Гречиха	$3,60(\pm 1,13) \times 10^4$	$5,27(\pm 0,76) \times 10^6$	$3,29(\pm 0,77) \times 10^6$	$3,41(\pm 0,37) \times 10^6$

*: КОЕ – колониобразующие единицы

Ростостимулирующую активность предложенного опытного образца биопрепарата в лабораторных условиях установили с семенами тех же культур. Для овса зафиксировали значимую прибавку в высоте ростков (на 11 %) и длине корешков (на 25 %), для рапса – только в длине корней (на 11 %), а для гречихи и подсолнечника (таблица 5) установили значимые прибавки во всхожести (на 38 и 18 % соответственно) и к длине проростков с корнями (на 17 и 42 % соответственно). С семенами гречихи в опыте также подтвердили снижение инфицированности на 36 % по сравнению с контролем (Малкова и др., 2022).

Таблица 5 – Эффективность прототипа биопрепарата при проращивании семян гречихи и подсолнечника в лабораторных условиях ($M \pm m$)

Культура	Варианты	Всходы, %	Длина проростка+корня, мм	Инфицированность, %
Гречиха	Контроль	$66,67 \pm 9,87$	$68,52 \pm 11,49$	$28,00 \pm 6,93$
	Опыт	$92,00 \pm 2,00$	$79,85 \pm 17,14$	$18,00 \pm 0,00$
	+ к контролю	25,33	11,33	-10,00
	HSP_{05} *	14,24	10,08	9,8
Подсолнечник	Контроль	$60,67 \pm 3,06$	$15,66 \pm 0,69$	$64,50 \pm 11,70$
	Опыт	$71,50 \pm 4,43$	$22,23 \pm 4,27$	$71,00 \pm 14,47$
	+ к контролю	10,83	6,57	6,50
	HSP_{05}	6,94	2,56	22,80

*: HSP_{05} – наименьшая существенная разность для 5 %-ого уровня значимости

В ходе полевых испытаний опытного образца биопрепарата при выращивании овса в опыте по сравнению с контролем отметили значимые прибавки только в длине растений и метелки (на 3,7 и 6,1 % соответственно), что соотносится с данными в лаборатории, однако не является практически значимым. С опытных участков рапса в 2021–2022 гг. зафиксировали значимую прибавку в биологической урожайности на 42,9 % в среднем по сравнению с контролем. В 2021 году это выразилось положительным влиянием прототипа биопрепарата на вес семян со стручка (+ 47,5 %)

и массу 1000 зерен (+ 44,5 %), а в 2022 году – увеличением количества стручков с растения (+ 45,9 %) (таблица 6).

Таблица 6 – Влияние прототипа биопрепарата на элементы структуры урожая рапса (M±m)

Вариант	Высота растения, см	Количество стручков с 1 растения, шт	Вес семян со стручка, мг	Масса 1000 зерен, г	Биологическая урожайность, г/м ²
<i>2021 год</i>					
Контроль	97,80±2,41	15,80±1,01	25,25±6,29	1,19±0,16	107,28±30,21
Опыт	102,45±4,32	18,15±2,63	37,75±4,03	1,72±0,18	161,40±21,42
+ - к контролю	4,65	2,35	12,50	0,53	54,12
<i>HCP₀₅*</i>	5,03	3,13	9,15	0,30	52,38
<i>2022 год</i>					
Контроль	97,83±2,76	15,68±3,31	53,55±4,84	2,41±0,25	195,83±15,31
Опыт	106,68±4,95	22,88±4,60	57,88±3,75	2,50±0,26	271,69±54,12
+ - к контролю	8,85	7,20	4,33	0,09	75,87
<i>HCP₀₅</i>	5,48	6,94	7,50	0,44	68,90

*: *HCP₀₅* – наименьшая существенная разность для 5 %-ого уровня значимости

С гречихой значимое повышение биологической урожайности в опыте (на 47,3 %) в 2021–2022 гг. испытаний можно объяснить увеличением количества зерен (+ 39,6 %) и их массы с одного растения (+ 43,9 %) (таблица 7). С делянок подсолнечника, где семена обработали прототипом биопрепарата, в 2021 году зафиксировали значимое увеличение диаметра корзинки по сравнению с контролем (+ 7,6 %), а в 2022 г. – увеличение количества семян с 1 корзинки (+ 37,8 %). При этом в оба года выявили значимое увеличение биологической урожайности на 67,7 % в среднем, а также массы семян с 1 корзинки (+ 47,3 %) и 1000 зерен (+ 18,9 %).

Таблица 7 – Влияние прототипа препарата на элементы структуры урожая гречихи (M±m)

Вариант	Высота растения, см	Количество зерен с 1 растения, шт	Масса зерна с 1 растения, г	Масса 1000 зерен, г	Биологическая урожайность, г/м ²
<i>2021 год</i>					
Контроль	113,66±3,80	30,58±6,41	0,89±0,10	29,39±2,84	176,88±30,99
Опыт	113,31±3,78	36,05±3,04	1,12±0,12	31,12±1,01	246,48±31,34
+ - к контролю	-0,35	5,47	0,23	1,73	69,6
<i>HCP₀₅*</i>	4,16	5,16	0,17	3,69	54,00
<i>2022 год</i>					
Контроль	108,95±3,04	28,58±8,01	0,97±0,20	33,35±2,88	164,83±52,97
Опыт	109,15±8,89	46,07±0,50	1,57±0,04	34,01±0,89	257,00±45,95
+ - к контролю	0,20	17,49	0,60	-0,34	92,17
<i>HCP₀₅</i>	6,70	9,84	0,25	3,75	91,85

*: *HCP₀₅* – наименьшая существенная разность для 5 %-ого уровня значимости

На основании средних показателей биологической урожайности за 2021–2022 гг. экспериментов установили, что применение разработанного образца бактериального препарата при выращивании рапса, подсолнечника и гречихи экономически оправдано. По гречихе и рапсу расчетные экономический эффект и экономическая эффективность составили 47,34 % и 42,88 %, 19,41 руб./руб. и 81,24 руб./руб. соответственно. А возделывание подсолнечника с применением прототипа биопрепарата по расчетам оказалось наиболее выгодным – экономический эффект составил 67,72 %, а экономическая эффективность – 185,87 руб./руб.

Таким образом, за 2021–2022 гг. полевых испытаний зафиксировали значимый эффект от применения разработанного прототипа биопрепарата на биологическую урожайность и другие элементы структуры урожая рапса, подсолнечника и гречихи. Для овса в оба года установили только значимое увеличение высоты растений и длины метелки, что не столь важно в практическом плане, но также свидетельствует о стимуляционной активности предложенного прототипа биопрепарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данного исследования выделили и отобрали 9 природных штаммов бацилл из 108 образцов растений. В ходе дальнейших исследований по изучению их технологически-ценных свойств (биохимическая характеристика, антагонистическая активность по отношению к *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Alternaria sp.* и *P. infestans*, биосовместимость и пр.) выбрали 3 штамма *B. pumilus*, на основе которых разработали прототип поликомпонентного биопрепарата для растений.

Образец препарата получили путем смешивания концентратов всех 3-х штаммов, полученных после их отдельных ферментаций в 15 л биореакторе с последующими центрифугированием и лиофилизацией биомассы. Для прототипа биопрепарата в ходе хранения при 4–25 °С в течение 2-х лет зафиксировали сохранение титра на уровне не менее 1×10^{11} КОЕ/г. На данный момент все штаммы *B. pumilus* из состава опытного образца биопрепарата депонировали в отечественных коллекциях микроорганизмов (В-13250, RCAM05516 и RCAM05517), прототипу препарата присвоили название «Фитопумилин». На производство опытных партий биопрепарата сформировали ТУ 20.15.80-002-02067818-2022), ТИ, зарегистрировали каталожный лист продукции (№ 080.007967). Рецепт рабочего раствора прототипа биопрепарата: 1 г порошка на 100 мл воды, чего достаточно для обработки 10 кг семян.

Различными методами определения антагонистической активности установили антигрибное действие опытного образца препарата по отношению к 13 штаммам фитопатогенов – *P. infestans*, *Penicillium spp.* (3 штамма), *Aspergillus sp.*, *Alternaria sp.*, *A. solani*, *A. tenuissima*, *A. brassicae*, *F. solani*, *F. graminearum*, *Pythium sp.*, *Botrytis sp.* Кроме того, для прототипа биопрепарата в лабораторных условиях зафиксировали

биосовместимость со штаммами, входящими в состав коммерческих препаратов «Триходерма вериде», «Алирин-Б», «Лепидоцид», а также «Фитоспорин М», при соблюдении очередности обработки растений биопрепаратами. Микробный консорциум из образца препарата оказался способным к сохранению численности после 24 ч выдерживания в растворах пестицидов «Престиж», «Инстиво» и «Винцит».

Для опытного образца биопрепарата установили хорошую приживаемость штаммов *B. pumilus* на семенах рапса, овса, гречихи и подсолнечника, что позволяет хранить обработанный семенной материал не менее 7 дней. Также, для разработанного образца биопрепарата выявили высокую эффективность при проращивании семян данных растений в лабораторных условиях. Для овса с применением опытного образца биопрепарата зафиксировали значимую прибавку в высоте ростков и длине корешков, для рапса – только в длине корней, а для гречихи и подсолнечника – значимые прибавки во всхожести и к длине проростков с корнями.

Полевые испытания по установлению эффективности прототипа биопрепарата провели в 2021–2022 гг. При выращивании овса в опыте по сравнению с контролем отметили значимые прибавки только в длине растений и метелки, что соотносится с данными лабораторных экспериментов, однако не является практически значимым. После протравливания семян рапса в оба года установили значимую прибавку в биологической урожайности (более 40 %).

С гречихой значимое повышение биологической урожайности в опыте (на 47,3 % в среднем) в оба года испытаний можно объяснить увеличением количества зерен и их массы с растения. На делянках с подсолнечником в 2021 году зафиксировали значимое увеличение диаметра корзинок в опыте по сравнению с контролем, а в 2022 г. – увеличение количества семян с 1 корзинки. При этом в оба года испытаний зафиксировали значимое увеличение биологической урожайности на 67,7 % в среднем, а также массы семян с 1 корзинки и 1000 зерен.

В ходе расчетов установили, что применение разработанного прототипа биопрепарата при выращивании рапса, подсолнечника и гречихи экономически оправдано. При этом наиболее выгодным оказался посев подсолнечника с применением опытного образца биопрепарата – экономический эффект составил 67,72 %, а экономическая эффективность – 185,87 руб./руб.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой биологической активности консорциума из 3-х штаммов *B. pumilus* в составе опытного образца биопрепарата, проявляющейся в виде антагонистической активности по отношению к грибным фитопатогенам и ростостимулирующем воздействии на растения. Прототип данного препарата является перспективным для внедрения на крупных сельскохозяйственных

предприятиях и в частных подсобных хозяйствах при реализации программ интегрированной защиты растений, в том числе с экономической точки зрения.

ВЫВОДЫ

1. Из 108 растений (107 образцов ризосферы и 1 образец филлосферы) выделено 34 штамма бактерий рода *Bacillus*. По морфолого-культуральным и биохимическим свойствам отобрано и введено в коллекцию 9 природных штаммов, которые первично идентифицировали с использованием тест-системы Microgen *Bacillus*-ID до вида.

2. Для получения микробного консорциума отобраны штаммы *Bacillus pumilus* 4, *Bacillus pumilus* 7 и *Bacillus pumilus* 16 на основании скрининга их биосовместимости и антимикотического действия по отношению к *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Alternaria sp.* и *Phytophthora infestans*.

3. Выбранные штаммы *Bacillus* spp. фенотипически идентифицированы на основании их биохимических профилей с использованием тест-системы The Biolog Gen III Microplate, а также депонированы в Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства (*Bacillus pumilus* 4 – RCAM05516 (Пат. 2797825), *Bacillus pumilus* 7 – RCAM05517 (Пат. 2797699)) и во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (*Bacillus pumilus* 16 – ВКПМ В-13250 (Пат. 2694522)) и запатентованы в Федеральном институте промышленной собственности.

4. Разработана технология получения прототипа поликомпонентного биопрепарата в лиофилизированном виде. Установлено сохранение численности бактерий в опытном образце препарата на уровне не менее 1×10^{11} колониеобразующих единиц на грамм в ходе хранения в течение 2-х лет при температуре от 4 до 25 °С. Сформированы первичные нормативно-технические документы: технические условия (ТУ 20.15.80-002-02067818-2022, введено впервые 23.09.2022г.), технологическая инструкция (ТИ приказ ректора от 31.10.2022г. №1551/п) на производство опытных партий биопрепарата «Фитопумилин», зарегистрирован каталожный лист продукции (№ 080.007967).

5. Для разработанного прототипа биологического препарата *in vitro* зафиксирован широкий спектр антигрибной активности против таких микромицетов, как *Phytophthora infestans*, *Penicillium* spp. (3 штамма), *Aspergillus sp.*, *Alternaria sp.*, *Alternaria solani*, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria brassicae*, *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum*, *Pythium sp.*, *Botrytis sp.*

6. Показано, что опытный образец биопрепарата совместим с коммерческими микробными препаратами «Триходерма вериде», «Алирин-Б» и «Лепидоцид», а также химическими пестицидами «Круйзер», «Престиж», «Инстиво» и «Винцит».

7. Установлено, что прототип биопрепарата снижает инфицированность средне- сильно пораженных семян и стимулирует рост рапса, овса, гречихи и подсолнечника *in vitro*. Максимальное повышение всхожести зафиксировано с семенами гречихи (38 %), а наибольшее увеличение длины проростков с корнями – с подсолнечником (42 %). Для микробной композиции в составе образца бактериального препарата в лабораторных условиях подтверждена хорошая приживаемость на семенах исследуемых культур.

8. В полевых экспериментах подтверждено положительное влияние прототипа разработанного биопрепарата на биологическую урожайность и другие элементы структуры урожая рапса, подсолнечника и гречихи. Для овса в полевых испытаниях установлено только значимое увеличение высоты растений и длины метелки.

9. По расчетам использование опытного образца биопрепарата при возделывании рапса, подсолнечника и гречихи экономически оправдано. Наиболее выгоден посев подсолнечника с применением прототипа препарата – экономический эффект может составить более 65 %, а экономическая эффективность – 185,87 руб./руб.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Новые штаммы рода *Bacillus* могут стать типовыми для практикующих микробиологов и использоваться в других фундаментальных исследованиях и прикладном растениеводстве, а также для разработки новых бактериальных препаратов для сельского хозяйства.

2. Разработанный опытный образец биопрепарата «Фитопумилин», рекомендован для предпосевной обработки семян рапса, гречихи и подсолнечника с целью повышения урожайности сельскохозяйственных культур с нормой расхода прототипа препарата 100 г на 1 т семян и рабочего раствора 10 л на 1 т семян.

3. Опытный образец препарата для защиты и стимуляции роста растений может быть использован в дальнейших исследованиях по изучению его эффективности при посевах других культур, в том числе овощных, плодово-ягодных и цветочных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. **Малкова, А.В.** Разработка пробиотика для животных и аквакультуры на основе штаммов *Bacillus toyonensis* В-13249 и *Bacillus pumilus* В-13250 / **А.В. Малкова, И.Ю. Евдокимов, М.В. Ширманов, А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник** // Известия вузов. Прикл. Хим. и Биотехнол. – 2021. – № 1 (3). – С. 393–402. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-393-402>. (Wos) Цит.=2

2. Irkitova, A.N. A natural bacterial strain *Bacillus pumilus* 16: Identification and antibiotic resistance evaluation / A.N. Irkitova, **A.V. Malkova**, D.E. Dudnik // Acta Biologica

Sibirica. – 2021. – Vol. 7. – P. 391-406. <https://doi.org/10.3897/abs.7.e78412>. (Scopus)

Цит.=0

3. **Малкова, А.В.** Биосовместимость природных штаммов бацилл, перспективных для включения в состав микробного биопрепарата / **А.В. Малкова**, А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник // Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. им. Ю.А. Овчинникова. – 2022. – № 18 (1). – С. 38–43. (ВАК) Цит.=0

4. **Малкова, А.В.** Совместимость нового бактериального препарата для защиты и стимуляции роста растений с химическими пестицидами / **А.В. Малкова**, А.Н. Иркитова, Г.Г. Садовников // Совр. Наук.: Акт. Проб. Теор. и Практ. – 2023. – № 5. – С. 42–44. <https://doi.org/10.37882/2223-2966.2023.05.21>. (ВАК) Цит.=0

Патенты

1. Пат. 2693439 Российская Федерация, МПК⁵¹ С 12 N 1/20, С 12 R 1/07. Штамм бактерий *Bacillus toyonensis* ВКПМ В-13249, обладающий выраженным антагонизмом по отношению к микроорганизмам *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa* / Иркитова А.Н., **Гребенщикова А.В.***; заявитель и патентообладатель Алт. гос. ун-т. – № 2018146696; заявл. 25.12.18; опубл. 02.07.19, Бюл. № 19. – 10 с.

2. Пат. 2694522 Российская Федерация, МПК⁵¹ С 12 N 1/20, С 12 R 1/07. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* ВКПМ В-13250, обладающий выраженным антагонизмом по отношению к микроорганизмам *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis* / Иркитова А.Н., **Гребенщикова А.В.**; заявитель и патентообладатель Алт. гос. ун-т. – № 2018146694; заявл. 25.12.18; опубл. 16.07.19, Бюл. № 20. – 11 с.

3. Пат. 2797825 Российская Федерация, МПК51 С 12 N 1/20. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* РСАМ05516 для защиты растений от фитопатогенных грибов *Phytophthora infestans*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* и стимуляции роста растений / **Малкова А.В.**, Иркитова А.Н., Евдокимов И.Ю., Ширманов М.В., Дудник Д.Е., Каргашилова Е.Н.; заявитель и патентообладатель Алт. гос. ун-т. – № 2022121279; заявл. 03.08.22; опубл. 08.06.23, Бюл. № 16. – 6с.

4. Пат. 2797699 Российская Федерация, МПК51 С 12 N 1/20, С12R 1/07. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* РСАМ05517 для защиты растений от фитопатогенных грибов *Phytophthora infestans*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* и стимуляции роста растений / **Малкова А.В.**, Иркитова А.Н., Евдокимов И.Ю., Ширманов М.В., Дудник Д.Е., Каргашилова Е.Н.; заявитель и патентообладатель Алт. гос. ун-т. – № 2022121280; заявл. 03.08.22; опубл. 07.06.23, Бюл. № 16. – 6 с.

Статьи в других изданиях

1. Irkitova, A.N. Antibiotic susceptibility of bacteria from the *Bacillus subtilis* group / A.N. Irkitova, **A.V. Grebenshchikova***, D.E. Dudnik // Ukrainian Journal of Ecology. – 2019. – Vol. 9 (3). – P. 363–366.

2. Орлова, Т.Н., Изучение антибиотикочувствительности нового ризосферного штамма *Bacillus Pumilus* В-13250 для возможности использования его в составе пробиотических препаратов для животноводства / Т.Н. Орлова, А.Н. Иркитова, **А.В. Гребенщикова**, Д.Е. Дудник // Вестн. Алт. Гос. Аграрн. Универ. – 2020. – № 1 (183). – С. 111–115.

3. **Малкова, А.В.** Антифунгальная активность бактерий рода *Bacillus* по отношению к фитопатогену *Alternaria sp.* / **А.В. Малкова**, А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник, Е.Н. Каргашилова, И.А. Функ // Вестн. Алт. Гос. Аграрн. Универ. – 2021. – № 11 (205). – С. 40–43.

Тезисы

1. Дудник, Д.Е. Применение тест-систем для идентификации и изучения природных штаммов *Bacillus sp.* / Д.Е. Дудник, А.Н. Иркитова, **А.В. Гребенщикова** // «Пища. Экология. Качество»: матер. XVI Междунар. Научно-Практ. Конф. Барнаул: Изд. Алт. Гос. Универ. – 2019. – С. 243–246.

2. **Гребенщикова, А.В.** Подбор условий культивирования для бактерий рода *Bacillus* / **А.В. Гребенщикова** // Труды молодых ученых Алт. Гос. Универ.: материалы VII Рег. Молод. Конф. «Мой выбор – НАУКА!», XLVII Научн. Конф. студентов, магистрантов, аспирантов и учащихся лицейных классов. Барнаул: Изд. Алт. Гос. Универ. 2020. – С. 3–5.

3. **Малкова, А.В.** Мониторинг грибных фитопатогенов на семенах некоторых сельскохозяйственных культур / **А.В. Малкова**, А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник, Е.Н. Каргашилова // Матер. Всеросс. Конф. с междунар. участием и элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2021». Тула: Изд. Тульск. Гос. Универ. – 2021. – С. 98–100.

4. **Малкова, А.В.** Изучение антагонизма ризосферных бацилл к *Phytophthora infestans* для создания средства защиты растений / **А.В. Малкова**, А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник, Е.Н. Каргашилова // Матер. IV Межрег. Научно-практ. Конф. (с международным участием) «От биопродуктов к биоэкономике». Барнаул: Изд. Алт. Гос. Универ. – 2021. – С. 39–41.

5. **Малкова, А.В.** Изучение антагонистической активности бацилл по отношению к плесням, поражающим семена при хранении / **А.В. Малкова**, А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник, Е.Н. Каргашилова // Агробиотехнология-2021: матер. Междунар. Научн. Конф. М.: Изд. РГАУ – МСХА. – 2021. – С. 525–530.

6. **Malkova, A.** Development of a microbiological preparation for crops based on *Bacillus pumilus* strains / **A. Malkova**, I. Evdokimov, M. Shirmanov, A. Irkitova, D. Dudnik // BIO Web Conf. Intern. Scient. and Pract. Conf. “Fundamental Scientific Research and Their Applied Aspects in Biotechnology and Agriculture” (FSRAABA 2021). – 2021. – Vol. 36. – Ar. 07012. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20213607012>

7. **Малкова, А.В.** Подбор питательной среды для культивирования посевного материала штаммов *Bacillus pumilus* / **А.В. Малкова** // Актуальная биотехнология. – 2022. – № 1. – С. 104.

8. **Малкова, А.В.** Приживаемость бактерий поликомпонентного бациллярного препарата на семенах различных сельскохозяйственных культур / **А.В. Малкова**, А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник, Е.Н. Каргашилова // Материалы VIII Пушинской конф. «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», Школы-конф. молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие». – 2022. – С. 253–254.

9. **Малкова, А.В.** Изучение влияния нового бациллярного препарата на показатели качества семян гречихи в лабораторных условиях / **А.В. Малкова**, А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник, Е.Н. Каргашилова // Матер. Междунар. Научно-Практ. Конф. «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар: «ЭДВИ». – 2022. – С. 263–267.

Примечание: Гребенщикова, Grebenschikova – фамилия Малковой А.В. до даты 17.07.2021 г.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

RCAM – с англ. Сетевая биоресурсная коллекция в области генетических технологий для сельского хозяйства

ТУ/ТИ – технические условия/ технологическая инструкция

sp./ spp. – вид (для неидентифицированных) /все виды данного рода

КОЕ/г(мл) – колониеобразующих единиц на грамм(миллилитр)

ИЦ – Инжиниринговый центр

ФГБНУ ФАНЦА – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий»

ФГБНУ ВНИИСХМ – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии

Пат. – патент

L – среда Лурия

УЕР – питательная среда на основе дрожжевого экстракта и пептона