

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования
«Алтайский государственный университет»

На правах рукописи

МАЛКОВА АНГЕЛИНА ВЛАДИМИРОВНА

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

Специальность:

1.5.11 – Микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Ирkitова Алена Николаевна

Барнаул – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР И АНАЛИЗ ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Характеристика бактерий рода <i>Bacillus</i>	11
1.2. Болезни растений	23
1.3. Микробные препараты для растениеводства	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	39
2.1. Объекты исследования	39
2.2. Посуда, питательные среды и реактивы	41
2.3. Микробиологические методы исследования.....	42
2.4. Условия ферментации, концентрирования и лиофилизации.....	45
2.5. Установление эффективности прототипа биопрепарата при протравливании семян	47
2.6. Погодные условия полевого испытания	48
2.7. Математическая обработка данных	50
ГЛАВА 3. ПРИРОДНЫЕ БАКТЕРИИ РОДА <i>BACILLUS</i>	53
3.1. Выделение ризосферных штаммов <i>Bacillus</i> spp.	53
3.2. Первичная идентификация природных штаммов <i>Bacillus</i> spp. с помощью тест-системы Microgen Bacillus-ID	55
3.3. Биосовместимость выделенных бактерий рода <i>Bacillus</i>	57
3.4. Антагонистическая активность выделенных штаммов <i>Bacillus</i> spp. по отношению к фитопатогенам	61
3.5. Фенотипическая идентификация отобранных штаммов <i>B. pumilus</i> с помощью The Biolog Gen III Microplate	67
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОГО БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ КОНСОРЦИУМА ШТАММОВ <i>B. PUMILUS</i>	72
4.1. Подбор питательной среды для культивирования посевного материала	72
4.2. Отработка режима культивирования штаммов <i>B. pumilus</i> в ферментере	75
4.3. Технология получения прототипа биопрепарата	78
4.4. Установление сроков годности опытного образца препарата.....	81
4.5. Способ применения опытного биопрепарата.....	82

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗРАБОТАННОГО ОПЫТНОГО БИОПРЕПАРАТА	84
5.1. Антагонистическое действие бактериального консорциума из прототипа биопрепарата по отношению к грибным фитопатогенам.....	84
5.2. Приживаемость бактерий из опытного биопрепарата на семенах рапса, овса, гречихи и подсолнечника	91
5.3. Биосовместимость бактериальной композиции из прототипа препарата с микроорганизмами из других биопрепаратов	94
5.4. Возможность совместного использования опытного препарата с химическими протравителями семян	99
5.5. Биологическая эффективность прототипа биопрепарата при проращивании семян рапса, гречихи, овса и подсолнечника <i>in vitro</i>	101
5.6. Биологическая эффективность прототипа биопрепарата при выращивании рапса, гречихи, овса и подсолнечника <i>in vivo</i>	105
5.7. Расчетная экономическая эффективность опытного биопрепарата	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	117
ВЫВОДЫ	120
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	167
ПРИЛОЖЕНИЯ	171

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Микробные биопрепараты в основном состоят из вегетативных или покоящихся клеток полезных микроорганизмов, а также их метаболитов. Они нашли широкое применение в различных областях народного хозяйства – медицине, ветеринарии, 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 (ФЗ № 264, 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 микробиологических препаратов может способствовать переходу к высокопродуктивному и экологически безопасному сельскому хозяйству, а также построению независимой экономики страны.

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 *Azotobacter*, *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; Савустьяненко, 2016; Backer et al., 2018; 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. amyloliquifaciens*. 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; Wang et al., 2019; 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 особенно важно в связи с постоянной необходимостью ротации штаммов микроорганизмов в составе действующих препаратов из-за возникающих устойчивостей со стороны тест-культур, а также возможности утраты жизнеспособности или эффективности у действующих 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 растений – *Phytophthora infestans*, *Penicillium* spp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Alternaria solani*, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria brassicae*, *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum*, *Pythium* sp., *Botrytis* sp. В лабораторных и полевых условиях установлена стимулирующая активность предложенного опытного образца биопрепарата «Фитопумилин» при выращивании ценных сельскохозяйственных культур – рапса, овса, гречихи и подсолнечника. Максимальное повышение всхожести с применением прототипа препарата *in vitro* зафиксировали для семян гречихи (на 38 %), а наибольшее увеличение длины проростков с корнями – для подсолнечника (на 42 %). Максимальное повышение биологической урожайности *in vivo* (на 68 %) также зафиксировали в опытных посевах 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. mojavensis* RCAM05965) (справки о депонировании № 13249 от 03.12.2018 г., № 13250 от 03.12.2018 г., № 56/04 от 28.04.2022 г., № 57/04 от 28.04.2022 г., № 128/08 от 16.08.2022 г.), 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 агробιοтехнологий 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 23.09.2022 г.) – Федеральный уровень внедрения; технологическая инструкция (ТИ, приказ ректора от 31.10.2022 г. №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. Некоторые разделы диссертации выполнены совместно с к.б.н. А.Н. Иркитовой, И.Ю. Евдокимовым, М.В. Ширмановым, Д.Е. Дудник, Е.Н. Каргашиловой, д.с-х.н. Г.Я. Стецовым, к.с-х.н. Г.Г. Садовниковым, С.А. Пешковым.

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.

Благодарности

Автор выражает большую благодарность к.б.н., доценту Иркитовой А.Н. за многолетнюю помощь и поддержку в проведении диссертационного исследования, а также всему остальному коллективу Инжинирингового центра «Промбиотех» за содействие в совместных экспериментах. Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам отдела АНИИСХ ФАНЦА за возможность и помощь в проведении полевых испытаний.

ГЛАВА 1. ОБЗОР И АНАЛИЗ ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика бактерий рода *Bacillus*

История открытия и систематическое положение бацилл

Бациллы впервые описал в 1835 году Христиан Эренберг, который назвал изучаемую им культуру микроорганизмов из сена *Vibrio subtilis (subtilis)* (Ehrenberg, 1835). Позднее, в 1872 году, его соотечественник Фердинанд Кohn, открывший образование эндоспор, переименовал данный вид в *Bacillus subtilis* и отнес его к выделенному им роду *Bacillus* (Cohn, 1872). В 1876 году еще неизвестный тогда бактериолог Роберт Кох при поддержке Кона опубликовал в его журнале статью про возбудителя сибирской язвы *B. anthracis* (Koch, 1876). В 1895 Фишер выделил семейство *Bacillaceae* (Fischer, 1895), а в 1923 году был опубликован первый определитель Берджи, в котором уже упоминались бациллы (Bergey et al., 1923; Harwood, 1989; Slepecky and Hemphill, 2006; Sella et al., 2015).

За последние 100 лет систематика бацилл претерпела большие изменения. Первоначально большое значение при классификации данных бактерий придавали морфологии спор, способности расти в аэробных условиях, а также другим отдельным физиологическим и экологическим свойствам. Большой вклад на данном этапе систематизации видов рода *Bacillus* внесли Гордон и Смит с коллегами (Smith et al., 1952; Gordon, 1981). С развитием молекулярной биологии в хромосомной ДНК представителей рода *Bacillus* выявили большое генетическое разнообразие. Это привело к перераспределению, выделению и открытию новых таксонов различного ранга (Priest et al., 1988; Slepecky and Hemphill, 2006).

В определителе Берджи за 2009 г. было перечислено 19 родов в семействе *Bacillaceae* (Vos et al., 2009), а на данный момент их уже более 60 (Parte, 2018). Это в первую очередь обусловлено тем, что многие виды, относимые раньше к роду *Bacillus*, перевели в новые роды *Virgibacillus*, *Solibacillus*, *Brevibacillus*, *Ectobacillus* и др. (Shida et al., 1996; Heyndrickx et al., 1998; Mual et al., 2016). Но даже несмотря на это число видов в роде *Bacillus* также растет и составляет уже более 370 (Caulier et al., 2019). Например, после полифазного таксономического исследования Jiménez et al. (2013) установили, что штамм *B. cereus var. toyoi* ВСТ-7112Т – не подвид *B.*

cereus, а отдельный вид – *B. toyonensis*. А в 2020 году Sarr с коллегами доложили об открытии сразу 3-х новых штаммов в роде *Bacillus*: *B. dakarensis*, *B. sinesaloumensis* и *B. massiliogabonensis*.

Изменения произошли и в более высоких таксонах. Долгие годы бацилл относили к типу *Firmicutes* (Fajardo-Cavazos et al., 2014; Леванова, Захарова, 2017), однако в 2021 году International Committee on Systematics of Prokaryotes установил, что все типы должны иметь латинское название, оканчивающееся суффиксом «-ota», а также оно должно быть заимствовано от одного из родов внутри этого типа. Поэтому тип *Firmicutes* переименовали в *Bacillota* из-за рода *Bacillus* (Oren and Garrity, 2021). Таким образом, в соответствии с современным систематическим положением бациллы включены в домен *Bacteria*, тип *Bacillota*, класс *Bacilli*, отряд *Bacillales*, семейство *Bacillaceae*, род *Bacillus* (LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature).

В ходе современных филогенетических исследований, основанных на изучении 16S рРНК, выявили пять групп близкородственных видов рода *Bacillus*: группы *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. circulans* и *B. brevis* (Berkeley et al., 2002). Самыми изученными за счет давности открытия и практического значения являются первые две группы. В группу *B. subtilis* входят следующие виды: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. axarquiensis*, *B. malacitensis*, *B. mojavensis*, *B. sonorensis*, *B. tequilensis*, *B. vallismortis* и *B. velezensis* (Jeyaram et al., 2011; Alina et al., 2015). А в группу *B. cereus* – *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. toyonensis*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* (Liu et al., 2015; Ehling-Schulz et al., 2019).

Морфолого-культуральные, физиолого-биохимические свойства бацилл

К бактериям рода *Bacillus* относятся грамположительные палочки диаметр которых составляет 0,3–2,0 мкм, а длина – от 0,9 до 10,0 мкм. Расположение клеток – одиночное, парное или в цепочках (Федорова и др., 2016). Цитоплазма данных микроорганизмов может окрашиваться как равномерно, так и неравномерно (например, у *B. megaterium*) за счет обильного накопления запасных питательных веществ. Большинство бацилл подвижны, с перитрихальным расположением жгутиков (Logan, Vos, 2015). Среди неподвижных можно выделить *B. anthracis*, которая также способна образовывать капсулу (Еременко, 2008).

Еще одной отличительной особенностью бацилл является способность к спорообразованию. При обычном окрашивании споры легко различимы с вегетативными клетками, так как они преломляют свет и менее окрашены. Эндоспоры имеют овальную или цилиндрическую формы, образуются по бациллярному типу в неблагоприятных условиях и не служат для размножения. Основное назначение спор – придание клеткам бактерий устойчивости к различным типам стресса (Alina et al., 2015; Villarreal-Delgado et al., 2017).

Способность образовывать эндоспоры повышает резистентность бактерий рода *Bacillus* к таким физическим воздействиям, как ультрафиолетовое и γ -излучение, влажный и сухой пар, высушивание в условиях вакуума и пр. Высока устойчивость бацилл и к химическим токсикантам (кислотам, щелочам, фенолам, окислителям и др.) (Nicholson et al., 2000; Setlow, 2006; McKenney et al., 2012), в том числе к ряду антибиотиков пенициллинового ряда и других β -лактамов (Andrews & Wise, 2002; Owusu-Kwarteng et al., 2017). А *B. cereus*, например, может приобретать невосприимчивость к ципрофлоксацину, клоксациллину, эритромицину, тетрациклину и стрептомицину (Fiedler et al., 2019).

Большинство бацилл являются мезофилами с температурным оптимумом в пределах 25–40 °С. Однако встречаются как психрофильные представители (например, *B. psychrophilus*, способная расти в диапазоне от 0 до 28 °С), так и термофильные (например, *B. stearothermophilus* с оптимумом от 60 до 70 °С) (Mattingly, Best, 1972; Паносян, 2008). Для многих бациллярных бактерий наиболее благоприятными условиями среды являются нейтральные (pH=7), но известны и алкалофильные, и ацидофильные виды. Так, *B. acidocaldarius*, которую в 1992 году переклассифицировали в род *Alicyclobacillus*, растет при pH=3, а для *B. clausii* пригодными значениями водородного показателя для роста являются – 8–10 единиц (Кашнер, 1981; Wisotzkey et al., 1992; Cenci et al., 2006).

Не все бациллы способны расти в питательных средах с высоким содержанием NaCl (более 10 %). Так, штаммы *B. subtilis* оптимально развиваются в присутствии соли до 7 %, хотя встречаются представители, способные к росту и при 10, и при 15 % хлорида натрия (Boch et al., 1994; Satapute et al., 2012). А Nielsen et al. (1995) установили, что штамм *B. agaradhaerens* толерантен к 16 % NaCl.

По отношению к кислороду бактерии рода *Bacillus* являются преимущественно аэробами, однако известны факультативные анаэробы (*B. krulwichiae*) и строгие анаэробы – *B. infernus* и *B. arseniciselenatis* (Boone, et al., 1995; witzer Blum et al., 1998; Yumoto, 2003; Федорова и др., 2016). В бульонах при стационарном культивировании аэробные бациллы растут с образованием пленки на поверхности среды. При перемешивании – вся культура мутнеет (Lu et al., 2018).

Колониальная морфология бацилл на агаризованных средах чрезвычайно разнообразна как среди видов, так и внутри вида. Иногда даже колонии одного штамма могут казаться смешанной культурой. Большое влияние на их внешний вид оказывают условия инкубации (состав среды, время культивирования и пр.). Известно, что прорастающие споры и вегетативные клетки *B. subtilis* используют разные стратегии колонизации субстрата (Puzyr et al., 2002; Logan, Vos, 2015). Но, несмотря на это, колонии бактерий рода *Bacillus* легко узнаваемы: цвет – белый, серый или кремовый; форма – округлая или неправильная; край – ровный, волнистый или бахромчатый; профиль – бугристый, выпуклый или кратеровидный; консистенция – плотная или зернистая (Fujikawa, 1994; Vos et al., 2009). Например, для штамма *B. toyonensis* 15 из коллекции ИЦ «Промбиотех» характерна следующая морфология колоний: грязно-белый цвет, диаметр до 1,0–1,2 см, приподнятые, с неровным краем (Пат. 2693439). Для некоторых видов характерна пигментация колоний, например, для *B. atrophaeus* (Burke et al., 2004; Alina et al., 2015).

Фактически все виды бактерий рода *Bacillus* относятся к хемоорганотрофам и способны утилизировать различные типы субстратов из-за развитой полиферментной активности. Бациллы продуцируют амилазы, липазы, протеазы, оксидоредуктазы, лактамазы, целлюлазы, хитиназы, трансферазы и др. (Сафронова и др., 2006; Забокрицкий, 2015; Wu et al., 2018). Важным таксономическим признаком бациллярных бактерий является положительная реакция на каталазу (Carter, 1990; Babiker et al., 2017), однако существует ряд исключений, например, вид *B. aeolius*, у которого отсутствует данный фермент (Gugliandolo et al., 2003).

Бациллы также известны за счет своей продукции аминокислот, в первую очередь – триптофана, аргинина и лизина (Краснопольский, Клещев, 2013; Новиков, 2014). Jang et al. (2021) в ходе ферментации штаммами *Bacillus spp.* соевых бобов установили, что *B. licheniformis* и *B. sonorensis* активно синтезируют серин, треонин

и глутаминовую кислоту, а *B. subtilis* – аланин, аспарагин, глицин, лейцин, пролин, триптофан и лизин. Иногда для увеличения выхода микробных аминокислот применяются методы рекомбинантной ДНК и УФ-мутагенеза (Ikeda, 2005; Derkx et al., 2014). С помощью последней технологии Vjerre et al. (2016) получили штаммы *B. subtilis*, характеризующиеся сверхпродукцией триптофана.

Бактерии рода *Bacillus* способны синтезировать различные витамины, в основном – группы В. Так, *B. subtilis* активно производит витамины В₁ (тиамин), В₂ (рибофлавин), В₅ (пантотеновую кислоту), В₆ (пиридоксин) и В₇ (биотин), а для производства В₁₂ (кобаламина) используют виды *B. megaterium* и *B. circulans* (Mohammed et al., 2014; Карпунина, 2016; Su et al., 2020). Из жирорастворимых витаминов бациллы производят менахинон (К₂). *B. subtilis natto* активнее производит этот витамин в статической культуре (Sato et al., 2001; Mahdinia et al., 2018).

Наибольший интерес у исследователей вызывает способность бацилл продуцировать такие вторичные метаболиты, как антимикробные соединения. Установлено, что 4-5 % генома бактерии группы *B. subtilis* отвечает за производство противомикробных веществ (Stein, 2005; Caulier et al., 2019). Антимикробные метаболиты чаще всего представлены рибосомально и нерибосомально синтезируемыми пептидами. Реже определяются небелковые вещества с аналогичной активностью, например, поликетиды, аминсахара и фосфолипиды (Nakano, Zuber, 1990; Awais et al., 2010; Савустьяненко, 2016).

Среди антибиотиков, продуцируемых бактериями рода *Bacillus*, наиболее известны бацитрацин, бацилизин, сурфактин, итурин, мерсацидин, субтилозин, неотрегалосадиамин и др. (Varuzzi et al., 2011; Tojo, et al., 2015; Stoica et al., 2019). Известно, что сурфактин проявляет и антивирусную активность, которая также отмечают для рибонуклеазы *B. pumilus* и гексадекановой кислоты, продуцируемой бациллами, как вероятного ингибитора основных протеаз коронавируса COVID-19 (Shah Mahmud et al., 2017; Alam et al., 2021; Han et al., 2021).

Бациллярные сурфактин и итурин проявляют себя и как вещества с фунгицидной активностью. Бактерии р. *Bacillus* продуцируют целый ряд различных по своей природе соединений с противогрибковыми свойствами: фенгицин, микосубтилин, летучие соединения (деканаль, бензол, пентадекан, метилпиразин и

др.), ферменты (хитиназа) и пр. (Gong et al., 2006; Yuan et al., 2012; Senol et al., 2014; Khan, et al. 2018; Desmyttere et al., 2019; He et al., 2020).

Распространение и среда обитания бактерий рода *Bacillus*

Для бацилл характерен широкий ареал обитания, и их можно отнести к космополитам (Федоров, 1974; Морозова и др., 2021). В соответствии с материалами на сайте Global Biodiversity Information Facility они распространены на Земле от Арктики до Антарктиды. Их выделяли из океана и на материках; как в зоне умеренного климата, так и засушливого. А наибольшая плотность обнаружения и выделения бактерий р. *Bacillus* коррелирует с плотностью населения людей (рисунок 1).

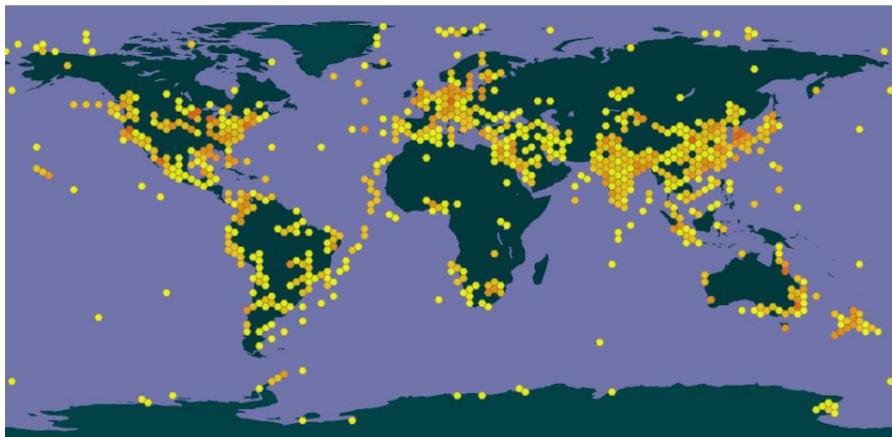


Рисунок 1 – Распространение выделенных штаммов *Bacillus* spp. на земной поверхности (<https://www.gbif.org/ru/species/3227637>)

Большинство бактерии рода *Bacillus* являются сапрофитами и обитают в почве (Henrici, 1934; Vilain et al., 2006; Brozel et al., 2011; Logan, Vos, 2015). Весомый вклад в изучение распространения бацилл внес советский ученый Мишустин (1954, 1972, 1975). Он установил, что географический фактор, тип почвы, а также конкретный горизонт влияют на численность и видовой состав спорообразующих бактерий. Оказалось, что виды группы *B. cereus* (*B. cereus* и *B. mycoides*) преобладают в северных мерзлотных почвах, а групп *B. subtilis* и *B. megaterium* – в южных почвах (Мишустин, Мирзоева, 1966; Добровольский, Чернов, 2011; Семенов и др., 2019).

Высокая сохранность бактерий рода *Bacillus* в окружающей среде обусловлена их способностью к спорообразованию (Fritze, Claus, 1995; Семенов, Былгаева, 2015; Remize, 2017.). Поэтому диапазон источников выделения бацилл не ограничивается только почвой, а намного шире. Различные виды бактерий р. *Bacillus* можно обнаружить в воздухе и воде, на предметах обихода и продуктах питания

(Carter, 1990; Achi and Halami, 2016; Soni et al., 2016). Например, японские ученые выделили новый вид *B. carboniphilus* из воздуха (Fujita et al., 1996). А Martins с коллегами (2001) обнаружили в эфиопских содовых озерах *B. agaradhaerens*, *B. cohnii*, *B. pseudofirmus*, *B. vedderi*. Примечательно, что жизнеспособные споры бацилл (*B. sphaericus*) удалось выделить даже из древней пчелы, сохранившейся в янтаре и возрастом 25–40 миллионов лет (Cano, Borucki, 1995).

Долгие годы считалось, что бациллы надолго не ассимилируют кишечник человека и не являются представителями его нормофлоры. Однако стали появляться исследования, свидетельствующие об обратном (Ramakrishna, 2007; Fakhry et al., 2008; Hoyles et al., 2012; Sorokulova, 2013; Pinskaya et al., 2017). Hong с коллегами (2009) установили, что из почвы можно выделить порядка 10^6 спор/г, а из фекалий человека – до 10^4 спор/г. По мнению ученых, такая высокая численность бактерий не может быть обусловлена только приемом пищи. Это позволило выдвинуть предположение, что бактерии рода *Bacillus* являются комменсалами людей.

Взаимоотношения бацилл с другими микроорганизмами

Бактерии рода *Bacillus* являются активными участниками микробных взаимодействий, для которых характерны как явления синергизма с нейтрализмом, так и антагонизма. Бациллы вступают во взаимоотношения с другими бактериями, грибами, вирусами, водорослями и простейшими (Logan, Vos, 2015).

Представители семейства *Bacillaceae* в первую очередь зарекомендовали себя, как антагонисты к патогенным микроорганизмам животных и растений (Ефимова, Удалова, 2011; Сидорова и др., 2021). В основе этих взаимоотношений лежат различные механизмы: конкуренция за субстрат; изменение условий среды; выработка противомикробных соединений (Тарантул, 2009).

Зарубежные ученые установили, что штаммы *B. pumilus* WP8 и *Erwinia persicinus* RA2 по отдельности отлично стимулируют рост томатов, но при совместном внесении они не обладают такими свойствами. Между данными бактериями возник конкурентный тип взаимоотношений. Это подтверждалось нарушением образования биопленок у обеих культур (Kang et al., 2014).

За счет большого пула генов, кодирующих синтез разнообразных антимикробных веществ, у бацилл зафиксировали антибактериальную, нематитцидную, антифунгальную и антивиральную активности. Так, Moore et al.

(2013) доказали, что 7 штаммов *B. subtilis* ингибируют рост различных представителей патогенов человека и животных родов *Salmonella*, *Shigella* и *Staphylococcus*. Другие зарубежные ученые продемонстрировали, что *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus*, *B. toyonensis* и *B. brevis* обладают антагонистической активностью по отношению к нематоды *Caenorhabditis elegans* (Zheng et al., 2016).

Caulier et al. (2018) отобрали более 50 штаммов *Bacillus* spp., проявивших подавляющее действие на грибные фитопатогены растений, такие как *Alternaria solani*, *Fusarium solani*, *P. infestans* и *Rhizoctonia solani*. Коллектив бразильских исследователей доказал, что пептид, синтезируемый *Bacillus* sp., эффективен по отношению к вирусу лошадиного артериита и вирусу герпеса кошек первого типа. При этом эффект по отношению к аденовирусу собак второго типа, коронавирусу собак, вирусу чумы собак, парвовирусу собак второго типа, вирусу гриппа лошадей и калицивирусу кошек не зафиксировали (Silva et al., 2014).

Однако не только бациллы могут оказывать подавляющее действие на другие микроорганизмы. Так, Шах Махмуд и др. (2017) выделили бактериофаг srt01hs *B. altitudinis*, который в разной степени поражал штаммы *B. altitudinis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, и не воздействовал на *B. licheniformis* и *B. atrophaeus*. А ученые из Дании подтвердили, что хищные амебоидные, жгутиковые и реснитчатые простейшие способны питаться и расти не только за счет поглощения вегетативных клеток *B. cereus*, но и их эндоспор. Также Santos et al. (2016) установили, что и некоторые бациллы выживают и размножаются внутри клеток протистов.

Широко распространено среди бактерий рода *Bacillus* и сотрудничество с другими микроорганизмами. Отечественные ученые установили, что эпифитный штамм *B. cereus* находится в мутуалистических взаимоотношениях с *Pseudomonas liquefaciens*, *Arthrobacter flavescens*, *A. album*. Это определили за счет усиления роста каждого из 2-х штаммов при совместном выращивании (Ерина и др., 2015).

Rojas-Solís с коллегами (2016) выяснили, что *B. thuringiensis* UM96 по-разному взаимодействует со штаммами *P. fluorescens* UM16, UM240, UM256 и UM270. Если на твердых средах наблюдалось скорее нейтральное взаимоотношение бактерий, то при инокуляции консорциумов культур при проращивании физалиса выявили, что только композиция *B. thuringiensis* UM96 + *P. fluorescens* UM256

сохраняет стимулирующий эффект на развитие проростков. Во всех остальных случаях положительное воздействие псевдомонад ингибировалось бациллами. Это указывает на важность подбора биосовместимых штаммов.

Синергизм *P. fluorescens* FAP2 and *B. licheniformis* B642 зафиксировали Ansari и Ahmad (2019). Ученые выявили, что при совместном культивировании штаммы не угнетали друг друга, а при инокуляции консорциума в ризосферу пшеницы наблюдались отличная колонизация корней обоими культурами и значительное усиление вегетативного роста, а также фотосинтетических параметров по сравнению с контролем и инокуляцией штаммов по отдельности.

Бациллы вступают в синергичные взаимодействия не только с бактериями, но и грибами, а также водорослями. Так, Win et al. (2021), разработали консорциум на основе *B. subtilis*, *B. velezensis* и *Penicillium sp.*, который эффективнее боролся с болезнями банана, вызываемыми *F. oxysporum* и *Alternaria sp.*, по сравнению со штаммами по отдельности. Ученые с Тайваня также доказали, что поликомпонентный пробиотик для креветок на основе *Lactobacillus pentosus* BD6, *L. fermentum* LW2, *B. subtilis* E20 и *Saccharomyces cerevisiae* P13, эффективнее улучшает состояние здоровья и производительность ракообразных, чем монокультуры этих штаммов (Wang et al., 2019). Al-Deriny с коллегами (2020) показали, что *Spirulina platensis* и *B. amyloliquefaciens* при совместном скармливании тилапии способствуют увеличению прироста биомассы и удельной скорости роста у рыб по сравнению с использованием при кормлении только одной добавки.

Взаимоотношения бацилл с животными

Большинство бактерий рода *Bacillus* безопасны для животных (Logan, Vos, 2015). Однако есть несколько видов, относящихся к паразитам млекопитающих и насекомых. Самым опасным представителем является *B. anthracis*, продуцирующая токсины и вызывающая болезнь антракс у сельскохозяйственных и диких животных, а также человека (Черкасский, Лаврова, 1969; Moayeri et al., 2015). А *B. cereus* провоцирует пищевые отравления и различные инфекции не только желудочно-кишечной локализации (Bottone, 2010). Но, несмотря на это, некоторые безопасные штаммы данной бактерии используют в качестве основных компонентов пробиотических препаратов за счет их полезных свойств (Gil-Turnes et al., 1999; Похиленко, Перелыгин, 2007; Nwagu et al., 2020).

К патогенам насекомых относят *B. thuringiensis* и *B. sphaericus*, способные продуцировать специфичные токсины. С середины XX века по всему миру стали активно выпускаться инсектициды на основе штаммов *B. thuringiensis* (Lord, 2005; Кандыбин и др., 2009), и в настоящий момент порядка 75 % биопестицидов на рынке содержат данный вид бацилл, который безопасен для человека и теплокровных животных (ГОСТ 33980-2016; Белоусова, 2019). А вид *B. sphaericus* стал активно изучаться только во второй половине XX и получил известность за счет токсичности для личинок комаров. На его основе также выпускается ряд биологических инсектицидов (Baumann et al., 1991; Park et al., 2010).

Многие виды бацилл (*B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. siamensis* и др.) обладают нематрицидной активностью за счет синтеза токсинов. Это свойство бактерий р. *Bacillus* также активно используется в сельском хозяйстве (Романенко и др., 2008; Gao et al., 2016; Бугаева и др., 2018; Hussain et al., 2020).

Более распространено среди бацилл нейтральное или позитивное воздействие на животных. Причем оно может быть непосредственным, опосредованным. Это способствовало созданию пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus* (Похиленко, Перелыгин, 2007; Феоктистова и др., 2017). Савустьяненко А. В. (2016) выделил 4 механизма действия пробиотических препаратов на основе бацилл на животные макроорганизмы: продукция антимикробных веществ; усиление различных видов иммунитета; стимулирование нормофлоры желудочно-кишечного тракта; синтез ферментов пищеварения.

Самым популярным компонентом споровых пробиотиков является *B. subtilis*, однако появляется все больше биопрепаратов, содержащих и другие виды бацилл – *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. toyonensis* и пр. (Gil-Turnes et al., 1999; Hong et al., 2005; Luan et al., 2015; Singh et al., 2017; Markowiak, Slizewska, 2018; Opriessnig et al., 2019). За счет своего положительного воздействия на макроорганизмы бактерии рода *Bacillus* нашли широкое применение в медицине, ветеринарии, животноводстве и аквакультуре.

Споровые пробиотические препараты употребляются людьми, а также вскармливаются крупному рогатому скоту, свиньям, птице, кроликам, рыбам, креветкам, домашним питомцам и другим животным (Ziaei-Nejad et al., 2005; Севрюков и др., 2013; Абрамова, 2015; Du et al., 2018; Lee et al., 2019; Bilal et al.,

2021; Mancini, Paci, 2021; Sivamaruth et al., 2021). Наблюдается ряд положительных эффектов, связанных с применением препаратов с бациллами. Среди них – увеличение массы тела, улучшение усвояемости пищи, усиление устойчивости к инфекциям, снижение смертности и пр. (Pinheiro et al., 2007; Cruz et al., 2012; Amoah et al., 2019; Sekar et al., 2019). Однако ряд исследований указывает на отсутствие как положительного, так и отрицательного эффектов от применения пробиотиков с бациллами (Hanifi et al., 2015; Kristensen et al., 2016; Mayor, 2016).

Бациллы могут оказывать благотворное воздействие на животные организмы не только при непосредственном оральном применении. Так, в Беларуси выпускают препарат на основе *B. subtilis* «Ветоспорин», предназначенный для профилактики и терапии инфекций кожи и копыт сельскохозяйственных животных (Сверчкова, Коломиец, 2014). А отечественными учеными предложен препарат «Биомастим», состоящий из штаммов *B. subtilis* и *Enterococcus faecium*, который обладает профилактической эффективностью против мастита у коров, а также ранозаживляющим действием (Пат. РФ № 2560277; Дятлов, 2021).

Взаимоотношения бацилл с растениями

Микроорганизмы, в частности бациллы, находятся в непрерывном контакте с растительными организмами, так как они являются естественной и благоприятной средой обитания для многих микробов в виду продукции питательных субстратов. Различают эпифитную или микрофлору филлосферы (филлопланы, карпосферы и пр.), распространенную на поверхности листьев, плодов и других надземных органов растений, а также ризосферу, представляющую собой тонкий почвенный слой, окружающий корни, и ризоплану – поверхность корня. Еще выделяют эндофитные микроорганизмы, населяющие внутренние ткани здоровых растений (Whipps et al., 2008; Благовещенская, 2015; Феоктистова, 2016; Dong et al., 2019).

Во всех перечисленных выше экологических нишах встречаются представители рода *Bacillus*, сожительствующие со многими растениями. Так, эндофитные штаммы *B. subtilis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis* выделялись из корней и клубеньков бобовых культур (маша, нута и др.) (Tariq et al., 2012; Васильева и др., 2019). На поверхности цветков, карпосферы малины, груши и пр. обнаруживали штаммы *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. mycoides*, *B. subtilis* (Заикина, 2008).

Велика численность бацилл и в ризосфере различных растений. Из слоя почвы возле корней сои выделяли такие виды, как *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, из ризопланы чайных кустов – *B. subtilis* и *B. mycoides*, ризосферы картофеля – *B. simplex* и *B. aryabhatai* и др. Примечательно, что бактерии рода *Bacillus* зачастую являются доминантными представителями микрофлоры растений (Pandey, Palni, 1997; Wahyudi et al., 2011; Liu et al., 2017).

Не только растения оказывают положительное воздействие на микроорганизмы за счет синтеза органических соединений, выступающих в качестве питательных веществ, но и микробы способны стимулировать растительные организмы. Прокариот, которые способствуют росту и развитию растений, в настоящее время называют PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), к ним в том числе относятся бациллы (Боронин, 1998; Comrants et al., 2005; Mendes et al., 2013; Backer et al., 2018). Леонтьевская (2014) сформулировала 4 основных механизма, за счет которых бактерии стимулируют растения: продукция фитогормонов; антагонистическая активность по отношению к фитопатогенам; активация растворения фосфатов; усиление поглощения минеральных веществ.

Отечественные ученые установили, что *B. subtilis* повышает устойчивость растений к действию такого тяжелого металла, как никель. Это объясняется усилением активности ферментов растительных организмов (Курамшина и др., 2016). Veltran-Garcia et al. (2014) доказали, что штамм *B. tequilensis* способен переводить азот в легкоусвояемую для растений форму.

Зачастую бациллы реализуют сразу несколько механизмов по стимулированию растений. Так, Malfanova et al. (2011) установили, что штамм *B. subtilis* HC8 стимулирует рост корней редьки за счет синтеза гиббереллинов, и также защищает томаты от томатной пятнистости и корневой гнили благодаря продукции антимикробных липопептидов. Артамонова (2017) продемонстрировала, что *B. subtilis* не только синтезирует гиббереллиновую кислоту, но и проявляет антагонистическую активность против возбудителей угловатой пятнистости и мягкой гнили тыквы. Mazylyte et al. (2022) выяснили, что штамм *Bacillus sp.* MVY-004 солубилизирует фосфаты и синтезирует индол-3-уксусную и гиббереллиновую кислоты. Узбекистанский ученый Egamberdiyeva (2007) доказала, что штамм *B. polymyxa* ВcP26 стимулирует поглощение P, K и N корнями кукурузы в почве с

дефицитом питательных веществ, а также повышает устойчивость растения в условиях засухи и солевого стресса.

Недавним открытием стало то, что бактерии, в частности бациллы, способны воздействовать на вирулентность фитопатогенных микроорганизмов. Зарубежные ученые установили, что фермент *B. thuringiensis*, разрушающий сигнальные молекулы чувства кворума, может снижать вирулентность *E. carotovora* в корневой системе перца (Park et al., 2008; Kumar et al., 2011).

Фитопатогенные виды в семействе *Bacillaceae* фактически отсутствуют. Они преимущественно вызывают гнили, но только при благоприятных условиях или сильном ослаблении растительных организмов (Горленко, 1966). Так, Стогниенко О. И. (2018) определила, что *B. mesentericus* и *B. mycoides* обнаруживаются на втором этапе патогенеза при сильном увядании хвоста сахарной свеклы, после токсичного воздействия на растительные ткани *F. oxysporum* и *Erwinia sp.* Зарубежные исследователи установили, что *B. megaterium* – возбудитель бактериального ожога люпина (*Lupinus termis*). Но выделенные изоляты данных бацилл не вызывали снова болезни на 17 изученных видах растений (Abdel-Monaim et al., 2012).

Таким образом, открытие, первичная классификация и изучение основных свойств бацилл пришлось на период становления микробиологии как самостоятельной науки (XIX – XX вв.). Однако динамичное развитие учения о систематическом положении, свойствах и практическом применении бактерий рода *Bacillus* продолжается и в наше время, о чем свидетельствуют новые многочисленные открытия.

1.2. Болезни растений

Определение и классификация болезней растений

Под болезнью растений в соответствии с ГОСТ 21507-2013 понимают нарушение нормального метаболизма в клетках, органах и целых растениях в результате воздействия фитопатогенных организмов, неблагоприятных факторов окружающей среды или их совместного влияния. Болезни с свою очередь подразделяются на неинфекционные (непаразитарные) и инфекционные (паразитарные). Первые возникают под воздействием неблагоприятных абиотических факторов окружающей среды, а последние вызывают фитопатогенные

организмы: микроорганизмы, растения–паразиты или паразиты из животного мира (насекомые, нематоды и пр.), которых чаще называют вредителями (Гайстер, 1934; Кузьмичев и др., 2004; Бабамурадова, 2018; https://www.pesticidy.ru/dictionary/Plant_disease, 2022).

Внешние проявления болезней, в независимости от того, чем или кем они вызваны, подразделяются на несколько симптомов или типов болезней. Самые распространенные из них – *гнили*, при которых происходит разрушение или размягчение тканей растений; *пятнистости и ожоги*, характеризующиеся образованием отмерших фрагментов разных форм и размеров на пораженных органах; *налеты*, представляющие из себя мицелий или спороношение микромицетов на пораженных растениях, а также *изменение окраски* листьев. Помимо этого, выделяют и другие симптомы, среди которых карликовость, увядание, опухоли и наросты, деформации, язвы, мумификация, пустулы, головня и пр. (Horst, 2001; Шкаликов и др., 2010; Назаров и др., 2020).

Непаразитарные болезни, в отличие от инфекционных, не передаются от одного растения к другому. Причиной их возникновения могут быть избыток или недостаток воды, микро- и макроэлементов, света; загрязненность и кислотность почвы; температура, а также град и пр. Например, при сухих жарких ветрах происходит увядание растений и некроз листьев, а при недостатке меди – хлороз молодых листьев. Для одной болезни зачастую характерен спектр симптомов, хотя и выделяются основные. Непаразитарные болезни, вызывая ослабление растений, могут способствовать возникновению инфекций. В данном случае говорят о сопряженных болезнях. Примером может послужить развитие сухой гнили свеклы, возбудителем которой является *Phoma betae*, в условиях недостатка бора (Чикин, 2001; Сычева, 2012; Белошапкина и др., 2017; Хуррамов, Нуралиев, 2018).

Инфекционные болезни, вызываемые микроорганизмами, в зависимости от возбудителя подразделяются на грибные (микозы), бактериальные (бактериозы) и вирусные (вирозы) (Горленко, 1966; Александров, 2011; Власов и др., 2016; Zhang et al., 2020). В классификации заболеваний растений существуют и другие подходы. Например, в зависимости от того, какой орган поражается, выделяют локальные болезни семян (плесневение семян, вызываемое грибами родов *Alternaria*, *Fusarium*,

Rhizopus и др.), корней (бактериальный рак корней, вызываемый *Agrobacterium tumefaciens*), плодов (деформация плодов черемухи, вызываемая *Taphrina padi*) и др.

Когда болезни поражают все части растения или большую их часть говорят о системных (общих) инфекциях. К ним относится бактериальное увядание подсолнечника, возбудитель которого – *Ralstonia solanacearum* (Каратыгин, 2002; Бородин и др., 2012; Матвиенко, Константинова, 2018; Лазарев и др., 2020).

Еще одним критерием для классификации болезней является то, к какой культуре или группе относится пораженное растение. Например, существуют заболевания овощных (инфекция, вызываемая вирусом зеленой крапчатой мозаики огурца), зерновых (стеблевая ржавчина, возбудитель – микромицет *Puccinia graminis*), ягодных (монилиальный ожог, возбудителем которого являются представители рода *Monilia*) культур, древесных пород (сосудистый микоз, вызываемый грибами рода *Ceratocystis*) и др. (Гультияева и др., 2007; Гнутова, Толкач, 2009; Хвасько, 2013; Колмыкова, 2020).

Кроме того, болезни растений могут протекать в острой или хронической форме. В первом случае заболевание развивается в течение одного вегетационного периода (фитофтороз картофеля, вызываемый оомицетом *P. infestans*), а во втором – может затягиваться на годы (черный рак яблони, возбудитель – гриб *Sphaeropsis malorum*) (Сычева, 2012; Головин, 2020; Mbewe et al., 2021).

Краткая характеристика некоторых возбудителей заболеваний растений

Известно, что более 60 % возбудителей болезней растений передается через семенной материал. Заражение семян может происходить как в период вегетации, так и во время уборки, обработки или при хранении. Высокая влажность является одним из основных факторов обсеменения фитопатогенами и развития инфекций посевного материала (Апаева, Чипурнова, 2019; Черткова, 2021).

Около 80 % болезней растений вызвано микромицетами. Самыми распространенными инфекантами семян являются полевые грибы родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Bipolaris* и др., а также плесени хранения родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* и *Mucor* (Сокирко и др., 2014; Коняева и др., 2016; Дроздова и др., 2017; Матвиенко, Константинова, 2018 Johnston-Monje et al., 2021; Tkalec et al., 2022).

Бактериозы на семенах встречаются реже, чем микозы. Бактериальные инфекции зачастую бывают вторичными, возникающими в отмерших тканях

семядолей из-за избыточного увлажнения. К основным возбудителям бактериозов семян и вегетирующих растений относят бактерии родов *Pseudomonas*, *Clavibacter*, *Xanthomonas* и *Erwinia* (Tancos et al., 2013; Dutta et al., 2014; Зеленцов и др., 2021).

Заболевания растений, вызываемые грибами р. *Fusarium*, называются фузариозами. Данные микромицеты долгое время относили к Несовершенным грибам, но в соответствии с современной классификацией они являются анаморфной стадией Аскомицетов родов *Gibberella*, *Albonectria* и *Haematonectria*. Для фузариевых грибов характерны макроконидии серповидной или веретеновидной формы, мицелий от белого до красновато-розового цвета. Наиболее известными патогенными видами являются – *F. oxysporum*, *F. solani* и *F. graminearum*. Фитопатогенные микромицеты рода *Fusarium* вызывают такие заболевания, как фузариозная корневая гниль злаков, фузариоз семян и початков кукурузы, корневая гниль и увядание лука и др. (Гагкаева, Гаврилова, 2009; Гагкаева и др., 2011; Церковная, 2012; Белошапкина и др., 2017; Соколова, 2019; Soleha et al., 2021).

Причиной альтернариозов являются грибы рода *Alternaria*, которые также переклассифицировали из отдела *Deuteromycota* в *Ascomycota*. Для анаморфной стадии этих микромицетов характерно образование многоклеточных конидий яйцевидно-цилиндрической формы, мицелий окрашен в оливково-бурые цвета. Определено более 350 видов альтернарий, однако их идентификация все еще проблематична. Распространены как сапрофитные, так и патогенные представители. К наиболее известным фитопатогенным видам можно отнести *A. alternata*, *A. brassicae*, *A. solani* и др. Данные грибы в основном вызывают альтернариозы у растений из семейств Крестоцветные, Пасленовые и Злаки (Woudenberg et al., 2013; Марченко, 2014; Ганнибал, Новичкова, 2015; Далинова и др., 2020).

При несоблюдении правил хранения и повышенной влажности семян происходит их плесневение, вызванное грибами родов *Penicillium* и *Aspergillus*. Данные микромицеты также относятся к высшим сумчатым грибам и отличаются между собой строением конидиеносцев – у пенициллов они более разнообразны и в верхней части имеют форму «кисточки», а у аспергиллов на верхушке есть утолщение или так называемый пузырь. Мицелий этих микромицетов септированный, его цвета достаточно разнообразны (зеленые, голубые и др.). Грибы родов *Penicillium* и *Aspergillus* при поражении семян снижают их технические

свойства и продуцируют микотоксины, опасные для человека и животных. Так, *A. flavus* производит афлатоксин, *P. expansum* – патулин, а *A. ochraceus* и *A. niger* синтезируют охратоксины (Елинов, 1989; Afzal et al., 2013; Zulkifli, Zakaria, 2017; Ефимочкина и др., 2019; Исемберлинова и др., 2020; Лекомцева, Малозёмов, 2021)

Плесневение семян вызывают также грибы родов *Rhizopus* и *Mucor*, которые ранее относили к Зигомицетам, но не так давно выделили в отдел *Mucoromycota*. Для данных микромицетов характерно несептированное строение мицелия, и у р. *Rhizopus* спорангиеносцы образуются пучками. Одним из самых известных заболеваний, вызываемых этими грибами, является сухая гниль корзинок подсолнечника. Инфектантами являются *R. oryzae*, *R. stolonifer* и *R. microsporus* (Бородин и др., 2007; Бородин и др., 2012; Spatafora et al., 2016; Walther et al., 2019).

Среди грамположительных инфектантов семян известны бактерии рода *Clavibacter*, лишь в конце прошлого века выделенные из рода *Corynebacterium*. Типовым видом считается *C. michiganensis*, поражающий представителей семейства Пасленовые. Подвид *C. michiganensis subsp. sepedonicus* вызывает кольцевую гниль картофеля, а *C. michiganensis subsp. michiganensis* – бактериальный рак томата (Tancos et al., 2013; Лазарев и др., 2014; Граскова и др., 2018; Nan et al., 2018).

Вредоносными возбудителями бактериоза являются грамотрицательные палочки рода *Xanthomonas*, инфицирующие более 400 видов растений (злаковых, пасленовых и др.). Фитопатогенных ксантомонад известно порядка 27 видов, а типовым является – *X. campestris*. Данные бактерии передаются с посевным материалом и вызывают черный бактериоз злаков (*X. translucens*), бактериальный ожог риса (*X. oryzae pv. oryzae*), бактериальную пятнистость листьев сливы (*X. arboricola*) и др. (Игнатов и др., 2010; Егорова и др., 2014; An et al., 2020).

Для контроля фитопатогенов растений применяются представители рода *Pseudomonas*, например, *P. fluorescens*. Но среди псевдомонад известны и патогенные виды. *P. syringae* – одна из наиболее изученных и распространенных фитопатогенных бактерий, которая обитает в филлосфере и распространяется с семенами. На данный момент известно более 60 патоваров, заражающих разные растения. Так, *P. syringae pv. pisi* вызывает бактериальный ожог гороха, а *P. syringae pv. atrofaciens* – базальный бактериоз пшеницы (Конурбаева, Доолоткельдиева, 2008; Benlioglu et al., 2010; Xin et al., 2018; Butsenko et al., 2020).

Грамотрицательная палочка *E. herbicola* является представителем эпифитной нормофлоры семян, составляя до 90 % от общего числа бактерий. Ее преобладание в микрофлоре зерна является показателем его доброкачественности. Однако, в роде *Erwinia* есть и ряд патогенных для растений видов – *E. amilovora*, *E. rhapontici* и *E. carotovora*. Хотя некоторые из них не так давно переклассифицировали. Например, *E. carotovora* теперь относится к роду *Pectobacterium*. Данная бактерия вызывает «черную ножку» или бактериальную мягкую гниль картофеля (Шабурова и др., 2008; Леонтьевская, 2014; Рыскалиева и др., 2018).

Методы защиты растений от болезней и вредителей

В эпифитотийные годы потери урожая от инфекционных заболеваний могут достигать 50 % и более (Сокирко и др., 2014). Для профилактики и борьбы с болезнями и вредителями растений существует целый ряд разработанных мероприятий. Опираясь на работы Ертаевой и др. (2015), а также Дорохова и др. (2021) можно выделить следующие известные в современности методы защиты растений: механические; агротехнические, селекционно-генетические; физические; химические; биологические; карантинные.

Механические методы являются одними из самых древних. К ним относят непосредственный сбор вредителей вручную или с помощью техники, установку преград, удаление поврежденных побегов и др. Данные мероприятия экологически безвредны и просты в применении, но очень трудоемки, поэтому ограничены в распространении (Коготько и др., 2016; Зейрук и др., 2020; Зотиков, 2021).

Физические методы основаны на воздействии физических факторов, таких как температура, излучения, ультразвук. В качестве примера можно привести применение электромагнитных излучений при борьбе с колорадским жуком, сушку семян для профилактики и истребления вредителей и возбудителей инфекций и др. В качестве недостатка можно выделить то, что применяемые устройства не обладают селективным воздействием только на вредоносные организмы (Родионов, Нугманов, 2019; Никуличев, 2020; Дорохов и др., 2021).

Агротехнические методы защиты растений зачастую относят к основополагающим. Они включают сроки посева, севообороты, обработку почвы (например, боронованием) и множество других приемов. Все эти техники необходимы для создания условий, благоприятных для целевых культур и

неблагоприятных для развития вредных организмов. Агротехнический контроль в общем экологически безопасен, но его важно применять осознанно. Эффект от использования агроприемов зачастую неоднозначен. Например, вспашка создает неблагоприятные условия для фитопатогенных организмов, но также она опасна для применения в регионах с подверженной эрозии почвой (Зазимко, Долженко, 2011; Власенко, Коротких, 2012; Андреев, Марьина-Чермных, 2018; Санин, 2021).

Химические методы защиты растений являются одними из самых дискуссионных в виду экологической небезопасности большинства из них. Стоит вспомнить инсектицид ДДТ, который, несмотря на высокую эффективность и дешевизну производства, оказался способным к накоплению в окружающей среде и токсичным для теплокровных животных, в том числе человека. Еще к одному недостатку химических пестицидов стоит отнести то, что их многократное применение приводит к возникновению резистентности у фитопатогенных организмов. Современное развитие химических технологий для сельского хозяйства нацелено на разработку малоопасных препаратов с высокой селективностью и эффективностью, например, элиситоров, которые повышают устойчивость растений к возбудителям инфекций и вредителям. Использование пестицидов в нашей стране регламентируется Федеральным закон «О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами» от 19.07.1997 N 109-ФЗ и «Государственным каталогом пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации». В справочнике перечислены химические и биопестициды (Гниненко, 2013; Илларионов, 2014; Слинкина, 2017; Сухорученко и др., 2020).

Биологические методы базируются на использовании специфичных хищников, паразитов и представителей полезной микрофлоры в качестве биологических агентов, эффективных при борьбе с возбудителями инфекций и вредителями растений. Биологические приемы также включают применение аттрактантов и репеллентов для дезориентации насекомых, а биопрепараты на основе микроорганизмов и их метаболитов могут выступать в качестве удобрений и стимуляторов роста растений. Среди достоинств биологических средств можно выделить то, что они экологически безопасны, не накапливаются в окружающей среде, не вызывают привыкания. Но также биопрепараты менее губительны для

фитопатогенов, чем химикаты, и достаточно трудоемки для производства (Франк, Кищенко, 2008; Логвинова, Булгакова, 2019; Комарова и др., 2021; Новиков, 2021).

Селекционно-генетические методы имеют направленность на разработку устойчивых к действию вредителей и патогенных микроорганизмов сортов растений. Реже предполагают внедрение в естественную среду неполноценных вредных организмов. Эти техники основаны на генной инженерии, гибридизации, полиплоидии и мутагенезе. Селекционный контроль является экологически безопасным приемом и позволяет создавать защищенные сорта растений для различных климатических зон. Однако, зачастую сорта, которые не восприимчивы к одним инфекциям, могут быть сильно подвержены воздействию других. Кроме того, данный метод защиты растений достаточно трудоемок и требует продолжительного срока реализации. Не все исследователи относят селекционно-генетические приемы к биологическим методам, так как их действие чаще направлено на сами культурные растения, а не на угнетение вредителей (Логвиновский, 2005; Санин, 2010; Шашко, 2010; Ертаева и др., 2015).

Карантинные методы включают в себя государственные мероприятия, направленные на предотвращение проникновения карантинных фитопатогенных организмов и ликвидацию карантинных объектов. В РФ для регулирования этого вопроса существует ФЗ «О карантине растений» от 21.07.2014 N 206-ФЗ. Для реализации карантинных приемов необходимо опираться на остальные техники (Воронин и др., 2014; Куделькин, 2019; Сычёва, Земченкова, 2019).

С учетом всех достоинств и недостатков вышеперечисленных методов можно заключить, что ни один из них не является самодостаточным и главным. В целях эффективной и безопасной для окружающей среды защиты растений необходимо комплексное использование и развитие всех типов применяемых мероприятий. Интегрированная защита растений, начавшая формироваться в нашей стране еще в 70-х годах прошлого века, по мнению академиков Жученко А. А., Соколова М. С. и Долженко В. И. должна перейти к адаптивно-интегрированной. Данная фитосанитарная система подразумевает агроэкосистемный подход, сохранение биоразнообразия, снижение отрицательного воздействия защитных мер на нецелевые организмы в том числе за счет применения биопрепаратов (Зазимко, Долженко, 2011; Зубков, 2014; Долженко, 2018).

Выбранный вектор развития защиты растений соответствует приоритетным направлениям научно-технологического развития России согласно Указу Президента РФ № 642 от 01.12.2016 г. Разработка и внедрение новых химических и биологических препаратов для растениеводства поспособствуют переходу к высокопродуктивному и экологически безопасному сельскому хозяйству.

1.3. Микробные препараты для растениеводства

Определение и классификация микробных препаратов

Под микробиологическими препаратами чаще всего понимают живые клетки микроорганизмов, реже – их метаболиты. Подбор действующих штаммов для биопрепаратов осуществляется на основании селекции или генетической модификации по полезным свойствам. Активные ингредиенты биологических средств могут находиться в культуральной жидкости, наноситься на носители или смешиваться с наполнителями (Тихонович и др., 2005; Старовойтова, Скроцкая, 2013; Муродова, Давранов, 2014; Тишков и др., 2015).

Существует множество подходов в классификации микробных препаратов. По природе действующего компонента микробиологические средства выпускаются на основе вирусов, бактерий, грибов и их метаболитических соединений. Среди активных составляющих биологических средств для растениеводства особенно популярны микромицеты рода *Trichoderma* («Стернифаг», «Глиокладин» и др.), а также бактерии родов *Pseudomonas* («Планриз», «Бинорам» и др.) и *Bacillus* (Горбунов, 2011; Зиганшин, Сироткин, 2017; Джалилов, 2018).

В зависимости от количества используемых штаммов в биопрепарате они бывают монокомпонентными (содержат 1 штамм) и поликомпонентными (содержат 2 и более штамма), их еще называют симбиотики из-за симбиотических отношений между действующими агентами препарата. Так, «Гамаир» базируется на штамме *B. subtilis* М-22 ВИЗР, а «Бифиформ» на консорциуме из штаммов *Bifidobacterium longum* и *E. faecium* (Новиков, 2009; Леонов, 2018).

Биопрепараты нашли широкое использование в различных отраслях народного хозяйства. В связи с этим по областям применения выделяются медицинские микробные средства («Линекс», «Хилак Форте» и др.), препараты для животных и ветеринарии («Проваген», «Олин», «Моноспорин» и др.), а также

растениеводства («Азотобактерин», «Ризоторфин» и др.). Микробы применяют для деструкции нефти в почве («Экобел», «Родобел-ТН» и др.) и пр. (Фатина, 2007; Котова и др., 2012; Абрамова, 2015; Клишевич и др., 2018; Гуревич и др., 2019).

Микробные средства для человека и животных в общем виде подразделяются на пробиотики («Аципол», «Бифиформ» и др.), синбиотики («Максилак», «Нормофлорин-Л» и др.) и метабиотики («Бактистатин», «Дайго» и др.). Первые содержат полезные микроорганизмы, вторые помимо пробиотического компонента усилены пребиотическим, а последние представляют из себя продукты метаболизма микробов (Чичерин и др., 2016; Плотникова, Захарова, 2018; Шендеров и др., 2018).

Микробиологические препараты для растениеводства могут выступать в качестве биопестицидов, биоудобрений («Азофит», «БисолбиФит» и др.) и регуляторов роста растений («Мицефит», «Бинорам» и др.). Пестициды в зависимости *от фитопатогенного объекта, на который направлено их действие*, подразделяются на инсектициды (против насекомых), фунгициды (против микромицетов), акарициды (против клещей), нематициды (против круглых червей), родентициды (против грызунов) и гербициды (против сорных растений). Биопестициды с микробиологическим началом в основном представлены биоинсектицидами и биоакарицидами («Лепидоцид», «Битоксибациллин» и др.), а также биофунгицидами («Елена», «Алирин-Б» и др.). Зачастую, биопрепараты могут обладать комплексным действием (Петров, Чеботарь, 2002; Штерншис и др., 2004; Минаева и др., 2018). Микроорганизмы используются также для силосования растительных остатков («Лаксил-МС», «Биосил» и др.) (Коломиец, 2018).

Биопрепараты на основе микроорганизмов также можно классифицировать *по форме выпуска*. Наиболее распространены жидкие препараты («Лептоцид», «Биослип» и др.), представляющие собой культуральную жидкость микробов. Для их производства не требуется проведение дополнительных операций по очистке, но у них ограниченный срок хранения. Помимо этого, существуют порошкообразные («Биоверт»), таблетированные («Алирин-Б», ТАБ), пастообразные («Фитоспорин-М», ПС) и другие формы биопрепаратов. Их производство уже более энерго- и трудозатратно, но данные формуляции действующего компонента позволяют продлить срок годности и обеспечить различные технологии применения микробных

препаратов (Саламатова и др., 2010; Штерншис, 2012; Кожемяков и др., 2015; Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов..., 2022).

Биотехнология производства препаратов на основе микроорганизмов

Разработка биотехнологии производства микробных биопрепаратов начинается после отбора наиболее активных штамма или штаммов с требуемыми свойствами. Дальнейший технологический процесс в промышленных масштабах состоит из нескольких этапов: подбор питательных сред; подготовка посевного материала; отработка режимов ферментирования в биореакторах; выделение и очистка целевого продукта; разработка технологии получения препаративной формы (Новиков, 2014; Сулейманов, Сидоров, 2016; Новикова и др., 2017).

Компонентный состав питательной среды является одним из главных условий, влияющих на рост микроорганизмов и биосинтез ими различных БАВ. Не существует универсальной питательной среды, поэтому для разных видов микробов требуется ее индивидуальный подбор. В виду непостоянства состава натуральных питательных сред на биотехнологических производствах используют в основном полусинтетические, содержащие как соединения установленного состава (минеральные соли, углеводы и пр.), так и неопределенного (кукурузный экстракт, дрожжевой автолизат и пр.). Кроме того, экономически перспективным направлением считается разработка рецептур сред, содержащих в составе дешевые и доступные компоненты, в том числе непригодные для употребления в пищу (рыбная мука и пр.) (Link, Weuster-Botz, 2011; Ручай, 2014; Федорова и др., 2017).

В виду того, что в условиях производства культивирование микроорганизмов осуществляется в больших объемах, предварительно необходимо приготовить посевной материал. Инокулят (маточная, материнская, посевная культура) – это популяция микробных клеток, которую вносят в ферментационную среду. Для достижения высокого уровня клеточной биомассы в требуемой фазе роста микроорганизмов применяется последовательное пересевание исходной культуры. В конечном итоге доля посевного материала должна составлять от 1 до 10 % от объема ферментационной среды (Коростелева и др., 2006; Sood et al., 2011).

Одной из главных стадий в производстве биопрепаратов является получение максимума биомассы их компонентов за минимальное время культивирования с достижением максимального экономического эффекта. Поэтому для промышленной

инкубации микробов часто используют ферментационные установки – аппараты различного объема (от 0,5 л до 2 млн. л и более), в которых при контролируемых условиях культивируются микроорганизмы. А понятие «ферментация» включает в себя всю совокупность последовательных операций с момента внесения в стерильную питательную среду посевного материала до окончания процесса культивирования (Царенко и др., 2011; Машанов и др., 2015; Crater, Lievens, 2018).

Ферментация в биологических реакторах позволяет точнее регулировать условия инкубирования микроорганизмов, нежели это возможно сделать в колбах. В ферментаторах есть возможность контролировать не только температуру, но и скорость перемешивания среды и ее кислотность, концентрацию O_2 и CO_2 , степень аэрации и пр. (Сулейманов, Сидоров, 2016; Фирсова и др., 2019).

Существует много подходов к классификации ферментационных процессов. По агрегационному состоянию питательной среды выделяют *глубинные* (жидкофазные) и *поверхностные* (твердофазные) ферментации. По степени аэрации – *аэробные* (кислородные) и *анаэробные* (бескислородные). По отсутствию или наличию перемешивания – *статические* и *динамические*. По способу действия – *периодические* (загрузка и разгрузка ферментера происходят единоразово), *полупериодические* (в ходе ферментации добавляются соединения, но разгрузка биореактора единовременная) и *непрерывные* (свежая среда подается в ферментер, а культуральная жидкость выводится) (Блажевич, 2004; Свистунов, 2013).

По окончании процесса ферментации наступает стадия выделения и очистки целевого продукта. Если в качестве него выступает биомасса клеток микроорганизмов, то в данном случае чаще всего прибегают к осаждению, выпариванию или центрифугированию. Если же ферментация направлена на получение микробных метаболитов, то имеет значение, накапливаются ли они внутри клеток или выводятся в культуральную жидкость. В первом случае дополнительно требуется дезинтеграция клеток с последующей экстракцией, осаждением и пр. (Ногі, Unno, 2011; Красникова, 2017; Назаренко и др., 2019).

Если препаративной формой биопрепарата является культуральная жидкость, то дополнительные операции по выделению и очистке целевого продукта не требуются. Однако для продления срока годности в нее могут добавляться консерванты (бензоат натрия, сорбат калия и пр.). Формуляция препарата в виде

порошка предполагает высушивание биомассы клеток, например, с помощью лиофилизации. В данном случае готовой формой биопрепарата может быть микробный концентрат или его смесь с наполнителем (цеолитом, каолином и пр.). Широкое применение нашла также иммобилизация клеток микроорганизмов на носителях (хитин-хитозановых, торфе и пр.). Данные операции производятся для защиты действующих компонентов от неблагоприятных факторов среды и усиления эффективности готового препарата. Необходимость в таблетировании биопрепарата удлиняет технологическую цепочку, и на это требуется дополнительное оборудование (Акылбаева и др., 2010; Malusá et al., 2012; Ануарбекова и др., 2014; Новикова и др., 2017; Алферова и др., 2018; Колесников и др., 2019).

Работы по производству биопрепаратов необходимо осуществлять в асептических условиях с использованием стерильных питательных сред, посуды и пр. Готовые препараты должны соответствовать следующим показателям качества: установленному титру целевых культур, чистоте по микробиологическим показателям и уровню биологической активности. Однако в ходе испытаний зачастую выясняется, что не все биопрепараты соответствуют заявленным параметрам (Нугманова, 2017; Джалилов, 2018). Поэтому стабилизация целевых качеств биологических препаратов в ходе их производства является одной из главнейших задач, стоящей перед разработчиками биотехнологической продукции.

Биопрепараты на основе бацилл, применяемые в растениеводстве

Земцова В. О. и Грицкевич Е. Р. (2018) выделили четыре основных свойства бактерий рода *Bacillus*, которые делают их перспективными агентами для включения в состав микробных биопрепаратов. Среди них: продукция антимикробных соединений и токсичных веществ по отношению к вредителям сельского хозяйства; высокая выживаемость за счет способности к спорообразованию; принадлежность к типичным представителям нормофлоры почвы; безопасность для теплокровных животных и человека (за исключением видов *B. cereus* и *B. anthracis*).

Первое коммерческое бактериальное удобрение «Alinit» выпущено в Германии в 1897 году. В его основе использовали штамм почвенных бактерий *B. ellenbachensis*, предназначенный для усиления роста зерновых культур (Kilian et al., 2000; Borriss, 2017; Radhakrishnan et al., 2017).

Микробиологический контроль для защиты растений также впервые осуществили с применением бактерий рода *Bacillus*. Еще в 1901 году в Японии установили, что бактериальную болезнь шелкопрядов вызывает *B. sotto*. Через 10 лет после этого в Германии выделили из личинок мертвых мельничных огневок *B. thuringiensis*. Именно с этого началась история самого популярного и эффективного микробного инсектицида. В 1938 году во Франции запустили в производство первый в мире биоинсектицид на основе *B. thuringiensis* – «Sporine», а в середине XX века стали выпускать средство, базирующееся на данном виде бактерий, и в СССР под названием «Энтобактерин». В настоящее время биопрепараты на основе *B. thuringiensis* составляют более 70–90 % рынка биологических пестицидов (Milner, 1994; Штерншис и др., 2004; Ibrahim et al., 2010; Белоусова, 2019; Долженко, 2021).

Биофунгициды стали производиться значительно позже, чем инсектициды, их доля на рынке фунгицидов составляет порядка 1–5 %. В качестве действующего компонента биопрепаратов зачастую выступают бациллы, в основном вида *B. subtilis*. Известны зарубежные биопрепараты для защиты растений, содержащие данную бактерию («Serenade», «Subtilex», и др.) и эффективные против *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus* и прочих грибов. Однако на рынке представлены биофунгициды, содержащие и другие виды рода *Bacillus*. Например, в биопестициде «Ecoguard» в качестве активного компонента выбран штамм *B. licheniformis* SB3086, а в «GB34 Concentrate Biological Fungicide» – *B. pumilus* GB34 (Gardener, Fravel, 2002; Morton, Staub, 2008; Kumar et al., 2011; Долженко, Лаптиеv, 2021; Lahlali et al., 2022).

Биологические препараты, разрешенные к обороту на территории нашей страны перечислены в «Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов». На 2022 год в документе, содержащем перечень пестицидов, приведено порядка 50 микробных биопрепаратов, более половины из которых – на основе бацилл (таблица 1).

Таблица 1 – Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus* для растениеводства, разрешенные для применения на территории РФ

№	Название препарата	Форма выпуска	Действующий микроорганизм	Титр, КОЕ/мл (г)*
1	2	3	4	5
<i>Инсекто- и акарициды</i>				
1	Лепидобактерицид	Жидкость	<i>B. thuringiensis</i> , var. <i>kurstaki</i> Z-52	$\geq 10^{10}$
2	Лептоцид	Жидкость	<i>B. thuringiensis</i> , var. <i>Thuringiensis</i> B-501	$\geq 10^9$

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
3	Инсектобактерин	Порошок	<i>B. thuringiensis</i> В-82 + <i>B. subtilis</i> В-76	$\geq 10^9 + \geq 10^9$
4	Инсетим	Жидкость	<i>B. thuringiensis</i> , var. <i>Thuringiensis</i> ИПМ-1140	$\geq 2 \times 10^9$
5	Битоксибациллин	Порошок	<i>B. thuringiensis</i> , var. <i>Thuringiensis</i> 98	$\geq 2 \times 10^{10}$
6	Биослип БТ	Порошок	<i>B. thuringiensis</i>	$\geq 1 \times 10^{10}$
7	Биостоп	Жидкость	<i>B. thuringiensis</i> + <i>Streptomyces</i> sp. + <i>Beauveria bassiana</i>	$\geq 10^9 + 10^8 + 10^8$
<i>Фунгициды</i>				
1	Алирин-Б	Порошок Таблетки Жидкость	<i>B. subtilis</i> В-10 ВИЗР	$\geq 10^{11}$ $\geq 10^9$ $\geq 10^9$
2	Фитобактерин+	Порошок	<i>B. subtilis</i> В-76	$\geq 10^9$
3	Бисолбицид	Жидкость	<i>B. subtilis</i> BL01	$\geq 10^8$
4	Серенада АСО	Жидкость	<i>B. amyloliquefaciens</i> QST-713	$\geq 1 \times 10^9$
5	БФТИМ КС-2	Жидкость	<i>B. amyloliquefaciens</i> КС-2	1×10^9
6	Баксис	Жидкость	<i>B. subtilis</i> 63-Z	$\geq 10^9$
7	Бактерра	Порошок	<i>B. subtilis</i>	$\geq 10^9$
8	Витаплан	Порошок	<i>B. subtilis</i> ВКМ-В-2604D + <i>B. subtilis</i> ВКМ-В-2605D	$10^{10} + 10^{10}$
9	Гамаир	Жидкость Порошок Таблетки	<i>B. subtilis</i> М-22 ВИЗР	10^{10} $\geq 10^{11}$ $\geq 10^9$
10	Инсектобактерин	Порошок	<i>B. thuringiensis</i> В-82 + <i>B. subtilis</i> В-76	$\geq 10^9 + \geq 10^9$
11	Метабактерин	Порошок	<i>Methylobacterium extorquens</i> NVD ВКМ В-2879 D + Валидамицин <i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. «limoneus» ВКПМ АС-1966 + <i>B. subtilis</i> ВКПМ В-2918 ИПМ-215	$\geq 10^{10} + 0,5$ г/кг + $\geq 10^{10}$
12	Оргамика С	Жидкость	<i>B. amyloliquefaciens</i> OPS-32	5×10^9
13	Респекта	Жидкость	<i>B. amyloliquefaciens</i> + <i>P. aureofaciens</i>	$\geq 5 \times 10^9 +$ 5×10^8
14	Фитоспорин-М	Жидкость Паста Порошок	<i>B. subtilis</i> 26 Д	$\geq 10^9$ $\geq 10^8$ $\geq 2 \times 10^9$
15	Бактофорт	Жидкость	<i>B. subtilis</i> В-2918 + <i>B. amyloliquefaciens</i> ИМВ В-7100	$\geq 2,5 \times 10^9 +$ $\geq 2,5 \times 10^9$
16	Бактофит	Порошок Жидкость	<i>B. subtilis</i> ИПМ 215	$\geq 2 \times 10^9$ $\geq 2 \times 10^9$
17	БисолбиСан	Жидкость	<i>B. subtilis</i> Ч-13	$\geq 10^8$
18	Споробактерин	Порошок	<i>B. subtilis</i> + <i>T. viride</i> 4097	$\geq 10^8 + \geq 10^6$

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
19	Фитоспорин-АС	Жидкость	<i>B. subtilis</i> 26 Д + <i>B. subtilis</i> 1К + <i>B. subtilis</i> 3К + <i>B. subtilis</i> 3Н + <i>B. subtilis</i> 8К + <i>B. subtilis</i> 7К + <i>B. subtilis</i> 3/28 + <i>T. reesei</i> 4К + <i>T. atroviride</i> 10К + <i>T. longibrachiatum</i> 9К	$\geq 10^8 + \geq 10^5 + \geq 10^5$
20	Бинал	Жидкость	<i>B. subtilis</i> В1018 + <i>T. viride</i> F2001	$10^7 + 10^6$

*: КОЕ – колониеобразующие единицы

Большинство биопестицидов на основе бацилл представлено в жидкой препаративной форме. Инсектициды содержат штаммы вида *B. thuringiensis*, а фунгициды – *B. subtilis*, реже – *B. amyloliquefaciens*. Моноштаммовыми являются 17 препаратов из 27, а остальные – полиштаммовые. Многокомпонентные биопрепараты содержат консорциумы бацилл с бактериями (*Pseudomonas* и др.) и грибами (*Trichoderma* и др.), а также микробные метаболиты (валидамицин). Финальный титр средств защиты растений колеблется от 10^7 до 10^{11} КОЕ/г(мл).

Отечественные бациллярные биопрепараты предполагают разнообразные способы применения: опрыскивание в разные фазы вегетационного периода, протравливание семян, поливы и пр. Их действие направлено на борьбу с разнообразными фитопатогенными организмами для зерновых, плодово-ягодных, овощных, цветочных и древесных культур. Инсектициды на основе бацилл эффективны в отношении пилильщиков, шелкопряда, пяденицы, колорадского жука и др., а фунгициды используются против *Phytophthora*, *Alternaria*, *Fusarium* и др.

Разработка и применение микробных биопрепаратов для растениеводства начались еще на рубеже XIX–XX вв., однако их доля на рынке все еще не превышает 5 % (Lahlali et al., 2022). Это обусловлено высокими трудо- и энергозатратами необходимыми для создания и регистрации нового продукта, а также недоверием к биологическим средствам защиты растений со стороны непосредственных потребителей (владельцы хозяйств, частные фермеры и др.). Однако вектор на экологизацию сельского хозяйства установлен во многих развитых и развивающихся странах мира, поэтому доля биопрепаратов на основе микроорганизмов будет только увеличиваться. В виду того, что непрерывное применение одних и тех же биопестицидов может привести к возникновению новых популяций возбудителей болезней растений, необходимо разрабатывать новые высокоэффективные биопрепараты для расширения их линейки на рынке.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования выбрали 9 штаммов бактерий рода *Bacillus* из коллекции ИЦ «Промбиотех» (таблица 2), где и провели лабораторные испытания. Часть из них депонировали во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) и в Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства (RCAM). Штаммы *B. toyonensis* 15, *B. pumilus* 16, *B. pumilus* 4 и *B. pumilus* 7 запатентовали в Федеральном институте промышленной собственности (ФИПС) (Пат. РФ № 2693439, Пат. РФ № 2694522, Пат. РФ № 2797825, Пат. РФ № 2797699 соответственно).

Таблица 2 – Штаммы *Bacillus* spp., использованные для проведения исследований

Штаммы	Номер в авторской коллекции	Номер в российской коллекции
<i>B. pumilus</i>	4	RCAM05516
<i>B. pumilus</i>	5	–
<i>B. pumilus</i>	6	–
<i>B. pumilus</i>	7	RCAM05517
<i>B. pumilus</i>	16	ВКПМ В-13250
<i>B. toyonensis</i>	15	ВКПМ В-13249
<i>B. licheniformis</i>	8	–
<i>B. licheniformis</i>	9	RCAM05965
<i>B. licheniformis</i>	10	–

В качестве тест-культур для определения антагонистической активности штаммов *Bacillus* spp. использовали 4 штамма грибных фитопатогенов (таблица 3). Штамм *P. infestans* получили из коллекции микроорганизмов «Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии», а остальные микроскопические грибы из коллекции ИЦ «Промбиотех».

Таблица 3 – Штаммы, использованные в качестве тест-культур

Штамм	Источник выделения
<i>P. infestans</i>	пораженный картофель
<i>Alternaria</i> sp.	инфицированные семена гречихи
<i>Penicillium</i> sp.	инфицированные семена рапса
<i>Aspergillus</i> sp.	инфицированные семена рапса

Идентификацию грибов до рода произвели на основании микроскопических исследований (рисунок 2). Для штамма *Penicillium sp.* зафиксировали способность к флуоресценции в ультрафиолетовом свете.

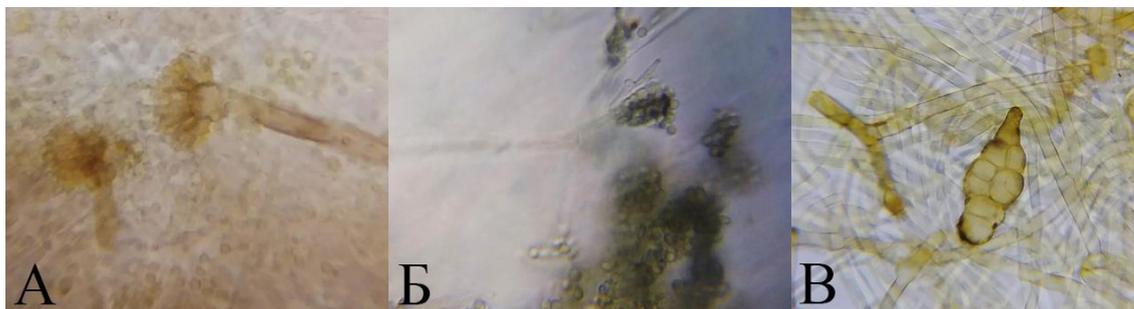


Рисунок 2 – Микроскопические препараты тест-культур: А – *Aspergillus sp.*, Б – *Penicillium sp.*, В – *Alternaria sp.* (× 1000)

Антагонистическую активность прототипа биопрепарата проверили также на базе Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСХМ). В данном исследовании использовали следующие тест-культуры: *F. solani*, *Pythium sp.*, *A. niger*, *A. solani*, *F. graminearum*, *A. tenuissima*, *Penicillium sp. 1*, *F. sporotrichioides*, *Botrytis sp.*, *Penicillium sp. 2* и *A. brassicae*.

Бактериальную композицию из прототипа биопрепарата также проверили на биосовместимость со штаммами из других микробных средств для защиты растений. Провели эксперименты со следующими культурами: *B. subtilis* В-10 («Алирин-Б»), *B. subtilis* 26Д («Фитоспорин М»), *B. subtilis* Ч-13 («Экстрасол»), *B. thuringiensis var. kurstaki* («Лепидоцид»), *Metarhizium anisopliae* («Метаризин»), *T. viride* 471 («Триходерма вериде»), *T. harzianum* Г 30 ВИЗР («Трихоцин») и *T. harzianum* 18 ВИЗР («Глиокладин»).

Для прототипа препарата также установили возможность совместного использования с химическими пестицидами. В исследовании использовали протравители семян в виде концентратов суспензии (КС) – «Престиж», «Инстиво», «Баритон», «Винцит» и «Максим».

Эффективность опытного препарата при проращивании растений определили с семенами, полученными из банка АНИИСХ ФАНЦА. В работе задействовали следующие культуры: рапс (сорт «АНИИСХ 4», предварительно протравленный инсектицидом «Круйзер»), овес (сорт «Корифей»), гречиха (сорт «Дизайн») и подсолнечник (сорт «Кулундинский 1»).

2.2. Посуда, питательные среды и реактивы

Стеклопосуду (чашки Петри, пробирки, пр.) и другие лабораторные материалы подготавливали и использовали в соответствии с ГОСТ ISO 7218-2015. Стерильную посуду хранили не более 30 суток (МР 2.3.2.2327-08).

Питательные среды для микробиологических исследований готовили в стеклянной посуде и хранили при комнатной температуре не более 3 суток и при температуре около 5 °С не более одного месяца (ГОСТ 10444.1-84). В работе применяли следующие питательные среды и реактивы:

1. *L-среда (г/л)*: дрожжевой экстракт – 5,0, пептон – 15,0, NaCl – 5,0, вода дистиллированная – 1,0 л (рН=6,8±0,2). Для приготовления твердой среды добавляли 15,0 г агара на 1,0 л воды (Бойко, Яценко, 2017).

2. *Среда Эндо (г/л)*: 40,0 г сухой среды вносили в 1,0 л холодной воды. Смесь тщательно перемешивали и кипятили, не допуская пригорания. После фильтровали и разливали по стерильным чашкам Петри. Эту среду использовали для проверки наличия в пробах БГКП (ГОСТ 28085-2013).

3. *Физиологический раствор*: 9,0 г NaCl растворяли в 1,0 л дистиллированной воды. Разливали в пробирки по 9,0 мл, закрывали пробками и стерилизовали.

4. *Питательный бульон*: 35,0 г сухой готовой среды внесли в 1,0 л воды. Для приготовления твердой среды добавляли 15,0 г агара на 1,0 л воды.

5. *УЕР-среда (г/л)*: пептон – 10,0, дрожжевой экстракт – 10,0, NaCl – 5,0, глюкоза – 20,0, вода дистиллированная – 1,0 л (рН=6,8±0,2). Для приготовления твердой среды добавляли 15,0 г агара на 1,0 л воды.

6. *Защитная среда (г/л)*: желатин – 25,0, сахароза – 100,0, вода дистиллированная – 1,0 л. Эту среду использовали в качестве криопротекторной для лиофилизации бактериальной биомассы (Грачева, Осин, 2016).

7. *Картофельно-сахарозный агар (КСА) (г/л)*: 200,0 г очищенного картофеля кипятили в течение 30–40 минут в 1,0 л воды. Далее процеживали через марлю и добавляли 20,0 г сахарозы и 15,0 г агара, воду доводили до метки (рН=6,8±0,2).

8. *Агар картофельный с декстрозой (PDA)*: 39,0 г сухой среды растворяли в 1,0 л дистиллированной воды. Доводили до кипения и стерилизовали.

9. *Желточный агар*: готовили на основе L-агара с добавлением к нему, охлажденному после стерилизации до 55 °С, желточной смеси в объеме 150,0 мл на

1,0 л среды. Желточную смесь готовили следующим образом – 1 желток размешивали в 200 мл стерильного физиологического раствора (ОФС.1.7.2.0012.15).

10. 20 %-й *раствор NaOH*: готовили в количестве 400 мл для 1 ферментации в биологическом реакторе на 15 л. 80 г NaOH доводили водой до метки.

Все перечисленные среды (кроме Эндо) и реактивы, а также колбы с дистиллированной водой стерилизовали в автоклаве. После стерилизации среды выдерживали в термостате при температуре 30 °С в течение 24 часов для подтверждения микробиологической чистоты (Асташкина, 2015).

Культивирование бацилл в ферментационной установке на 15 л осуществляли на ферментативной питательной среде. *Состав* (г/л): меласса – 25,0, кукурузный экстракт – 12,5, дрожжевой экстракт – 1,0, триптон – 0,5, MgSO₄ – 0,25, MnSO₄ – 0,03, CoCl₂ – 0,046, CaCl₂ – 1, солевой сток – 10 мкл, воды – 1,0 л. *Рецепт солевого стока* (г/л): CuSO₄ – 10,0 г, FeSO₄ – 10,0 г, воды – 1,0 л (Джавахиya и др., 2018). В качестве пеногасителя использовали лапрол (Дербышев и др., 2012).

2.3. Микробиологические методы исследования

Стерилизация

В работе использовали химические и физические методы стерилизации. Фламбированию подвергали мелкие металлические лабораторные предметы (сверла, петли и др.) непосредственно перед использованием. Перед этим предметы проходили химическую обработку 96 %-м раствором этанола. В пламени горелки также обжигали горлышки пробирок, колб и пр., а также ватно-марлевые пробки во время посевов и розлива питательных сред (Горельникова, 2018).

Стерилизации в автоклаве подвергали питательные среды, реактивы, расходные материалы и посуда, а также отработанный материал (ГОСТ ISO 7218-2015). При 1 атм. в течение 12–20 минут стерилизовали питательные среды, при 1,5 атм. в течение 90 минут стерилизовали посуду и металлические предметы, при 2,0 атм. в течение 30–60 минут автоклавировали отработанный материал.

В сухожаровом шкафу «Binder FD 115» осуществляли стерилизацию горячим воздухом. Ей подвергали колбы для отбора проб, емкости для центрифугирования, контейнеры для лиофилизации и др. в течение 3 часов при 160 °С.

Лабораторные помещения обрабатывались дезинфицирующими растворами. А также УФ-лампами (СП 1.3.2322-08).

Методы классических посевов

Для определения численности микроорганизмов предварительно применяли метод десятикратных разведений по МР 2.3.2.2327-08. Далее из необходимых разведений осуществляли поверхностные посевы в количестве 0,1 мл на агаризованные среды. После этого внесенный объем быстро распределяли по питательной среде стерильным шпателем Дригальского (Нетрусов и др., 2005).

Посев в жидкие питательные среды с соблюдением всех правил асептики осуществляли либо с помощью бактериологической петли, либо с помощью пипеток (Лысак, Желдакова, 2002).

Условия культивирования и учет численности микроорганизмов

Штаммы рода *Bacillus* на питательном бульоне культивировали в шейкер-инкубаторе «Innova 44» со скоростью вращения 250 оборотов в минуту, при температуре 37 °С в течение 18–24 часов. Пробы с бациллами на агаризованных питательных средах культивировали в термостате «Binder VD 115» при 37 °С в течение 18–24 часов. При этом чашки переворачивали дном кверху.

После культивирования считали количество колониеобразующих единиц (КОЕ), выросших на чашках Петри. Для этого отбирали чашки, на которых выросло не менее 15, но и не более 300 колоний. Выросшие колонии на чашках считали на полуавтоматическом счетчике колоний «Scan 100».

Учет численности микроорганизмов (X) производили по следующей формуле:

$$X = \frac{N \times P}{V}, (1)$$

где N – среднеарифметическое число выросших колоний; P – выбранное разведение; V – объем разведения, мл (ГОСТ 26670-91).

За окончательный результат испытания взяли среднее арифметическое значение параллельных определений. Рост бактерий на жидких питательных средах считали положительным в пробах, где отмечали помутнение среды.

Штаммы грибов в опыте и контроле культивировали на твердых средах (УЕР, питательном агаре и КСА) в течение 10–14 дней. Чашки с *P. infestans* инкубировали при температуре 20±2 °С, а с остальными культурами – при 22–25 °С.

Микроскопия

Для изучения исследуемых микроорганизмов в поле зрения микроскопа «Альтами БИО 8» готовили как фиксированные, так и живые микропрепараты. Окрашивание мазка простым методом производили с использованием только генцианвиолета. Также делали препараты по Граму. Живые микроорганизмы изучали, готовя препарат «раздавленная капля». Микроскопирование в основном осуществляли при увеличении $\times 1000$ с иммерсией (ГОСТ ISO 7218-2015).

Установление культурально-физиологических и молекулярно-биохимических свойств бактерий

Способность к росту в анаэробных условиях проверяли методом «укола» петлей в пробирку со столбиком агаризованной среды (Vos et al., 2009). Для теста на лецитиназу культуру засеивали на желточный агар. После инкубирования оценивали наличие или отсутствие зоны лизиса вокруг колоний (Васильев и др., 2013).

Для первичной биохимической идентификации использовали тест-систему Microgen BACILLUS-ID, состоящую из 23 лунок с разными субстратами и контрольной лунки. Результаты оценивали по изменению цвета относительно контроля. Анализ результатов осуществляли с помощью программы Microgen Identification System. Идентификацию проводили в соответствии с инструкцией.

Отобранные штаммы бацилл также анализировали с использованием тест-системы The Biolog Gen III Microplate в Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства (RCAM, ВКСМ). Фенотипическую идентификацию производили по более чем 90 признакам.

Генетическую идентификацию некоторых штаммов рода *Bacillus* проводили в ВКПМ (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов). Видовую принадлежность ризосферных штаммов определяли с помощью анализа генов, кодирующих 16S РНК и ПЦР анализа.

Методы определения типа взаимоотношений микроорганизмов

Метод перпендикулярных штрихов. На поверхности питательной среды в чашке Петри засеивали вертикальным штрихом культуру изучаемого штамма бацилл и инкубировали при оптимальных условиях. Далее перпендикулярно от края чашки к штриху выросшей культуры подсеивали горизонтальным штрихом культуру тест-штамма, едва достигая штриха первого штамма. Чашку повторно культивировали

при тех же условиях. Антагонистический эффект или биосовместимость у испытуемых штаммов бактерий определяли по длине зоны ингибирования (или ее отсутствию) тест-штамма на границе со штрихом вертикального штамма.

Метод лунок. Штамм-тест культуры засевали газоном на L-среду. Далее на ее поверхности пробойником вырезали лунки диаметром около 7 мм и заполняли ее 30 мкл культуральной жидкости изучаемого штамма бацилл. Чашки термостатировали, не переворачивая дном кверху, чтобы избежать распространения культуральной жидкости из лунок на поверхность среды. После инкубации измеряли зону блокирования роста тест-культуры вокруг лунки или отмечали ее отсутствие.

Метод блоков. Бацилл засевали в опытные чашки поверхностным газоном. Блоки (диаметром 6–7 мм) вырезали стерильным сверлом из тест-культур микромицетов и устанавливали в центре чашки. В контроле культивировали только грибы. В ходе культивирования в течение 2-х недель периодически производили измерения колоний грибов в опыте и контроле (Ирkitова, Каган, 2012).

Метод параллельных штрихов. В центре чашки с питательной средой устанавливали блок с микромицетом. Далее на расстоянии нескольких сантиметров от центра проводили 2 вертикальных штриха бацилл из прототипа биопрепарата. В качестве контроля использовали чашку, в которой не проводили штрихи бактерий, а только помещали блок с микромицетами. В ходе культивирования в течение 2-х недель периодически производили измерения колоний грибов в опыте и контроле.

Метод колодцев. В охлажденной твердой среде (200 мл) растворяли суспензию тест-культуры со смыва (100 мкл), а затем разливали по чашкам Петри. После застывания среды в опытных чашках при помощи микробиологического пробойника делали колодцы и вносили в них 100 мкл рабочего раствора опытного биопрепарата. В качестве контроля использовали чашки только с тест-культурой. В ходе культивирования в течение 10 суток отслеживали особенности роста микроорганизмов в опытных и контрольных чашках (Чеботарь и др., 2015).

2.4. Условия ферментации, концентрирования и лиофилизации

Подготовка ферментеров к работе

Подготовка ферментера к работе включала стерилизацию и проверку исправности его составных частей: проверка на работоспособность всех клапанов,

тэнов, вентилях, предохранительных клапанов, помпы охлаждения и составных частей ферментера: рубашки, закольных отверстий, проходимости барботёра, оборотов разноуровневой мешалки. Проверка на пропускную способность, опрессовывание и чистоту отходящих и подходящих магистралей (МУ 1.3.2411–08).

Питательную среду стерилизовали в 15 л биореакторе при температуре 121–127 °С и давлении 1,3–1,5 атм. После стерилизации среды биореактор охлаждали до 37 °С и стерильно отбирали из ферментера пробу для проведения микробиологического контроля чистоты (Меледина и др., 2017). Перед засевом бацилл в ферментере устанавливали следующие параметры: расход воздуха – 300 л/мин; давление – 0,3 бара; содержание растворенного кислорода в питательной среде – 50 %, температура ферментации – 37 °С, рН – 6,8.

Культивирование бактерий в ферментационных установках

Содержимое посевных колб в стерильных условиях (в ламинарном боксе) в пламени спиртовки сливали в стерильную колбу для посева с шлангом для передачи посевного материала в ферментер. Инокуляцию ферментера осуществляли при помощи стерильной посевной иглы, соединенной силиконовой трубкой с посевной колбой, содержащей инокулят бацилл, через посевной штуцер аппарата. В асептических условиях посевной материал передавался из рабочей колбы в ферментер. Для 15 л ферментера готовили 10 литров среды. Количество посевного материала составляло 10 % от рабочего объема ферментера (Гореликова, 2004).

После засева ферментера температуру поддерживали на уровне 37 °С, а концентрацию растворенного кислорода – на уровне 50 %. Перемешивали со скоростью 250 об/мин. В момент сильного вспенивания добавляли лапрол.

Время ферментации бацилл составляло 18–24 часа. В ходе культивирования несколько раз производили стерильный отбор проб для проведения наблюдений за развитием культуры бактерий, ее морфологическим состоянием и отсутствием посторонней микрофлоры, а также измерения оптической плотности культуральной жидкости (ОП). ОП определяли на спектрофотометре Shimadzu UV–1280 в фотометрическом режиме при 490 нм, разводя пробу в 10 раз (Луканин, 2016).

Процесс ферментации вели до тех пор, пока большая часть клеток бацилл не выпадала в споры, и оптическая плотность не переставала меняться. После этого культуральную жидкость подавали на центрифугу (Джавахи и др., 2018).

Концентрирование

Целевым продуктом ферментации являлась биомасса бактерий, поэтому ее концентрировали путем центрифугирования (Машанов и др., 2015). Процесс вели на центрифуге SIGMA 4-16S/KS в течение 20 минут при 4100 об/мин. В асептических условиях биомассу бактерий смешивали с защитной средой и замораживали.

Лиофилизация

После заморозки при температуре – 25 °С в течение не менее 12 ч лотки переносили в лиофилизатор Epsilon 1-4 LSCplus. Программа работы сублиматора была автоматической и состояла из первичной заморозки (– 40 °С), первичной сушки (до 20 °С) и вторичной сушки (при 25 °С). Полный цикл лиофилизации занимал порядка 2-х суток. Полученные концентраты составляли основу опытного биопрепарата.

2.5. Установление эффективности прототипа биопрепарата при протравливании семян

Эффективность опытного препарата в лабораторных условиях устанавливали с использованием методов влажных камер и рулонов. Испытания в полевых условиях проводились на мелких делянках.

Анализ семян во влажной камере. Для проращивания семян во влажной камере применяли стерильные чашки Петри или лотки. На дно чашек помещали фильтровальную бумагу или вату, а далее увлажняли стерильной водой. Опытные семена, предварительно протравленные с помощью рабочего раствора прототипа биопрепарата (из расчета 10 л/т), раскладывали на ложе с помощью пинцета на расстоянии около 1 см друг от друга. Контрольные семена ничем не обрабатывали, исследование проводили в 4 повторностях. Закрытые чашки Петри или лотки с заложенными в них семенами помещали в термостат для проращивания на 5–7 дней при температуре 22 °С – 25 °С. По истечении срока оценивали степень инфицированности семян и другие физиологические показатели (всхожесть, длину проростков, корней).

Анализ семян в рулонах фильтровальной бумаги. Фильтровальную бумагу с размерами 12 × 57 см увлажняли до полной влагоемкости. Далее на расстоянии в 2 см от верхнего и боковых краев раскладывали ровно семена с интервалом в 1 см

между друг другом в количестве 50 штук. Затем семена накрывали тонкой полоской увлажненной фильтровальной бумаги (2 × 59 см), а поверх нее накладывали полоску полиэтилена с такими же размерами. Рулоны скручивали и ставили вертикально в стаканы с небольшим количеством воды и помещали в термостат при температуре 22 °С – 25 °С. При этом опытные семена предварительно обрабатывались рабочим раствором прототипа биопрепарата, контрольные семена не обрабатывались ничем. Опыт проводили в 4 повторностях. Оценивали такие показатели, как всхожесть, инфицированность и длина корней и ростков (ГОСТ 12038-84, ГОСТ 12044-93).

Деляночные испытания. Полевые испытания для установления эффективности опытного биопрепарата в посевах рапса, овса и гречихи провели на опытном поле ФГБНУ «ФАНЦА» вблизи города Барнаула, а подсолнечника – в Первомайском районе Алтайского края в хозяйстве «АгроУспех». В мае 2021–2022 гг. осуществили посев протравленных прототипом биопрепарата семян (опытных) и контрольных (без обработки) в 4-х кратной повторности.

С семенами рапса, овса и гречихи использовалась сеялка СН-16, размещение вариантов было систематическое, в один ярус, площадь элементарной делянки – 50 м². Подсолнечник засевали с помощью сеялки HORSCH Maestro CC рядами.

Приготовление рабочего раствора прототипа биопрепарата и обработку семян методом мокрого протравливания проводили в день посева. Рабочий раствор готовился из расчёта 10 л/т семян. На каждой делянке рапса, овса и гречихи изучали по 4 случайных участка с площадью 0,25 м². На рядах подсолнечника отмечали экспериментальные площадки по 10 м в длину. Для выбранных участков после уборки и сушки растений (в августе-сентябре) оценивали разницу между биометрическими показателями (высота растения, масса зерна с растения, биологической урожайностью и пр.) в опыте и контроле (Литвинов, 2011).

2.6. Погодные условия полевого испытания

Полевой эксперимент проводился на полях и делянках АНИИСХ ФАНЦА в 2021–2022 гг. в Алтайском крае (близ города Барнаула и в Первомайском районе). Климат региона умеренный и резко континентальный. Вегетационный период 160–170 дней. Преобладающие почвы – черноземы (<https://clck.ru/33Q4Ns>, 2023).

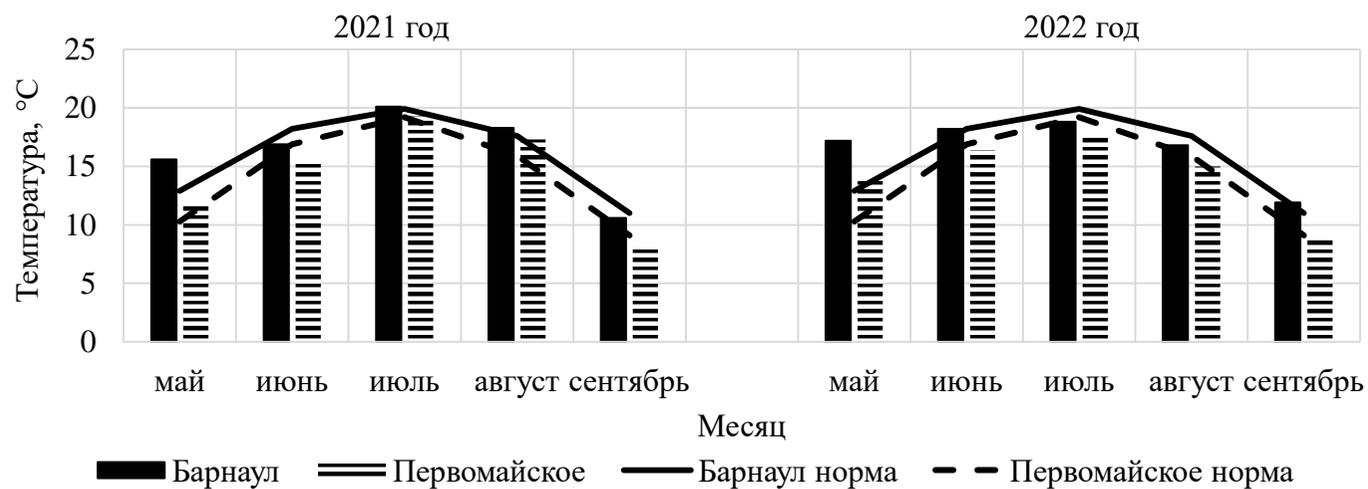


Рисунок 3 – Среднемесячная температура воздуха за полевой сезон 2021–2022 гг. на исследуемых территориях

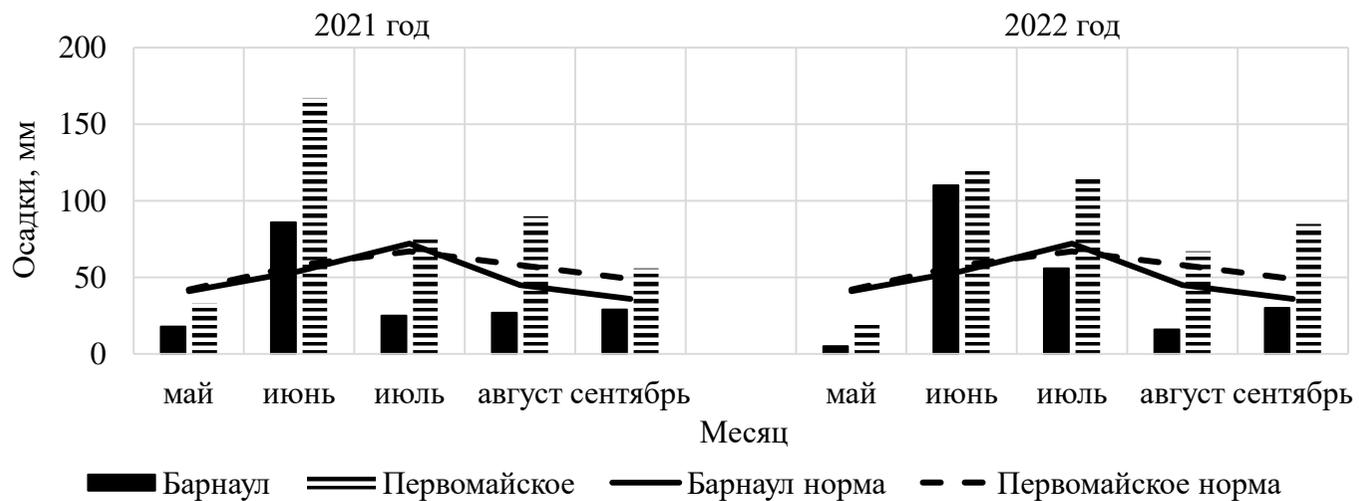


Рисунок 4 – Сумма осадков за полевой сезон 2021–2022 гг. на исследуемых территориях

В соответствии с информацией о погоде, полученной с метеорологических станций Барнаула и Первомайского, среднемесячная температура в полевой сезон в исследуемые годы максимально отличалась от нормы в мае 2022 года в Барнауле на +4,3 °С. Данное значение оказалось рекордным (рисунок 3).

Количество осадков в мае на обеих территориях в 2021–2022 гг. было ниже нормы. Июнь оказался месяцем с самым большим количеством осадков. При этом в остальные месяцы в Барнауле отмечались выпадение осадков в количестве ниже нормальных значений, а в Первомайском районе – наоборот (рисунок 4).

В целом, наиболее жарким и засушливым оказался май на обеих территориях Алтайского края. Недостаток осадков отмечался и в другие месяцы в Барнауле (кроме июня), а в Первомайском районе зафиксировали повышение сумм выпадения осадков.

2.7. Математическая обработка данных

Обработку полученных результатов производили в программе Microsoft Excel – 2020. Для числовых значений нашли среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (m), которое является наиболее важным статистическим показателем в микробиологических исследованиях. Среднеквадратичное отклонение отражает среднюю изменчивость (разброс, вариацию) значений переменной вокруг значения их средней арифметической.

$$m = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1} p}, \quad (2)$$

где $(x-\bar{x})^2$ – квадраты отклонения индивидуальных значений признака от средней величины; p – число случаев (частоты); n – численность совокупности.

Стандартное отклонение тем больше, чем сильнее варьирует признак, и уменьшается при слабом варьировании (Андрюков, Тимченко, 2013). Среднеквадратичное отклонение позволяет дать абсолютную оценку мере разбросанности полученных значений для того, чтобы установить, насколько она велика относительно этих значений, требуется относительный показатель. Для этой цели определили коэффициент вариации (v):

$$v = \frac{m}{M} \times 100 \%, \quad (3)$$

где m – стандартное отклонение; M – средняя величина.

Считается, что, если коэффициент вариации меньше 10 %, то степень разбросанности данных – незначительная, от 10 % до 20 % – средняя, больше 20 % и меньше или равно 33% – значительная. Для всех случаев, когда значение коэффициента вариации не превышает 33 % – совокупность считается однородной, а если больше 33 %, то – неоднородной (Андрюков, Тимченко, 2015).

Для установления коэффициента корреляции (*Correl*) при подборе питательной среды для посевного материала использовали следующую формулу:

$$Correl = \frac{\sum(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum(x-\bar{x})^2(y-\bar{y})^2}}, \quad (4)$$

где $(x-\bar{x})$ – отклонение индивидуальных значений одного признака от средней величины, а $(y-\bar{y})$ – отклонение индивидуальных значений другого признака от средней величины.

Для определения силы корреляции использовали следующую шкалу: если $0,9 < |Correl| < 1,0$, то связь очень сильная; $0,7 < |Correl| < 0,9$ – сильная; $0,5 < |Correl| < 0,7$ – средней силы; $0,3 < |Correl| < 0,5$ – умеренная; $0,1 < |Correl| < 0,3$ – слабая. Если коэффициент ниже 0,1, то связь фактически отсутствует (Андреева, Волков, 2013).

При оценке антагонистической активности опытного биопрепарата площадь мицелия грибов установили по формуле площади эллипса (S):

$$S = \pi \times R \times r, \quad (5)$$

где R – большая полуось; r – малая полуось.

Результаты по определению антагонистического действия прототипа биопрепарата и его биосовместимости с микромицетами с помощью метода параллельных штрихов представили через показатель подавления роста (A):

$$A = \frac{Sk - So}{Sk} \times 100 \%, \quad (6)$$

где Sk – площадь мицелия микромицета в контроле; So – площадь мицелия микромицета в опыте.

Для установления существенности отклонений между контрольными и опытными значениями в случае определения эффективности опытного биопрепарата при протравливании семян использовали наименьшую существенную разность для 5 %-ого уровня значимости (HCP_{05}):

$$HCP_{05} = t_{0,5} \times S_d, \quad (7)$$

где t_{05} – критерий Стьюдента для 5 %-ого уровня значимости; S_d – ошибка разности между выборочными средними, которую установили по следующей формуле:

$$S_d = \sqrt{Sx_1^2 + Sx_2^2}, (8)$$

где Sx_1^2 – квадрат ошибки средней арифметической контрольных значений; Sx_2^2 – квадрат ошибки средней арифметической опытных значений.

Ошибку средней арифметической установили по формуле:

$$Sx = \frac{m}{\sqrt{n}}, (9)$$

где m – стандартное отклонение; n – количество измерений.

Если фактическая разница между опытом и контролем оказалась больше HCP_{05} , то различия между вариантами посчитали существенными (Рязанова и др., 2013).

Для овса определили также общую кустистость (K) по следующей формуле:

$$K = \frac{C}{D}, (10)$$

где C – общее количество стеблей на 1 м², шт.; D – общее количество растений на 1 м², шт. (Серёгин, Скрыбин, 2009).

Биологическую урожайность (Y) установили по следующей формуле:

$$Y = E \times V, (11)$$

где E – среднее количество растений (шт.) на единице площади, а V – средний вес семян с одного растения, г.

Расчет приблизительного экономического эффекта (Ee) от применения опытного биопрепарата произвели по следующей формуле:

$$Ee = (Y_o - Y_k) \times C_r, (12)$$

где Y_o – биологическая урожайность в опыте, г/м², Y_k – биологическая урожайность в контроле, г/м², C_r – цена реализации сельскохозяйственной культуры, руб.

Расчетную ресурсоотдачу или экономическую эффективность опытного биопрепарата (Re) установили по следующей формуле:

$$Re = Ee/Z, (13)$$

где Ee – экономический эффект, руб./м², а Z – затраты на приобретение биопрепарата, руб. (Борисюк и др., 2017).

ГЛАВА 3. ПРИРОДНЫЕ БАКТЕРИИ РОДА *BACILLUS*

3.1. Выделение ризосферных штаммов *Bacillus* spp.

Новые природные штаммы р. *Bacillus* выделили из ризосферы растений Алтайского края. Всего отобрали 107 образцов различных культур. Для выделения разработали следующую схему эксперимента (Irkítova et al., 2021) (рисунок 5):

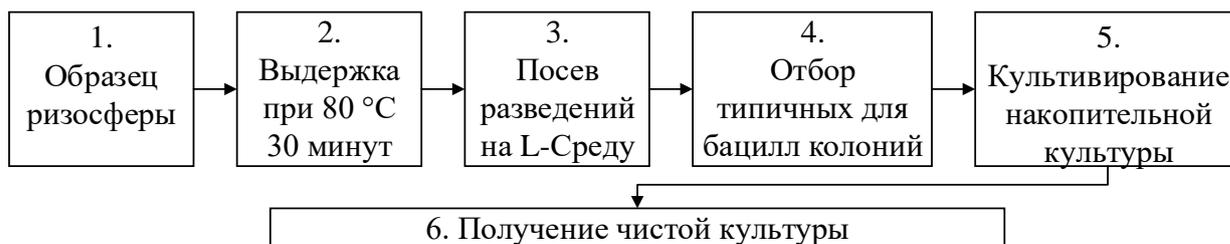


Рисунок 5 – Схема выделения и идентификации штаммов ризосферных микроорганизмов

Согласно определителю Берджи (Vos et al., 2009), к роду *Bacillus* относятся в основном аэробные грамположительные палочки с различной морфологией колоний, образующие эндоспores и проявляющие положительную реакцию на каталазу. В соответствии с этими критериями по выше представленной схеме выделили и довели до чистой культуры 33 штамма бацилл.

Несмотря на то, что большинство видов р. *Bacillus* являются безопасными для человека и животных (Logan, Vos, 2015), с целью исключения одного из факторов патогенности выделенных штаммов их дополнительно протестировали на лецитиназу (Морозова, Мирзоян, 2014). Для этого каждую культуру засеяли на желточный агар и прокультивировали 24 часа (ОФС.1.7.2.0012.15). У 76 % штаммов (25 из 33) отметили зоны просветления возле растущей культуры, что указывало на продукцию лецитиназы данными штаммами. Исходя из полученных данных для дальнейших исследований отобрали 8 ризосферных штаммов бацилл (таблица 4).

Таблица 4 – Источники выделения использованных для дальнейших исследований штаммов *Bacillus*

№ образца	Наименование растения
4	Подсолнечник однолетний – <i>Helianthus annuus</i> L.
5	Цикорий обыкновенный – <i>Cichorium intybus</i> L.
28	Икотник серо-зеленый – <i>Berteroa incana</i> (L.) DC.
29	Лютик многоцветковый – <i>Ranunculus polyanthemos</i> L.
30	Крапива жгучая – <i>Urtica urens</i> L.
31	Щавель кислый – <i>Rumex acetosa</i> L.
32	Одуванчик лекарственный – <i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg.
33	Чистотел большой – <i>Chelidonium majus</i> L.

Для выбранных штаммов рода *Bacillus* в основном характерны округлые колонии, размер которых не превышает 2–3 мм, матовые, молочно-белого цвета с морщинистой поверхностью, не врастающие в среду (рисунок 6, А). Один из штаммов (из образца № 5) характеризуется ростом в виде выпуклых, серо-белых округлых колоний с гладкой восковой поверхностью, не врастает в агар (рисунок 6, Б).

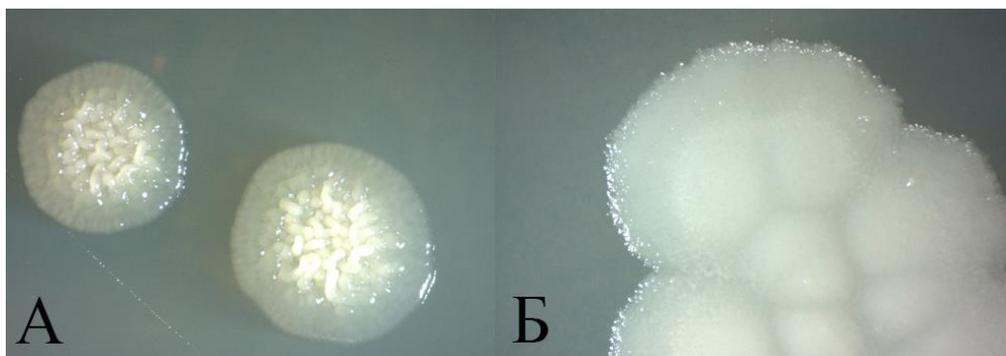


Рисунок 6 – Морфология колоний некоторых отобранных штаммов бацилл:
А – штамм из образца № 4, Б – штамм из образца № 5

Для штаммов из образцов ризосферы под номерами 32 и 33 характерно образование более крупных колоний (7–8 мм в диаметре), со складчатостью и волнистым краем, легко снимающимся с агара в виде пленки. Кроме того, штамм из образца 32 образует пигмент коричневого цвета при росте на твердых средах (рисунок 7).



Рисунок 7 – Пробирки со скошенным L-агаром: А – стерильная среда без микроорганизмов, Б – пигментация питательной среды, вызванная развитием штамма из образца 32

Выраженная пигментация характерна для некоторых представителей р. *Bacillus*. Например, для вида *B. atrophaeus* (Burke et al., 2004; Alina et al., 2015).

3.2. Первичная идентификация природных штаммов *Bacillus* spp. с помощью тест-системы Microgen Bacillus-ID

Штаммы бацилл, отобранные ранее (пункт 3.1.), идентифицировали по биохимической активности с помощью тест-системы Microgen Bacillus-ID, содержащей лунки для проведения 24 биохимических реакций за 48 часов. С помощью данной тест-системы могут быть определены 17 видов бактерий рода *Bacillus*, а также некоторые представители *Vergibacillus*, *Paenibacillus* и *Brevibacillus*.

На основании изменения цвета в лунках протоколировали способность новых штаммов ферментировать различные субстраты. Биохимические свойства исследуемых культур отражены в таблице 5 (Дудник и др., 2019).

Таблица 5 – Способность изучаемых штаммов перерабатывать различные субстраты

Субстраты	Номера образцов, из которых выделили штаммы							
	4	5	28	29	30	31	32	33
Арабиноза	+**	+	+	+	+	+	+	+
Целлобиоза	+	+	+	+	+	+	+	+
Инозит	–	–	–	–	–	–	+	+
Маннит	+	+	+	+	+	+	+	+
Манноза	+	+	+	+	+	+	+	+
Раффиноза	–	–	–	–	–	–	–	–
Рамноза	–	–	–	–	–	–	–	–
Салицин	+	+	+	+	+	+	+	+
Сорбит	–	–	–	–	–	–	+	+
Сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+
Трегалоза	+	+	+	+	+	+	+	+
Ксилоза	–	–	+	+	+	+	–	–
Адонитол	–	–	–	–	–	–	–	–
Галактоза	–	–	–	–	–	–	–	–
Метил-D-маннозид	–	–	–	–	–	–	–	–
Метил-D-глюкозид	–	–	–	+	–	–	–	–
Инулин	–	–	–	–	–	–	+	–
Мелезитоза	–	–	–	–	–	–	–	–
Индол	–	–	–	–	–	–	–	–
ONPG*	+	+	+	+	+	+	+	+
Нитрат	–	–	–	–	–	–	+	+
Аргинин-дегидролаза	+	+	+	+	+	+	+	+
Цитрат	+	–	–	–	–	–	–	+
Реакция Фогеса-Проскауэра	+	+	+	+	+	+	+	+

*: орто-нитрофенил- β -D-галактопиранозид;

** : « + » – положительная реакция, « – » – отрицательная реакция

Для ризосферных штаммов зафиксировали как схожие, так и отличные друг от друга ферментативные особенности. Все бактерии оказались способными реализовать 10 из 24 реакций – на ONPG, аргининдегидролазу и Фогеса-Проскауэра, а также усваивать арабинозу, целлобиозу, маннит, маннозу, салицин, сахарозу и трегалозу. Также для всех штаммов выявили отрицательные реакции на 7 из 24 тестов – на продукцию индола и способность утилизировать мелезитозу, адонитол, галактозу, метил-D-маннозид, раффинозу и рамнозу. Кроме того, для штаммов из образцов растений № 32 и № 33 определили специфичные свойства – способность расщеплять иннозит и сорбит, а также восстанавливать нитрат до нитрита. Для некоторых штаммов *Bacillus* spp. выявили уникальные особенности: штамм из образца № 29 разлагал метил-D-глюкозид, а из образца № 32 – инулин.

Полученные результаты в виде восьмизначного кода по каждому из штаммов внесли в программу Microgen Identification System, которая сгенерировала 5 наиболее вероятных видов, к которым может относиться культура. В результате биохимической идентификации для всех исследуемых природных штаммов подтвердилась принадлежность к роду *Bacillus*. Из них 5 штаммов определили как вид *B. pumilus*, 2 штамма – как *B. licheniformis* и 1 штамм – как *B. lentus* (таблица 6).

Таблица 6 – Видовая принадлежность природных штаммов *Bacillus* spp., установленная с помощью Microgen Bacillus-ID

№ образца растения	Установленный вид бактерий	Вероятность верной идентификации, %	№ штамма в коллекции ИЦ «Пробиотех»
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

Все штаммы кроме *B. lentus* 15 (слабо дифференцируем) и *B. licheniformis* 8 (средне идентифицируем) тест-система признала как хорошо идентифицируемые. Однако, в Microgen Bacillus-ID не представлены профили и 5 % известных на данный момент видов бацилл (Caulier et al., 2019), поэтому результаты данной видовой идентификации сочли первичными, требующими подтверждения с помощью более достоверных методов. Так, например, штамм *B. lentus* 15 с помощью генетической идентификации по 16S рНК и с использованием специфических праймеров ВТf

(ATCGGTGATACAGATAAGACT) и BTr (CCTTCATACGTATGAATATTATTT) идентифицировали как *B. toyonensis* (Пат. 2693439). А для штамма *B. pumilus* 16 после идентификации по 16S рРНК и с использованием праймеров Pum-f (ATGACAAGTGATAAACCATTTAAG) и Pum-r (AACGGTTGCATCTCTACGCAG) подтвердили верность определения принадлежности к виду с помощью тест-системы Microgen Bacillus-ID (Пат. 2694522).

3.3. Биосовместимость выделенных бактерий рода *Bacillus*

Поликомпонентные препараты, состоящие из нескольких штаммов бактерий, зачастую оказываются эффективнее, чем монокомпонентные (Wang et al., 2019; Win et al., 2021). Однако при их разработке необходимо учитывать степень биосовместимости штаммов, ведь от этого зависит стабильность и положительный эффект от применения биопрепарата (Ковалевская и др., 2016; Волкова и др., 2020).

Для дальнейших исследований использовали 9 природных штаммов бацилл – 8 ризосферных штаммов, выделенных в пункте 3.1., а также штамм *B. licheniformis* 10 из коллекции ИЦ «Промбиотех». Последний штамм получили из филлосферы злаковых культур (сена). Биосовместимость штаммов определили двумя методами – перпендикулярных штрихов и лунок. Повторность экспериментов – трехкратная.

В таблице 7 представлены результаты по биосовместимости исследуемых штаммов методом перпендикулярных штрихов. В соответствии с полученными данными не все штаммы бацилл совместимы друг с другом (Малкова и др., 2022).

Таблица 7 – Совместимость природных штаммов *Bacillus* spp., определенная методом перпендикулярных штрихов (M±m)

Штаммы по вертикали	Штаммы по горизонтали								
	<i>B. p.</i> 4	<i>B. p.</i> 5	<i>B. p.</i> 6	<i>B. p.</i> 7	<i>B. p.</i> 16	<i>B. t.</i> 15	<i>B. l.</i> 8	<i>B. l.</i> 9	<i>B. l.</i> 10
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>B. p.</i> 4*		+	+	+	+	- (12,0± 1,0)	- (2,3± 0,6)	+	- (2,0± 0,0)
<i>B. p.</i> 5	***		+	+	+	- (9,7± 2,1)	- (2,3± 0,6)	+	- (2,3± 0,6)
<i>B. p.</i> 6	+	+		+	+	- (10,0± 1,0)	- (2,3± 0,6)	+	- (3,0± 0,0)

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>B. p.</i> 7	+	+	+		+	- (10,0± 2,6)	- (2,3± 0,6)	+	- (2,0± 0,0)
<i>B. p.</i> 16	+	+	+	+		- (10,0± 1,0)	- (2,8± 0,3)	+	- (3,0± 0,0)
<i>B. t.</i> 15	- (1,0± 0,0)	- (1,7± 0,6)	- (1,0± 0,0)	- (1,0± 0,0)	- (1,0± 0,0)		+	+	+
<i>B. l.</i> 8	- (6,0± 0,0)	- (5,7± 0,6)	- (5,3± 0,6)	- (6,0± 1,0)	- (5,7± 1,2)	- (5,7± 0,6)		- (4,0± 1,0)	- (4,0± 0,0)
<i>B. l.</i> 9	- (3,3± 1,5)	- (3,7± 1,2)	- (3,7± 2,1)	- (4,0± 1,0)	- (4,3± 0,6)	- (4,0± 1,0)	- (3,0± 0,0)		- (4,0± 1,0)
<i>B. l.</i> 10	- (1,7± 0,6)	- (1,7± 0,6)	- (2,7± 0,6)	- (1,6± 1,2)	+	+	+	+	

*: *B. p.* – *B. pumilus*, *B. t.* – *B. toyonensis*, *B. l.* – *B. licheniformis*

** : «+» – биосовместимы, «-» – антагонизм ($M \pm m$ в мм)

Высокую биосовместимость установили для всех представителей *B. pumilus*. Для пяти штаммов данного вида зафиксировали нейтральные взаимоотношения. Вероятно, для исследуемых штаммов *B. pumilus* может быть характерно даже взаимное стимулирование роста, но для доказательства необходимы дополнительные эксперименты.

По отношению к штаммам *B. licheniformis* 8 и *B. licheniformis* 10, а также *B. toyonensis* 15 все штаммы вида *B. pumilus* проявили антагонистический эффект, сильнее всего угнетая последний штамм (на 12 мм максимально). *B. toyonensis* 15 также слабо ингибировал рост штаммов *B. pumilus* (от 1 до 1,7 мм), не блокируя при этом рост всех представителей вида *B. licheniformis*.

Для штаммов *B. licheniformis* 8 (рисунок 8, А) и *B. licheniformis* 9 выявили антагонистическое взаимодействие со всеми исследуемыми природными штаммами *Bacillus* spp. Возможно, данные культуры продуцировали бактериоцины, способствующие подавлению близкородственных видов бактерий (Тагиева, Гахраманова, 2020). Вероятно, изучаемые культуры также выделяли вещества низкой молекулярной массы, которые диффундировали в твердой среде и влияли на их антибактериальную активность. А для штамма *B. licheniformis* 10 выявили

биосовместимость со следующими штаммами: *B. toyonensis* 15, *B. pumilus* 16, *B. licheniformis* 8 и *B. licheniformis* 9.

Метод лунок отличался от метода перпендикулярных штрихов тем, что в данном случае культуру бактерий рода *Bacillus* поместили в лунки в жидком агрегатном состоянии. Это могло повлиять на накопление не только низкомолекулярных, но и высокомолекулярных веществ, влияющих на характер взаимодействия бактерий. В таблице 8 представлены данные по совместимости бактерии рода *Bacillus* с использованием метода лунок. Полученные результаты во многом совпали с ранее установленными методом перпендикулярных штрихов.

Таблица 8 – Биосовместимость штаммов бацилл, установленная методом лунок ($M \pm m$)

Штаммы в газонах	Штаммы в лунках								
	<i>B. p.</i> 4	<i>B. p.</i> 5	<i>B. p.</i> 6	<i>B. p.</i> 7	<i>B. p.</i> 16	<i>B. t.</i> 15	<i>B. l.</i> 8	<i>B. l.</i> 9	<i>B. l.</i> 10
<i>B. p.</i> 4*		+	+	+	+	+	- (2,0± 1,0)	+	+
<i>B. p.</i> 5	+**		+	+	+	+	- (1,3± 0,6)	+	+
<i>B. p.</i> 6	+	+		+	+	+	- (3,3± 0,6)	+	+
<i>B. p.</i> 7	+	+	+		+	+	- (1,7± 0,6)	+	+
<i>B. p.</i> 16	+	+	+	+		+	- (2,7± 0,6)	+	+
<i>B. t.</i> 15	- (1,7± 0,6)	- (1,7± 0,6)	- (2,7± 0,6)	- (1,0± 0,0)	- (2,3± 0,6)		- (1,0± 0,0)	- (2,0± 0,6)	- (1,0± 0,0)
<i>B. l.</i> 8	-	-	-	-	-	+		-	-
<i>B. l.</i> 9	+	+	+	+	+	+	- (1,0± 0,0)		+
<i>B. l.</i> 10	+	+	+	+	+	+	- (1,0± 0,0)	+	

*: *B. p.* – *B. pumilus*, *B. t.* – *B. toyonensis*, *B. l.* – *B. licheniformis*

** : «+» – биосовместимы, «-» – антагонизм ($M \pm m$ в мм)

Все исследуемые штаммы вида *B. pumilus* снова проявили высокую совместимость между собой. А штамм *B. toyonensis* 15 оказался наименее устойчивым, так как все остальные бациллы подавили рост его газона (от 1,0 до 2,7

мм максимально) (рисунок 8, Б). Возможно, это обусловлено тем, что данный штамм единственный из исследуемых принадлежит к группе *B. cereus*, а не *B. subtilis* (Jimenez et al., 2013).

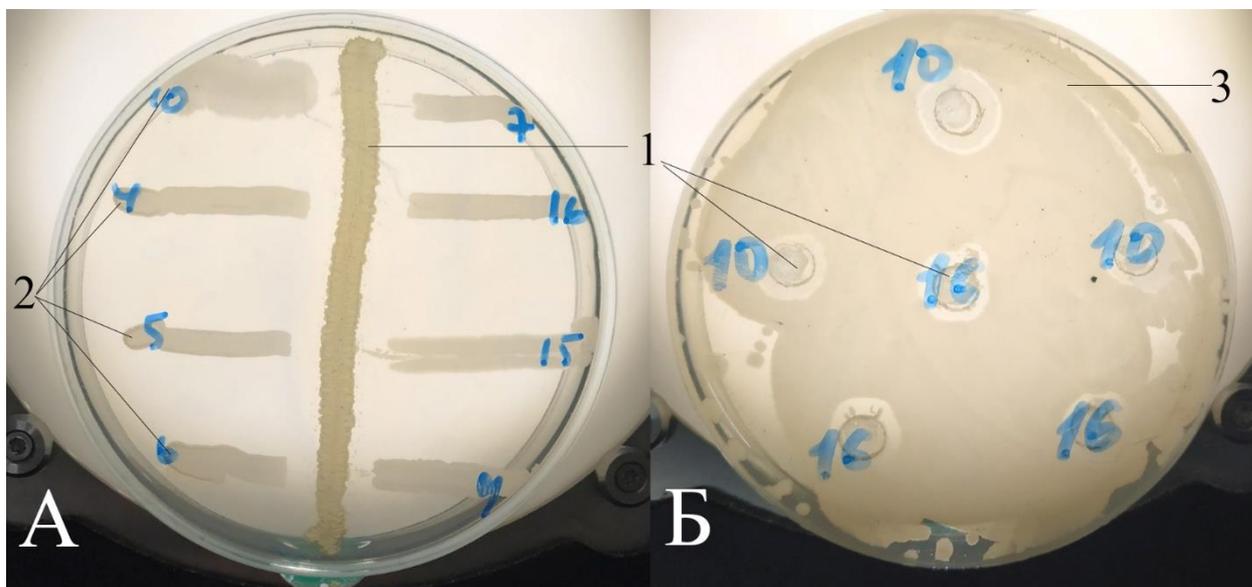


Рисунок 8 – Скрининг совместимости некоторых исследуемых штаммов *Bacillus* spp.: А – спектр антагонистической активности штамма *B. licheniformis* 8, выявленный методом перпендикулярных штрихов, Б – антагонистическое действие штаммов *B. licheniformis* 10 и *B. pumilus* 16 по отношению к штамму *B. toyonensis* 15, установленное методом лунок. 1 – штаммы-антагонисты, 2 – штрихи тест-культуры, 3 – газон штамма *B. toyonensis* 15

Для штамма *B. licheniformis* 8 снова установили высокий антагонистический эффект. Газон данной бактерии угнетал рост других исследуемых бацилл даже в областях их лунок (кроме штамма *B. toyonensis* 15). В связи с полученными результатами данный штамм признали неподходящим для включения в состав поликомпонентных препаратов.

Штамм *B. licheniformis* 10 при использовании метода лунок продемонстрировал биосовместимость с другими исследуемыми штаммами *Bacillus* spp. Поэтому для более точного понимания типа взаимоотношений между микроорганизмами необходимо применять различные микробиологические методы. Так как при различных условиях (консистенция среды, совместное/отсроченное культивирование и т.п.) могут включаться различные механизмы взаимодействия, в том числе – антагонизма.

Таким образом, 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 (лунок и перпендикулярных штрихов). Поэтому именно

они в первую очередь могут быть рекомендованы для разработки прототипа поликомпонентного биологического препарата для сельского хозяйства при наличии других технологически-ценных свойств.

3.4. Антагонистическая активность выделенных штаммов *Bacillus* spp. по отношению к фитопатогенам

Для определения антифунгального действия природных штаммов бацилл первоначально изучили состав микромицетов на пророщенных семенах сельскохозяйственных растений (гречиха, рапс, овес, подсолнечник), которые использовали в дальнейших исследованиях. В ходе микроскопии пораженных семян установили, что они в большинстве случаев обсеменены грибами родов *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. и *Aspergillus* sp. (Малкова и др., 2021). Именно эти микромицеты, доведенные до чистой культуры, а также штамм *P. infestans* из коллекции ИЦ «Промбиотех» использовали в качестве тест-культур.

Антагонизм оценивали методом агаровых блоков. О наличии антифунгального эффекта судили по слабому росту микроскопических грибов или его отсутствию в опыте по сравнению с контролем.

Для большинства бактерий *Bacillus* spp. наиболее оптимальными являются температуры в пределах 30–37 °С (Vos et al., 2009). В опыте с *P. infestans* газоны изучаемых бацилл выросли за 24–48 ч при 18 °С, что важно при разработке биопрепарата для защиты растений.

Диаметр культуры *P. infestans* в контрольных чашках через 2-е суток культивирования составил 12,7±0,6 мм, на 5-е сутки – 49,3±3,1 мм, а на 14-е – нити мицелия фитопатогена распространились по площади всей чашки (Малкова и др., 2021). При этом в опытных чашках зафиксировали отсутствие роста *P. infestans* к окончанию эксперимента. Через 2 недели исследования отметили гибель *P. infestans* даже на установленных блоках, а в чашках с некоторыми штаммами бацилл (*B. pumilus* 6, *B. licheniformis* 8, *B. licheniformis* 9) выявили изменение цвета блока на коричневый (рисунок 9). Такие видоизменения не произошли во всех опытных чашках, поэтому можно предположить, что данное явление обусловлено особенностями биохимической активности 3-х данных штаммов.

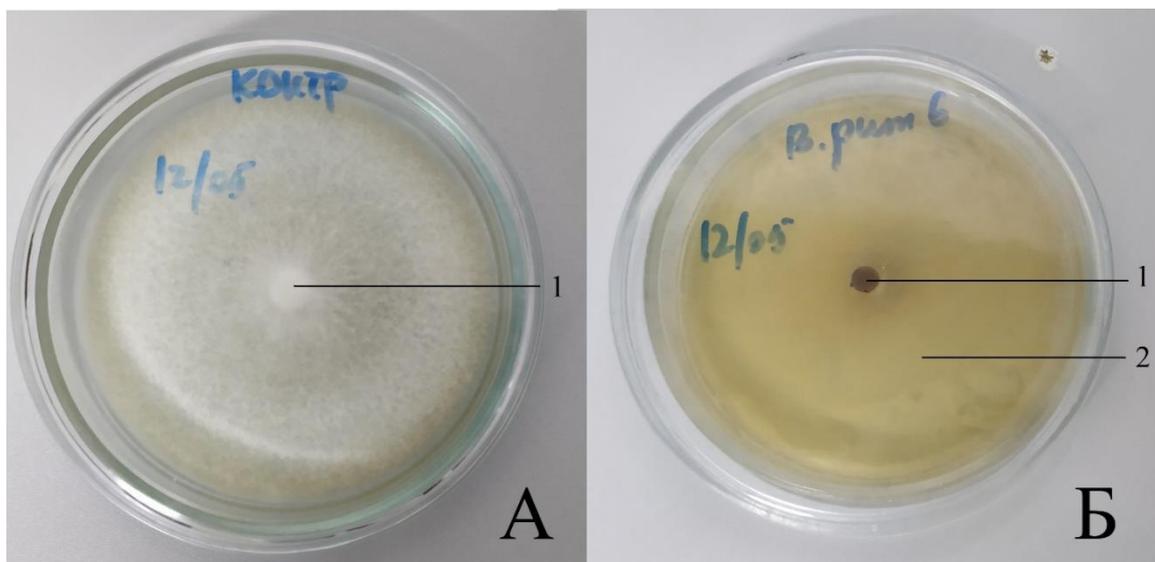


Рисунок 9 – Чашки с *P. infestans* через 2 недели эксперимента: А – контрольная чашка, Б – опытная чашка. 1 – блок с *P. infestans*, 2 – газон штамма *B. pumilus 6*

Все 9 природных штаммов бактерий *Bacillus* spp. проявили выраженный антимикотический эффект по отношению к *P. infestans*. Однако синтезируемые разными штаммами бацилл антифунгальные соединения, подавившие рост *P. infestans*, могли быть различными. На это косвенно указало изменение цвета среды в некоторых чашках.

Как и в случае с *P. infestans*, абсолютный антагонистический эффект при использовании метода агаровых блоков по отношению к штамму *Alternaria* sp. проявили все 3 штамма вида *B. licheniformis* и штамм *B. toyonensis*. С данными штаммами *Bacillus* spp. мицелий микромицета не начал распространяться за пределы агаровых блоков. Антагонистическое действие бактерий вида *B. pumilus* против *Alternaria* sp. приведено в таблице 9 (Малкова и др., 2021).

Таблица 9 – Антифунгальная активность штаммов *Bacillus* spp. против *Alternaria* sp. (M±m)

Штаммы	Диаметр культуры <i>Alternaria</i> sp. (M±m, мм) по суткам эксперимента			
	3	7	10	14
Контроль	22,60±4,35	58,83±2,89	75,67±11,01	85,83±8,78
<i>B. pumilus 4</i>	6,67±1,44	7,83±0,58	7,83±0,58	10,00±0,87
<i>B. pumilus 5</i>	7,33±0,35	10,17±0,76	12,17±0,76	12,17±0,76
<i>B. pumilus 6</i>	7,10±0,72	10,17±1,53	11,33±1,15	11,33±1,26
<i>B. pumilus 7</i>	6,33±1,53	6,50±1,32	6,50±1,32	8,00±3,00
<i>B. pumilus 16</i>	5,50±0,87	6,50±0,50	6,67±0,29	7,67±0,29

Согласно полученным данным, мицелий *Alternaria* sp. в контроле максимально распространился за 3–7 сутки на 36,23 мм, а далее ее рост замедлился.

Минимальное увеличение диаметра культуры *Alternaria sp.* на 10,16 мм. при этом зафиксировали с 10 по 14 сутки исследования.

Штаммы вида *B. pumilus* эффективно сдерживали распространение микроскопического грибка по площади чашки Петри на протяжении всех дней эксперимента, но штамм *B. pumilus* 5 проявил себя слабее остальных бацилл. А наиболее выраженный антагонистический эффект проявили штаммы *B. pumilus* 16, *B. pumilus* 7 и *B. pumilus* 4. К окончанию исследования они подавили рост тест-культуры на 97 %, 96 % и 94 % соответственно по сравнению с контролем.

Таким образом, все исследуемые бактерии *Bacillus spp.* ингибировали рост *Alternaria sp.* более чем на 90 %, что является высоким показателем. Различия в силе антифунгального действия разных штаммов и видов бацилл могли быть обусловлены набором фунгицидных соединений, а также степенью активности или их молекулярной массой.

Грибы родов *Penicillium* и *Aspergillus* относятся к плесеням хранения, которые замещают естественную микрофлору семян (роды *Alternaria*, *Fusarium* и др.) после уборки урожая (Дроздова и др., 2017). Это может снижать качество посевного материала, поэтому по отношению к ним также важно определять антагонистическое действие бактерий при разработке биопрепарата.

В соответствии с полученными данными, все природные штаммы бацилл подавили рост исследуемых микромицетов, заблокировав рост их мицелия по всей площади чашки Петри. Культуры *Penicillium sp.* и *Aspergillus sp.* в контроле за 14 суток эксперимента достигли диаметра $77,50 \pm 1,38$ мм и $76,60 \pm 2,70$ мм соответственно. В опытных чашках микромицеты не распространились и на половину от этой площади. А бактерии *Bacillus spp.* образовали газон за 24 ч культивирования даже не при оптимальной для них температуре культивирования (при 22–25 °C) (Малкова и др., 2021).

Как видно из таблицы 10, через сутки культивирования штамм *Penicillium sp.* выделил в среду антибактериальные соединения, так как диаметр зоны отсутствия роста штаммов *Bacillus spp.* составил более 7 мм (диаметр первоначального блока с грибом). Однако уже на 3 день эксперимента бациллы начали распространяться в направлении блоков с грибами. Возможно, это связано с синтезом ферментов, инактивирующих антибиотики пенициллинового ряда (Степашкина, 2017). Так, в

наших предыдущих исследованиях мы установили, что ряд коллекционных штаммов ВКПМ из группы *B. subtilis* не восприимчив к оксациллину и малочувствителен к бензилпенициллину (Irkítova et al., 2019). А, например, наш штамм *B. pumilus* 16 оказался устойчивым к оксациллину, но чувствителен к бензилпенициллину (Орлова и др., 2020), что также косвенно совпало с данными по первому дню эксперимента.

Таблица 10 – Антагонистическая активность штаммов *Bacillus* spp. по отношению к штамму *Penicillium* sp. ($M \pm m$)

Штаммы	Диаметр зоны, занимаемой пенициллиумом ($M \pm m$, мм), по суткам эксперимента				
	1	3	7	10	14
<i>B. p.</i> 4*	14,83±1,33	14,67±1,37	12,33±1,21	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. p.</i> 7	12,83±1,17	8,87±1,86	8,83±2,23	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. p.</i> 16	12,33±1,03	10,50±0,55	10,00±2,28	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. t.</i> 15	9,50±1,52	7,00±0,00	9,33±0,52	9,33±0,52	9,33±0,52
<i>B. l.</i> 8	12,50±1,22	10,83±0,75	11,33±0,52	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. l.</i> 9	8,33±2,07	7,00±0,00	11,17±1,94	11,67±1,75	11,67±1,75
<i>B. l.</i> 10	23,00±1,79	14,83±3,19	18,67±1,97	21,33±1,75	23,83±1,94

*: *B. p.* – *B. pumilus*, *B. t.* – *B. toyonensis*, *B. l.* – *B. licheniformis*

Штаммы *B. pumilus* 5 и *B. pumilus* 6 сразу проявили устойчивость к антибактериальным метаболитам *Penicillium* sp., на это указало отсутствие зоны угнетения роста с первых суток эксперимента. К 10-му дню опыта штаммы *B. pumilus* 4, *B. pumilus* 7 и *B. pumilus* 16, а также *B. licheniformis* 8 распространились и на пространство возле блоков *Penicillium* sp. Штаммы *B. toyonensis* 15, *B. licheniformis* 9 и *B. licheniformis* 10 к 3-м суткам эксперимента прорасли в зонах с диффундированными антибиотиками *Penicillium* sp., однако через неделю от начала опыта микромицет начал распространяться поверх газонов этих бацилл.

Следует отметить, что цвет мицелия *Penicillium* sp. на YEP-агаре в присутствии бактерий р. *Bacillus* изменился с зеленовато-желто-белого (как в контроле) на серо-черный. Кроме того, в опыте микроскопический грибок перестал выделять в среду пигмент, придающий среде желтый цвет и флуоресцирующий (рисунок 10). Вероятно, это обусловлено угнетающим действием штаммов *Bacillus* spp. на исследуемую культуру микромицета.

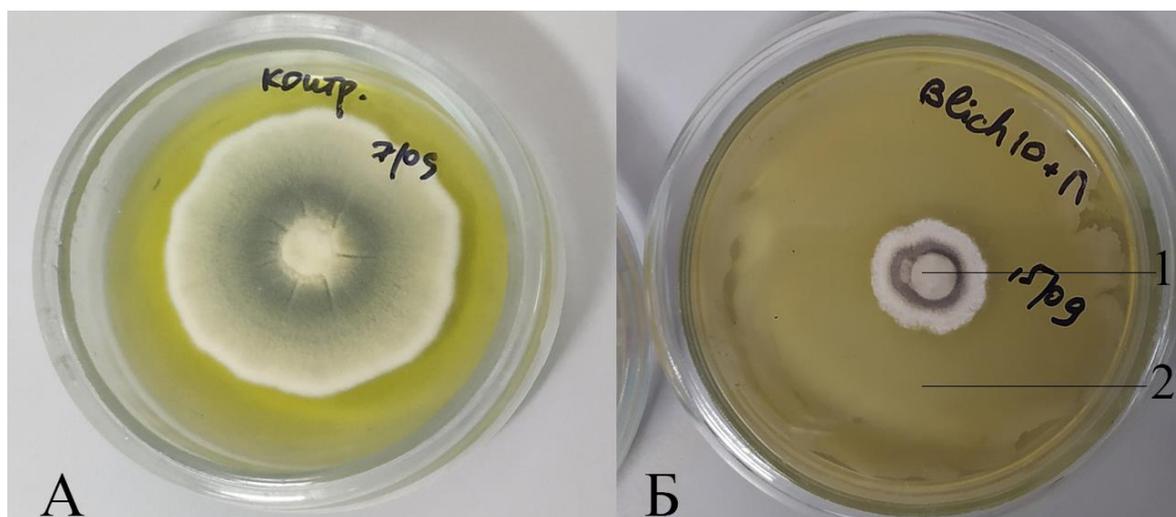


Рисунок 10 – Рост *Penicillium sp.* на 10 сутки эксперимента: А – контрольная чашка, Б – опытная чашка. 1 – блок *Penicillium sp.*, 2 – газон штамма *B. licheniformis* 10

При изучении антифунгального эффекта бацилл против штамма *Aspergillus sp.* получили отличные результаты. В таблице 11 приведены соответствующие сведения.

Таблица 11 – Результаты изучения антагонистической активности *Bacillus spp.* по отношению к штамму *Aspergillus sp.* ($M \pm m$)

Штаммы	Диаметр зоны, занимаемой аспергиллом ($M \pm m$, мм), по суткам эксперимента				
	1	3	7	10	14
<i>B. p.</i> 4*	8,83±2,64	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. p.</i> 5	8,17±1,33	7,67±0,82	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. p.</i> 6	7,50±1,22	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. p.</i> 7	9,17±1,47	7,83±0,75	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. p.</i> 16	8,67±1,97	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. t.</i> 15	8,33±1,51	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. l.</i> 8	8,83±1,17	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00	7,00±0,00
<i>B. l.</i> 9	9,17±1,94	8,33±1,21	16,83±1,47	18,00±0,82	18,25±1,71
<i>B. l.</i> 10	29,33±1,03	28,67±1,21	34,67±1,21	35,00±0,89	35,17±1,47

*: *B. p.* – *B. pumilus*, *B. t.* – *B. toyonensis*, *B. l.* – *B. licheniformis*

Через сутки культивирования небольшие зоны угнетения роста бацилл отметили и в чашках со штаммами *B. pumilus* 5 и *B. pumilus* 6, которые проявили устойчивость к антибиотикам *Penicillium sp.* Можно предположить, что *Aspergillus sp.* синтезировал антибактериальные соединения, которые быстрее диффундировали в агар или оказались более эффективными по отношению к данным бациллам. Однако через неделю культивирования 7 из 9 штаммов *Bacillus spp.* полностью распространились в областях отсутствия роста вокруг блоков микромицета.

Поэтому в целом бациллы сильнее и быстрее подавили *Aspergillus sp.*, чем *Penicillium sp.*

Как и в случае со штаммом *Penicillium sp.*, присутствие бактерий рода *Bacillus* сказалось на интенсивности окраски мицелия *Aspergillus sp.* В контроле грибница была насыщенного красно-коричневого цвета, а в опыте – бледно-розового. Наиболее слабое фунгистатическое действие против *Aspergillus sp.* и *Penicillium sp.* проявили штаммы *B. licheniformis* 9 и *B. licheniformis* 10 (рисунок 11). Но даже они угнетали рост микромицета, не позволяя ему разрастись по площади чашки Петри со скоростью, как в контроле.

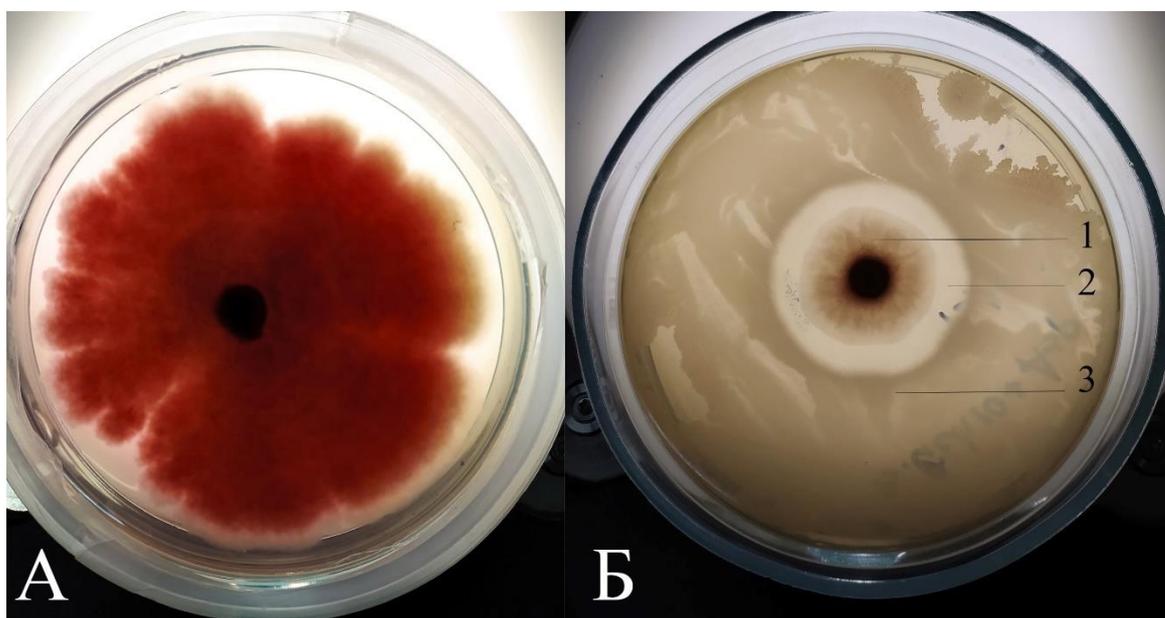


Рисунок 11 – Сравнение роста *Aspergillus sp.* в опыте и контроле на 14 сутки эксперимента: А – контрольная чашка, Б – опытная чашка. 1 – культура *Aspergillus sp.*, 2 – зона подавления роста бацилл, 3 – газон *B. licheniformis* 10

Согласно полученным данным все 9 изучаемых природных штаммов *Bacillus* spp. проявили антигрибной эффект против всех исследуемых тест-культур. По отношению к *P. infestans* он оказался абсолютным. Однако стоит учитывать, что при использовании метода блоков у бактерий р. *Bacillus* было преимущество, так как они растут быстрее грибов и их нанесли на всю поверхность чашки. Однако и в полевых условиях при обработке семян обнаружен схожий эффект.

Против *Alternaria sp.* оказались наиболее активны все штаммы *B. licheniformis*, *B. toyonensis* 15, а также *B. pumilus* 16, *B. pumilus* 7 и *B. pumilus* 4. При этом по отношению к *Penicillium sp.* и *Aspergillus sp.* штаммы *B. licheniformis* 9* и 10 показали самый слабый антифунгальный эффект. А самым сильным антагонистом по

отношению к плесеням хранения оказался штамм *B. pumilus* 6. Изучаемые штаммы *Bacillus* spp. оказались способными не только подавлять рост микромицетов, но также и влиять на изменение окраски их мицелия. Кроме того, максимальный антагонистический эффект штаммов *Bacillus* spp. по отношению к разным микроскопическим грибам развивался в разное время: например, с *Penicillium* sp. на 10 сутки эксперимента, а с *Aspergillus* sp. – через неделю.

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

С учетом полученных данных об антагонистической активности штаммов *Bacillus* spp. к фитопатогенам, а также сведений об их биосовместимости, 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 (сем. *Brassicaceae*, как и икотник – источник штамма *B. pumilus* 4), гречиха (сем. *Polygonaceae*, как и щавель – источник штамма *B. pumilus* 7) и подсолнечник (сем. *Asteraceae*, как и цикорий – источник штамма *B. pumilus* 16), которые задействовали в следующих экспериментах. Было выдвинуто предположение, что в природе у подобных бацилл уже сформированы симбиотические взаимоотношения с перечисленными ценными сельскохозяйственными культурами, что сделало их наиболее перспективными для разработки биологического средства защиты растений.

3.5. Фенотипическая идентификация отобранных штаммов *B. pumilus* с помощью The Biolog Gen III Microplate

Видовую принадлежность штамма *B. pumilus* 16 подтвердили в ходе генетической идентификации по гену 16S рРНК и с использованием 2 специфических праймеров в лаборатории ВКПМ. А штаммы *B. pumilus* 4 и *B. pumilus* 7 определили перед депонированием в коллекции ВКСМ с использованием тест-системы The Biolog Gen III Microplate (приложение Б). Для сопоставления полученных биохимических профилей штамм *B. pumilus* 16 также проанализировали с помощью данного метода.

The Biolog Gen III Microplate – система для фенотипической идентификации широкого спектра бактерий до вида. Планшет содержит 96 лунок, 71 из которых

предназначена для установления ферментируемых источников углерода, 23 – для определения химической чувствительности, а также лунки положительного и отрицательного контроля. После инокуляции всех ячеек планшет культивировали и анализировали с помощью программы Biolog's Microbial Identification Systems.

Исследуемые штаммы *Bacillus* spp. прокультивировали в течение 48 ч. По истечении этого времени программное обеспечение сформировало протоколы идентификации (приложение В). В соответствии с ними, принадлежность всех штаммов к виду *B. pumilus* подтвердилась. Вероятность для 4 штамма составила 77,5 %, для 7–89,4 %, а для 16–95,4 %.

Биохимические особенности изучаемых бацилл по утилизации различных субстратов представлены в таблице 12. Результаты в 55 лунках из 71 (77,5 %) оказались идентичными для всех штаммов *B. pumilus*. Наиболее похожей по профилю парой явились штаммы *B. pumilus* 4 и *B. pumilus* 7, так как у них не совпало только 6 (8,5 %) реакций. А больше всего несовпадений выявили между штаммами *B. pumilus* 7 и *B. pumilus* 16 – 15 (21,1 %).

Все исследуемые штаммы *B. pumilus* оказались однозначно способными утилизировать в качестве единственного источника углерода только 6 субстратов: L- и D-аспарагиновые, L-глутаминовую, хинную, лимонную и L-яблочную кислоты. Также для всех штаммов зафиксировали слабую способность к усвоению гентиобиозы, β -метил-D-глюкозида, D-салицина, N-ацетил-D-глюкозамина, D-фруктозы, D-маннитола, D-Фруктозо-6-фосфата, L-аргинина, пектина, D-глюконовой кислоты, метилпирувата, L-молочной и γ -аминомасляной кислот. Из этого заключили, что данные бациллы лучше ферментируют аминокислоты и карбоновые кислоты, а также ряд сахаров и их производных.

По дифференциальным характеристикам (Logan, Vos, 2015) бактерии вида *B. pumilus* должны расщеплять L-арабинозу, D-глюкозу, D-маннозу, D-маннитол, салицин, D-ксилозу, желатин, казеин и цитрат. По совокупным данным с результатов анализов с помощью систем Microgen и Gen III 5 из 9 субстратов утилизировались каждым штаммом. При этом отметили различия в полученных данных. Например, по системе Microgen D-маннозу ферментировали все 3 штамма *B. pumilus*, а по Gen III – только штамм *B. pumilus* 7. Также D-ксилозу и желатин на невысоком уровне утилизировали все штаммы кроме *B. pumilus* 16.

Таблица 12 – Биохимические профили исследуемых штаммов *B. pumilus*

Субстрат	Штаммы			Субстрат	Штаммы			Субстрат	Штаммы		
	4*	7	16		4	7	16		4	7	16
Декстрин	+.*	+	-	L-рамноза	-	-	-	Глюкуронамид	+	-	+
D-мальтоза	-	-	-	Инозин	-	-	-	Муциновая кислота	-	-	-
D-трегалоза	+	+	-	D-сорбитол	-	-	-	Хинная кислота	+	+	+
D-целлобиоза	+	+	-	D-маннитол	+	+	+	D-сахарная кислота	-	-	-
Гентиобиоза	+	+	+	D-арабитол	-	-	-	p-гидроксифенил-ацетамид	-	-	-
Сахароза	+	+	-	Мио-инозитол	-	-	-	Метилпируват	+	+	+
D-тураноза	+	+	-	Глицерин	-	+	-	Метиллактат	-	-	-
Стахиоза	-	-	-	D-Глюкозо-6-фосфат	-	-	-	L-молочная кислота	+	+	+
D-раффиноза	-	-	-	D-Фруктозо-6-фосфат	+	+	+	Лимонная кислота	+	+	+
α -D-лактоза	-	-	-	D-аспарагиновая кислота	+	+	+	α -кетоглутаровая кислота	-	-	-
D-мелибиоза	-	-	-	D-серин	-	-	-	D-яблочная кислота	-	-	-
β -метил-D-глюкозид	+	+	+	Желатин	+	+	-	L-яблочная кислота	+	+	+
D-салицин	+	+	+	Глицил-L-пролин	-	-	-	Бромьантарная кислота	+	×	×
N-ацетил-D-глюкозамин	+	+	+	L-аланин	+	+	+	Твин 40	-	-	+
N-ацетил- β -D-маннозамин	-	-	-	L-аргинин	+	+	+	γ -аминомасляная кислота	+	+	+
N-ацетил-D-галактозамин	-	-	-	L-аспарагиновая кислота	+	+	+	α -гидроксимасляная кислота	-	-	-
N-ацетилнейраминавая кислота	-	-	-	L-пироглутаминовая кислота	-	-	-	L-Лактон галактоновой кислоты	-	-	-
α -D-глюкоза	+	+	-	L-гистидин	-	-	-	α -кетомасляная кислота	-	-	-
D-манноза	-	+	-	L-глутаминовая кислота	+	+	+	β -гидроксибутират	-	-	-
D-фруктоза	+	+	+	L-серин	×	×	×	Ацетоуксусная кислота	-	-	+
D-галактоза	-	+	-	Пектин	+	+	+	Пропионовая кислота	-	-	-
3-метилглюкоза	-	-	-	D-галактуроновая кислота	-	-	-	Уксусная кислота	-	-	+
D-фукоза	-	-	-	D-глюконовая кислота	+	+	+	Муравьиная кислота	-	-	-
L-фукоза	-	-	-	D-глюкуроновая кислота	-	-	-				

*: номера штаммов *B. pumilus*; **: «+» – положительная, «-» – отрицательная, «+-» – пограничная, «×» – ложноположительная реакции

Оказалось, что изучаемые штаммы *B. pumilus* слабо ферментировали α -D-глюкозу, а для штамма *B. pumilus* 16 и вовсе зафиксировали отрицательный результат, хотя по литературным данным глюкозу считают предпочтительным источником углерода для многих бактерий рода *Bacillus* (Щербаков и др., 2014; Дэлгэрмаа, Нандин-Эрдэнэ, 2015).

Для некоторых штаммов отметили реакции, реализуемые только ими. Так, *B. pumilus* 7 оказался способным ферментировать D-галактозу и глицерин, а штамм *B. pumilus* 16 – твин 40, ацетоуксусную и уксусную кислоты.

Как и указано в определителе Берджи, все изучаемые штаммы *B. pumilus* оказались не способны к утилизации пропионата. В целом, наибольшее количество субстратов не ферментировал *B. pumilus* 16 – 45 (63,4 %), а штаммы *B. pumilus* 4 и *B. pumilus* 7 не выросли в 41 (57,7 %) и 39 (54,9 %) лунках соответственно.

В таблице 13 приведены данные по химической чувствительности 3 исследуемых штаммов *B. pumilus*. Как и указано у Logan, Vos (2015), представители данного вида вариативно развивались при pH 5, при этом хорошо выросли при pH 6 и концентрациях соли от 1 до 8 %.

Таблица 13 – Результаты исследования штаммов на химическую чувствительность

Субстрат	Штаммы			Субстрат	Штаммы		
	4*	7	16		4	7	16
pH 6	+**	+	+	Гуанидина гидрохлорид	+	+	+
pH 5	×	×	+ -	Ниапруф 4	-	-	-
1% NaCl	+	+	+	Ванкомицин	-	-	-
4% NaCl	+	+	+	Тетразолий фиолетовый	+ -	+ -	+ -
8% NaCl	+	+	+ -	Тетразолий синий	-	-	-
1% лактат натрия	+	+	+	Налидиксовая кислота	×	×	×
Фузидовая кислота	-	-	-	Хлорид лития	+	+	+
D-серин	×	×	-	Теллуриды калия	+	+	+
Тролеандомицин	-	-	-	Азтреонам	+	+	+
Рифамицин SV	-	-	-	Бутират натрия	+	+ -	×
Миноциклин	-	-	-	Бромат натрия	+ -	+ -	+ -
Линкомицин	+ -	+ -	+ -				

*: номера штаммов *B. pumilus*; **: «+» – отсутствие чувствительности, «-» – высокая чувствительность, «+ -» – слабая чувствительность, «×» – ложноположительная реакция

Все исследуемые штаммы оказались абсолютно не чувствительными к 1 % лактату натрия, гуанидина гидрохлориду, хлориду лития, теллуриду калия, азтреонаму. Хотя данные соединения и их производные применяются в пищевой промышленности, лекарственных средствах, инсектицидах, антисептиках и пр.

(Асямова, Герунов, 2017; Кудряшов и др., 2019; Боломатова, Чернова, 2020). Поэтому возможно совместное применение изучаемых штаммов с препаратами, содержащими данные вещества.

Штаммы вида *B. pumilus* проявили высокую чувствительность в 7 (30,4 %) лунках. При этом отсутствие резистентности штамма *B. pumilus* 16 к олеандомицину и ряду других антибиотиков мы установили в нашем раннем исследовании (Irkítova et al., 2021). Результаты данного эксперимента также соотносились с литературными данными, так как для бактерий группы *B. subtilis* зачастую характерно отсутствие устойчивости к тетрациклину (миноциклин) и ванкомицину (Adimpong et al., 2012).

Следует отметить, что The Biolog Gen III Microplate обладает достаточно высокой точностью видовой идентификации, в том числе бактерий рода *Bacillus*. Результаты в большинстве своем сопоставимы с данными по 16S. Кроме того, вместо ошибочной идентификации Gen III, как правило, выдает результат о невозможности идентификации, что указывает на необходимость повторных анализов или использование других методов определения вида (Wragg et al., 2014). Для всех исследуемых штаммов *B. pumilus* программное обеспечение вынесло однозначный вердикт о видовой принадлежности с высоким процентом вероятности. Несмотря на это, штаммы *B. pumilus* 4 и *B. pumilus* 7 также проанализировали по 16S, и их принадлежность к виду *B. pumilus* подтвердилась. А наиболее близким видом оказался *B. safensis*, как и по тест-системе Gen III. Таким образом можно заключить, что данный метод идентификации обладает достаточно высокой точностью при определении бактерий рода *Bacillus*, поэтому именно он используется при идентификации бацилл в коллекции ВКСМ.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОГО БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ КОНСОРЦИУМА ШТАММОВ *B. PUMILUS*

4.1. Подбор питательной среды для культивирования посевного материала

В промышленных условиях эффективно применять выращивание микроорганизмов в ферментационных установках, позволяющее увеличить количество биомассы бактерий или для наибольшего накопления целевых БАВ – продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. Однако при внедрении в технологическую цепочку новых штаммов возникает потребность в установлении для них оптимальных параметров культивирования в лабораторных условиях, то есть на уровне посевного материала (Фирсова и др., 2019).

Разрабатываемый опытный препарат – поликомпонентный, однако штаммы для его создания выращивали отдельно. Это в том числе обусловлено тем, что данные представители вида *B. pumilus* обладают схожими морфологическими характеристиками (рисунок 12), поэтому установление титра каждого из штаммов в смешанной культуре могло быть проблематичным.

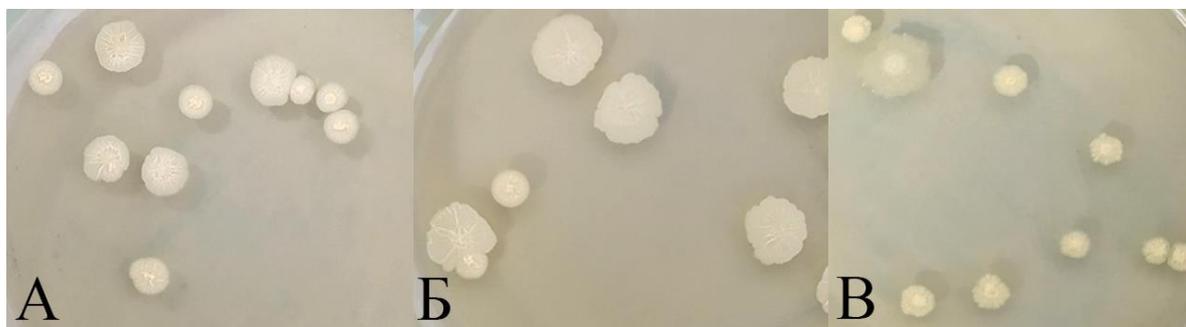


Рисунок 12 – Морфология колоний штаммов *Bacillus* spp., входящих в состав прототипа биопрепарата: А – штамм *B. pumilus* 4, Б – штамм *B. pumilus* 7, В – штамм *B. pumilus* 16

Данные штаммы оптимально развиваются при 30–37 °С в условиях аэрации, так как при термостатном культивировании у них образуется поверхностная пленка (рисунок 13), характерная для аэробных микроорганизмов (Irkítova et al., 2019). Это могло помешать переносу материнской закваски в ферментационный аппарат, поэтому посевной материал готовили в условиях шейкер-инкубатора с 250 об/мин.

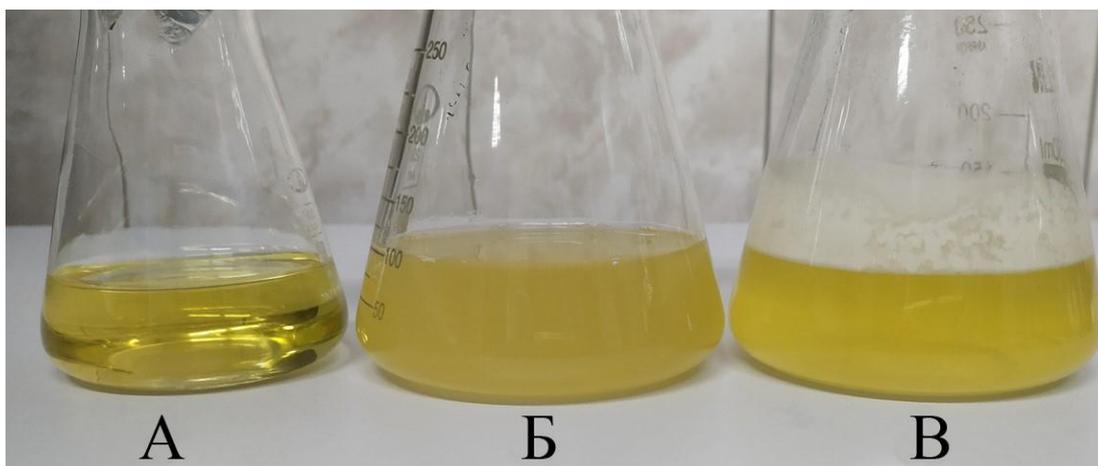


Рисунок 13 – Колбы с L-бульоном: А – стерильная, Б – со штаммом *B. pumilus* 16, выращенным в шейкер-инкубаторе, В – со штаммом *B. pumilus* 16, выращенным в термостате

В качестве питательных сред для культивирования рассмотрели L, YEP и питательный бульоны. Для постановки эксперимента каждый из штаммов внесли в 150 мл среды (колба на 500 мл) в количестве 2 бактериальных петель со скошенного агара. После 24 ч культивирования определили pH, ОП и титр *Bacillus* spp.

В результате экспериментов установили, что штаммы вида *B. pumilus* по-разному развивались в изучаемых питательных средах. Как видно из данных в таблице 14, YEP-бульон оказался менее благоприятным для роста штаммов *B. pumilus* 4 и *B. pumilus* 7, на что указывал титр на порядок ниже (10^8 КОЕ/мл), чем на других бульонах. А штамм *B. pumilus* 16 на всех питательных средах развивал численность не менее 10^9 КОЕ/мл (Малкова, 2022).

Таблица 14 – Показатели роста штаммов на исследуемых средах ($M \pm m$)

Среды	Штаммы	pH	ОП*	Титр, КОЕ/мл**
L-бульон	<i>B. pumilus</i> 4	7,08±0,13	0,386±0,039	3,21(±0,27) × 10 ⁹
	<i>B. pumilus</i> 7	6,85±0,18	0,268±0,066	1,53(±0,38) × 10 ⁹
	<i>B. pumilus</i> 16	6,73±0,28	0,365±0,068	2,24(±0,47) × 10 ⁹
YEP-бульон	<i>B. pumilus</i> 4	4,88±0,10	0,503±0,056	6,36(±1,05) × 10 ⁸
	<i>B. pumilus</i> 7	4,94±0,19	0,704±0,123	1,80(±0,28) × 10 ⁸
	<i>B. pumilus</i> 16	4,91±0,20	0,609±0,055	2,43(±0,52) × 10 ⁹
Питательный бульон	<i>B. pumilus</i> 4	6,56±0,17	0,447±0,078	1,03(±0,19) × 10 ⁹
	<i>B. pumilus</i> 7	6,58±0,16	0,411±0,049	1,37(±0,13) × 10 ⁹
	<i>B. pumilus</i> 16	6,62±0,13	0,428±0,073	1,19(±0,25) × 10 ⁹

*: ОП – оптическая плотность; **: КОЕ – колониеобразующие единицы

В ходе микроскопических исследований также выявили отличия по размерам клеток на разных питательных средах. На рисунке 14 представлены фото *B. pumilus* 16, но по другим штаммам получили аналогичные результаты. С L-бульона все

клетки были маленькие (2–3 мкм), располагались одиночно или парами. Морфология клеток *B. pumilus* с питательного бульона оказалась различной – в поле микроскопа отметили как короткие, так и длинные палочки, их расположение было одиночное или в цепях. Культура на этой среде выглядела неоднородной, что может ввести в заблуждение в ходе производственного процесса. На YEP-бульоне зафиксировали максимальный размер клеток как в длину, так и в диаметре (5–7 мкм) из всех представленных сред. Кроме того, отметили прямую зависимость между размерами клеток на разных питательных бульонах и увеличением оптической плотности для всех штаммов.

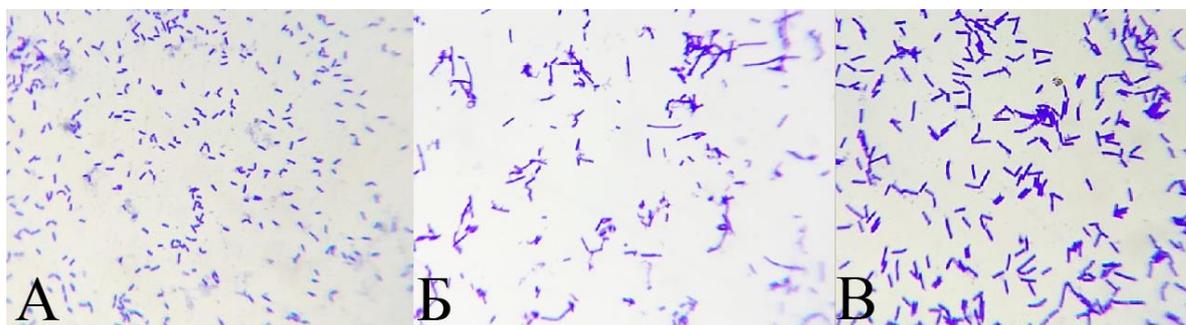


Рисунок 14 – Микроскопия штамма *B. pumilus* 16 после культивирования на разных питательных средах: А – L-бульоне, Б – питательном бульоне, В – YEP-бульоне ($\times 1000$)

Как видно из диаграммы на рисунке 15, подобной взаимосвязи, как между ОП и размерами клеток *Bacillus* spp., не выявили между ОП и титром штаммов. Для *B. pumilus* 16 при росте на разных средах между этими параметрами зафиксировали слабую прямую корреляцию (коэффициент корреляции = 0,4). А для штаммов *B. pumilus* 4 и *B. pumilus* 7 установили очень высокую отрицательную корреляцию ((–0,94) и (–0,98) соответственно).

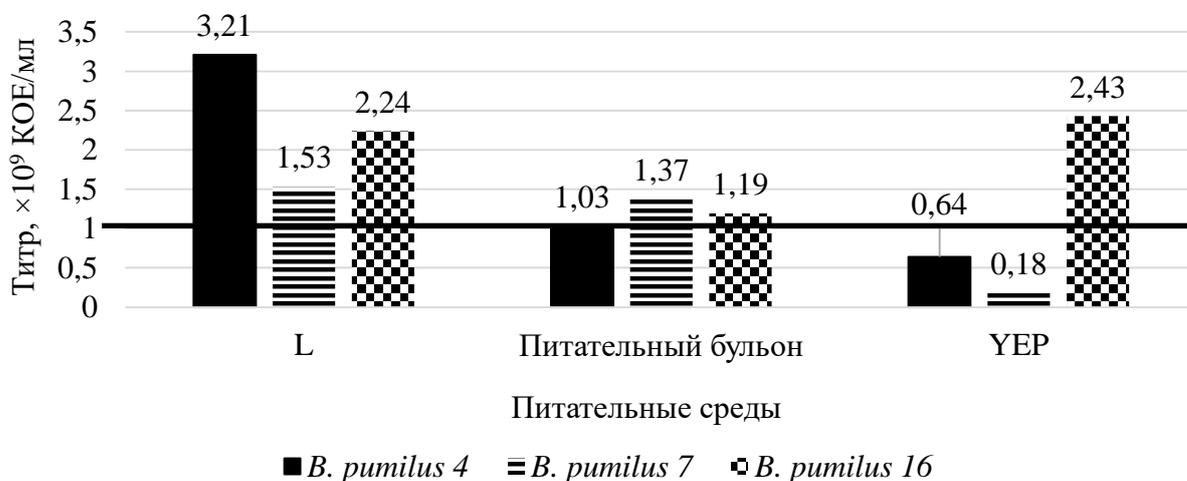


Рисунок 15 – Изменение титра штаммов *B. pumilus* при культивировании на разных средах

Для всех штаммов также зафиксировали очень высокую отрицательную корреляцию между ОП и значением водородного показателя (*B. pumilus* 4 – (-0,98), *B. pumilus* 7 – (-0,95), *B. pumilus* 16 – (-0,98)). На YEP-бульоне pH оказался меньше 5 у всех штаммов, что неблагоприятно для развития большинства нейтрофильных бацилл (Гребенщикова, 2020). Повлиять на это мог компонентный состав питательной среды. Ключевым отличием можно назвать то, что в L- и Питательном бульонах основными ингредиентами являются белковые соединения (пептон, гидролизат белков молока, дрожжевой экстракт), а в YEP преобладает глюкоза. Кроме того, (пункт 3.5) исследуемые штаммы *B. pumilus* слабо ферментировали альфа-D-глюкозу и предпочитали аминокислоты в качестве источников углерода, поэтому результаты данного опыта можно соотнести с полученными при анализе штаммов с помощью Gen III.

Можно заключить, что наиболее оптимальной питательной средой для культивирования всех исследуемых штаммов *Bacillus* spp. и достижения максимального титра оказалась L-среда. Поэтому именно L-бульон отобрали в качестве основной питательной среды для выращивания посевного материала вида *B. pumilus* для дальнейшей инокуляции в биологические реакторы.

4.2. Отработка режима культивирования штаммов *B. pumilus* в ферментере

Ферментации отобранных штаммов осуществили в биологическом реакторе объемом 15 л (ООО «Сторге», г. Санкт-Петербург, рисунок 16). В ходе разработки другого нашего опытного биопрепарата мы отработали оптимальную технологию культивирования штамма *B. pumilus* 16 (Малкова и др., 2021), которая также подошла и для других штаммов этого вида, входящих в состав разрабатываемого средства для защиты и стимуляции роста растений.

Каждый из штаммов *B. pumilus* культивировали в ферментере отдельно, а сам процесс можно охарактеризовать как глубинный, аэробный, динамический и полупериодический. (Луканин, 2016). Поэтому для получения опытной партии биопрепарата необходимо произвести не менее 3-х ферментационных циклов.



Рисунок 16 – Использованный ферментер объемом 15 л (ООО «Сторге», г. Санкт-Петербург)

Посевной материал штаммов *B. pumilus* в объеме 10 % от рабочего объема биореактора готовили в соответствии с условиями, установленными в п. 4.1. В таблице 15 представлены показатели материнской закваски изучаемых штаммов.

Таблица 15 – Характеристики посевного материала штаммов *B. pumilus* (M±m)

Штамм	Титр, КОЕ/мл*	ОП**	pH
<i>B. pumilus</i> 4	$3,14(\pm 0,23) \times 10^9$	$0,359 \pm 0,054$	$6,90 \pm 0,32$
<i>B. pumilus</i> 7	$1,43(\pm 0,32) \times 10^9$	$0,268 \pm 0,066$	$6,89 \pm 0,18$
<i>B. pumilus</i> 16	$2,17(\pm 0,37) \times 10^9$	$0,365 \pm 0,048$	$6,73 \pm 0,20$

*: КОЕ – колониеобразующие единицы; **: ОП – оптическая плотность

Все исследуемые штаммы при культивировании посевного материала в колбах достигли высокой численности в пределах одного порядка. Для всех 3-х штаммов вида *B. pumilus* зафиксировали схожие показатели оптической плотности и pH в пределах оптимальных значений. Согласно микроскопическим исследованиям культуральной жидкости бацилл, через 18–24 ч культивирования в поле микроскопа выявили преобладание вегетативных клеток, споры не обнаружили (Malkova et al., 2021). Далее посевной материал перенесли в биологический реактор.

После засева ферментера температуру культуральной жидкости поддерживали на уровне 37 °С, а скорость мешалки – 250 об/мин. Подачу стерильного воздуха в начале процесса осуществили в количестве 0,5 л/мин. pH среды в первые часы культивирования удержали с помощью 20 % раствора гидроксида натрия в диапазоне $7,0 \pm 0,2$. С периодичностью осуществили

стерильный отбор проб для проведения наблюдений за развитием культуры *B. pumilus*, ее морфологическим состоянием и отсутствием посторонней микрофлоры. Также измерили оптическую плотность культуральной жидкости. Показатели ферментации отобранных штаммов представлены в таблице 16. Первоначальное значение оптической плотности среды по ферментациях в среднем составило $0,493 \pm 0,115$.

Таблица 16 – 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

Для всех изучаемых штаммов при культивировании в биологическом реакторе отметили схожее развитие. В начале ферментации зафиксировали активное увеличение количества клеток бактерий в соответствии с микроскопическим анализом, что соотносилось с изменением ОП в большую сторону. Соответственно, в первые часы культивирования штаммы *Bacillus* spp. активно потребляли питательные вещества из среды и закислили ее, поэтому мы осуществляли автоматическое титрование культуральной жидкости до нейтральных значений активной кислотности. При этом штамм *B. pumilus* 16 уже на 4 ч ферментации сдвинул значение pH в сторону более щелочных значений, а штамм *B. pumilus* 7 – к 6 часу. В условиях повышения кислотности началось спорообразование.

В промежутке 18–24 ч от начала ферментации ОП перестала меняться, по микроскопическому анализу выявили преобладание спор над вегетативными клетками (рисунок 17), кислород перестал потребляться. Все это послужило сигналом о необходимости окончания процесса культивирования бацилл в ферментере. Несмотря на несколько отличающиеся показатели ферментации у разных штаммов, это существенно не повлияло на длительность культивирования.

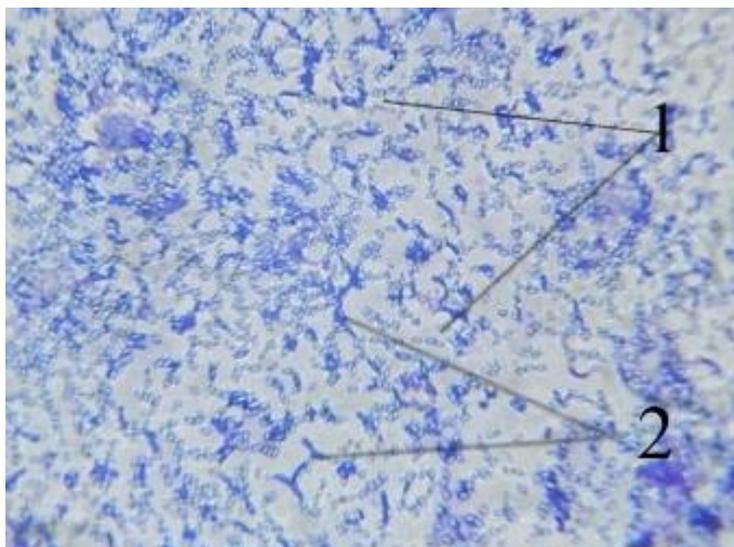


Рисунок 17 – Микроскопический препарат штамма *B. pumilus* 16 через 24 ч ферментации: 1 – споры, 2 – вегетативные клетки ($\times 1000$)

В условиях культивирования в биологическом реакторе численность клеток каждого штамма достигла 10^{10} КОЕ/мл. Т.е. титр увеличился на один порядок по сравнению с посевным материалом (таблица 17).

Таблица 17 – Изменение численности бактерий после культивирования в ферментере

Штамм	Титр с ферментера, КОЕ/мл ($M \pm m$)*	Кратная прибавка по сравнению с посевным материалом
<i>B. pumilus</i> 4	$3,40(\pm 0,99) \times 10^{10}$	$1,08 \times 10$
<i>B. pumilus</i> 7	$1,27(\pm 0,15) \times 10^{10}$	$0,89 \times 10$
<i>B. pumilus</i> 16	$4,25(\pm 0,86) \times 10^{10}$	$1,96 \times 10$

*: КОЕ – колониеобразующие единицы

Таким образом, выбранные параметры культивирования в ферментационном аппарате оказались благоприятными для всех исследуемых штаммов. Данный вывод сделали в виду высокого выхода клеточной биомассы, являющейся целевым продуктом ферментации для производства прототипа биопрепарата.

4.3. Технология получения прототипа биопрепарата

Известны микробные препараты для растениеводства, представляющие собой культуральную жидкость микроорганизмов. Однако их срок годности без добавления консервантов ограничен (Саламатова и др., 2010; Штерншис, 2012; Кожемяков и др., 2015). Поэтому разрабатываемый опытный биопрепарат произвели в порошкообразном виде. Что привело к включению в технологическую цепочку по производству нескольких дополнительных этапов (рисунок 18).



Рисунок 18 – Схема получения прототипа биопрепарата для растениеводства

В предыдущих пунктах главы подробно рассмотрели этапы 1 и 2, поэтому в данном пункте описали последующие стадии производства.

Центрифугирование. Так как целевой продукт ферментации – клеточная биомасса, то по окончании процесса культивирования ее отделение от культуральной жидкости. Концентрирование осуществили на центрифуге SIGMA 4-16S/KS в течение 20 минут при 4100 об/мин. Получавшийся супернатант в дальнейших этапах производства прототипа препарата не использовали.

Лиофилизация. Полученную на предыдущей стадии клеточную биомассу предварительно смешали с криопротекторной средой в соотношении 1:1, распределили в простерилизованные лотки слоем 1,0-1,5 см и заморозили при температуре $(-25)^\circ\text{C}$ (в течение не менее 12 часов). После этого осуществили высушивание в лиофилизаторе Epsilon 1-4 LSCplus в течение порядка 2-х суток на автоматической программе для клеток микроорганизмов. В результате, после ферментации бацилл в биореакторе получили в среднем $113,28 \pm 32,43$ г концентратов каждого штамма *B. pumilus*.

Гомогенизация и смешивание концентратов. Перед смешиванием концентраты каждого из штаммов гомогенизировали для достижения однородной консистенции с помощью «Blixer 5 Plus». Далее все лиофилизаты проверили на содержание менее 5 % влаги в анализаторе влажности Shimadzu MOC63u. После этого получили опытный препарат путем смешивания концентратов всех 3-х штаммов в соотношении 1:1:1 с помощью «Blixer 5 Plus». Первоначально получили порядка 200 г прототипа биопрепарата для защиты растений. Часть опытной партии биопрепарата отправили на хранение при температурах $4-6^\circ\text{C}$ и 25°C в герметичных упаковках.

Для определения численности и чистоты лиофилизированных концентратов *Bacillus* spp. и прототипа биопрепарата их восстановили следующим образом: 5 г концентрата/прототипа препарата растворили в колбе с 50 мл стерильной дистиллированной воды и отправили на качалку на 30–40 минут для регидратации. Для дальнейшего исследования использовали чашечный метод Коха.

Численность клеток всех исследуемых штаммов после лиофильной сушки увеличилась практически на порядок, в сравнении с титром с биореактора. Несмотря на то, что наибольшее значение КОЕ/г с ферментера отметили у штамма *B. pumilus* 16, после сушки наибольшую численность зафиксировали для концентрата *B. pumilus* 7. Однако различия оказались не столь значительными (таблица 18).

Таблица 18 – Численность бактерий *B. pumilus* в концентратах и опытном биопрепарате (M±m)

Штамм	Титр лиофилизированного концентрата, КОЕ/г*	Кратная прибавка по сравнению с титром с ферментера	Титр готового препарата, КОЕ/г
<i>B. pumilus</i> 4	$2,65(\pm 0,83) \times 10^{11}$	$0,78 \times 10$	$1,29(\pm 0,30) \times 10^{12}$
<i>B. pumilus</i> 7	$4,93(\pm 1,53) \times 10^{11}$	$3,88 \times 10$	
<i>B. pumilus</i> 16	$3,97(\pm 1,05) \times 10^{11}$	$0,93 \times 10$	

*: КОЕ – колониеобразующие единицы

Численность бактерий в опытном биопрепарате сразу же после смешивания оказалась еще на порядок выше, чем в каждом из концентратов. Поэтому практически установленная численность КОЕ/г в опытном препарате совпала с математическими расчетами по сложению титров концентратов всех штаммов *B. pumilus*. Что дополнительно указало на биосовместимость этих культур. Однако первоначально запланировали титр на уровне не менее 1×10^{11} КОЕ/г.

Колонии штаммов *B. pumilus* слабо дифференцируемы друг от друга. Поэтому численность каждого из штаммов в опытном препарате не установили. Однако выделили как минимум 2 морфотипа колоний (рисунок 20, А) на L-агаре. Колонии первого морфотипа охарактеризовали как бело-кремовые, круглые, приподнятые, складчатые, 2–3 мм в диаметре. Колонии второго типа похожи на вышеописанные, однако для них отметили больший диаметр (5–7 мм) и меньшую выраженность складчатости.

По описанной выше схеме произвели прототип поликомпонентного биопрепарата на основе 3-х штаммов *B. pumilus* взятых в равных пропорциях. Опытный препарат для защиты и стимуляции роста растений получили в виде

коричневого лиофилизированного порошка. Итоговый титр бацилл и их спор составил не менее 1×10^{11} КОЕ/г.

4.4. Установление сроков годности опытного образца препарата

Часть первой полученной опытной партии препарата оставили с целью установления срока хранения. Для определения срока годности разработанного опытного биопрепарата для растений зафиксировали изменение титра бацилл в ходе хранения при 4–6 °С (рисунок 19). Также взяли на контроль возможность обсеменения опытного препарата бактериями группы кишечной палочки (БГКП).

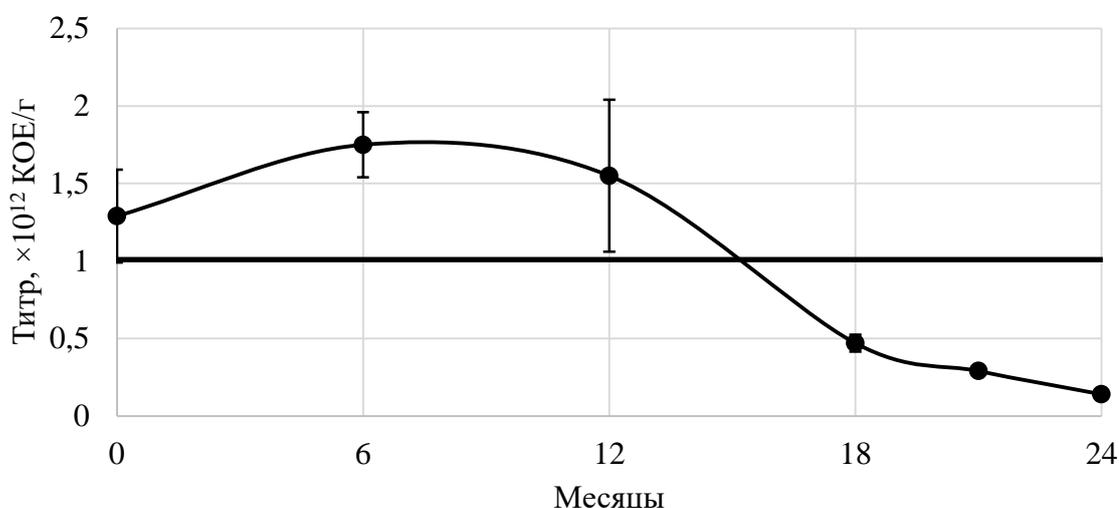


Рисунок 19 – Хранение опытного биопрепарата

В ходе хранения в течение 2 лет титр опытного препарата не опустился ниже целевого значения – 1×10^{11} КОЕ/г. При этом, после 12 месяцев хранения зафиксировали снижение титра с 10^{12} до 10^{11} КОЕ/г, что все еще соответствовало целевой численности. Кроме того, в соответствии с данными в п. 5.6. эффективность прототипа препарата также не снизилась. БГКП при посеве препарата не обнаружили ни разу.

Часть опытной партии препарата оставили на хранение при температуре около 25 °С. При посеве через 21 месяц титр составил $3,39(\pm 0,30) \times 10^{11}$ КОЕ/г. Что совпало с данными при хранении в условиях холодильника. БГКП также не выявили. Поэтому предварительно заключили, что срок хранения прототипа биопрепарата на основе штаммов *B. pumilus* составил не менее 24 месяцев при температуре от 4 до 25

°С. Но для установления окончательного срока годности необходимо провести дальнейшее отслеживание.

Стоит отметить, что в ходе хранения опытный препарат остался поликомпонентным. Так как при посеве выявили сохранение нескольких морфотипов колоний. Но штаммы также оказались слабо дифференцируемы между собой (рисунок 20, Б).

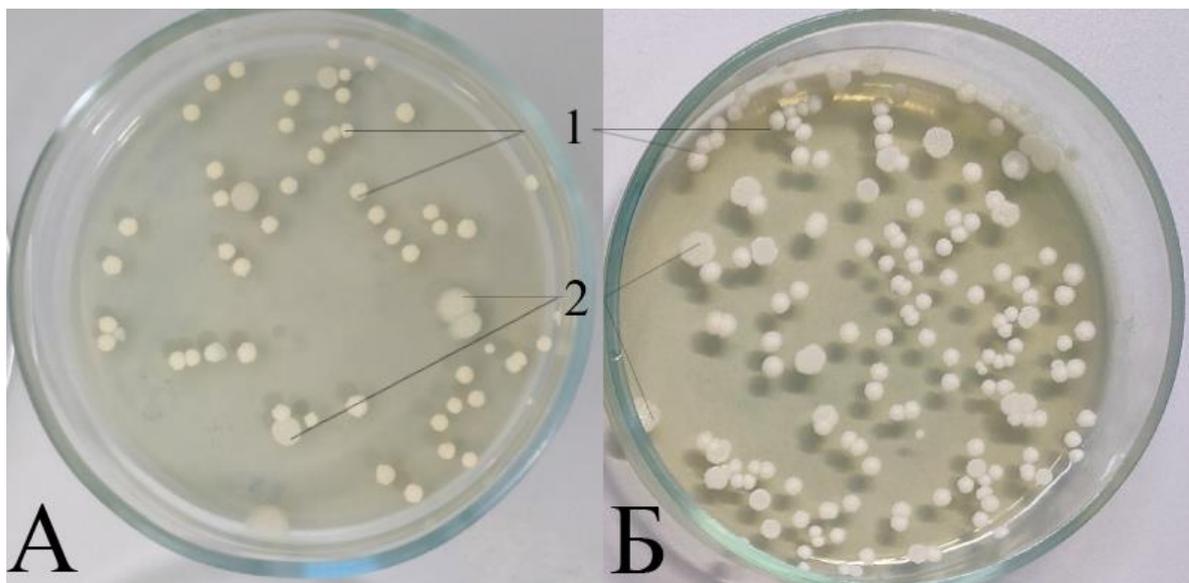


Рисунок 20 – Морфология колоний штаммов *B. pumilus* в опытном биопрепарате: А – сразу после смешивания, Б – через 12 месяцев хранения. 1 – колонии первого морфотипа, 2 – колонии второго морфотипа

Также в ходе хранения сохранились цвет и консистенция опытного препарата, аналогичные виду концентратов каждого из штаммов *B. pumilus*. Посторонние запахи не выявили.

Таким образом, отслеживаемые микробиологические свойства разработанного прототипа биопрепарата для растений сохранились в ходе хранения в течение не менее 24 месяцев. Критериями для оценки послужили сохранение микробной чистоты и консистенции, отсутствие посторонних запахов, а также титр не менее 1×10^{11} КОЕ/г.

4.5. Способ применения опытного биопрепарата

На основе полученных данных в предыдущих пунктах главы сформировали первичные ТУ (ТУ 20.15.80-002-02067818-2022, введено впервые 23.09.2022 г.), ТИ (приказ ректора от 31.10.2022 г. №1551/п) на производство опытных партий препарата и зарегистрировали каталожный лист продукции (№ 080.007967)

(приложение Г). Прототип биопрепарата назвали «Фитопумилин». Транспортирование и хранение опытного препарата необходимо реализовывать согласно ГОСТ 28471-90. Помещения для хранения должны быть сухими, чистыми и хорошо вентилируемыми, температура – от 0 °С до + 25 °С.

Так как разработанное опытное средство для растений – лиофилизированный порошок, а при сухой обработке он мог неравномерно распределяться на семенах (Ламан и др., 2006; Галимов, 2021), то перед применением необходимо готовить рабочий раствор. Т.е. для предложенного прототипа биопрепарата в качестве способа применения выбрали полусухое протравливание.

В соответствии с «Государственным каталогом пестицидов и агрохимикатов» (2022) расход рабочей жидкости микробных препаратов при предпосевной обработке семян как правило составляет 10 л на 1 т семенного материала. При этом рецептура рабочей смеси варьирует и не всегда коррелирует с титром биопрепарата и видом растений.

Рабочий раствор разработанного прототипа биопрепарата готовили из расчета 1 г концентрата на 100 мл воды. Титр рабочей смеси – не менее 1×10^9 КОЕ/мл. Этого объема жидкости достаточно для обработки 10 кг семян, т.е. расход – 0,1 г на 1 кг семян. Суспензию опытного препарата по указанной выше методике готовили непосредственно перед экспериментами, описанными в следующей главе.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗРАБОТАННОГО ОПЫТНОГО БИОПРЕПАРАТА

5.1. Антагонистическое действие бактериального консорциума из прототипа биопрепарата по отношению к грибным фитопатогенам

Несмотря на то, что для отдельных штаммов *B. pumilus* зафиксировали антимикотическую активность по отношению к ряду фитопатогенов, необходимо дополнительно проверить эффективность опытного препарата. В виду того, что для консорциума из нескольких штаммов может быть характерен другой уровень антагонистического действия к тем же тест-культурам. Поэтому антимикробную активность опытного биопрепарата проверили по отношению к тем же грибным культурам, что и каждый из *Bacillus spp.* по отдельности. Первоначально установили антифунгальное действие опытного средства для защиты растений методом агаровых блоков (таблица 19).

Таблица 19 – Антагонистическое действие прототипа биопрепарата по отношению к грибным тест-культурам, установленное методом агаровых блоков (M±m)

Микромицеты	Диаметры зон, занимаемых микромицетами в контроле, по суткам			Диаметры зон, занимаемых микромицетами в опыте, по суткам		
	3	10	14	3	10	14
<i>P. infestans</i>	17,50±0,58	55,5±0,71	95,33±0,58	6,57±0,41	.*	-
<i>Alternaria sp.</i>	24,50±2,65	80,00±1,41	84,67±0,58	7,60±1,82	8,50±1,52	8,50±1,52
<i>Penicillium sp.</i>	12,83±0,98	53,00±6,22	70,25±9,81	8,33±2,10	9,50±0,58	9,50±0,58
<i>Aspergillus sp.</i>	10,00±0,63	62,50±6,12	76,60±2,70	8,33±1,21	9,83±1,60	9,83±1,60

*. отсутствие мицелия

Бациллы в консорциуме также проявили противогрибковый эффект по отношению к грибным фитопатогенам, как и каждый штамм по отдельности. На это указали оптимальное развитие мицелия грибов в контрольных чашках и блокирование его роста в опытных. При этом гибель *P. infestans* в чашках с прототипом препарата произошла примерно на 7-е сутки эксперимента, в то время как штаммам *B. pumilus* по отдельности на полное подавление потребовалось около 2-х недель (Малкова и др., 2021). Т.е. по отношению к данному фитопатогену для опытного препарата зафиксировали более быстрый абсолютный антагонистический эффект.

Диаметр мицелия *Alternaria sp.* с композицией из штаммов *B. pumilus* составил 8,50 мм, что соответствовало среднему между значениями по каждому из штаммов. При этом рост микромицета в опытных чашках с отобранными штаммами бацилл по отдельности не прекратился и на 14-сутки исследования, а в данном случае диаметр гриба перестал меняться с 10-го дня эксперимента (Малкова и др., 2021). Это косвенно указало на синергизм 3-х штаммов *B. pumilus* при подавлении роста *Alternaria sp.*

Консорциум бацилл оказался более устойчивым к действию плесеней хранения (*Penicillium sp.* и *Aspergillus sp.*) в первые сутки исследования, по сравнению с каждым из штаммов отдельно. На это указало то, что композиция штаммов *Bacillus spp.* быстро начала расти, и в данном эксперименте зона отсутствия роста бацилл вокруг блоков с грибами была минимальной (Малкова и др., 2021). Поэтому можно предположить, что консорциум из штаммов *B. pumilus* более устойчив к антибиотикам, выделяемым *Penicillium sp.* и *Aspergillus sp.*, чем штаммы по отдельности на ранних сроках культивирования (рисунок 21). При этом конечный диаметр зон, занимаемых микромицетами в опытных чашках, в данном эксперименте оказался на несколько мм больше, чем с каждым из штаммов. Возможно, это связано с тем, что первоначально области, где отсутствовал рост микробов, фактически не проявились.

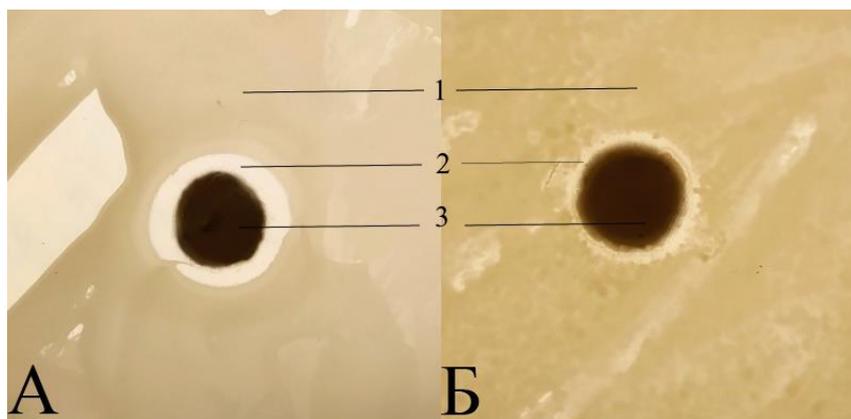


Рисунок 21 – Зоны отсутствия роста *Bacillus spp.* вокруг блоков с *Penicillium sp.* на 3-и сутки культивирования: А – с газоном штамма *B. pumilus* 7, Б – с газоном прототипа биопрепарата. 1 – газон бацилл, 2 – зона подавления роста, 3 – блок с микромицетом

Дополнительно антагонизм консорциума из опытного биопрепарата оценили с помощью метода параллельных штрихов (таблица 20). Культивирование осуществили при тех же температурных условиях, как и с применением метода блоков, но со всеми фитопатогенами использовали среду КСА.

Таблица 20 – Антагонистическое действие опытного биопрепарата по отношению к грибным тест-культурам, установленное методом параллельных штрихов

<i>Экспериментальные данные</i>							
Штаммы грибов	Параметры колонии грибов	Размер колонии микромицетов (M±m, мм) в контроле, по суткам			Размер колоний микромицетов (M±m, мм) в опыте, по суткам		
		3	10	14	3	10	14
<i>P. infestans</i>	Длина*	12,50± 3,54	на всю чашку	на всю чашку	9,67± 1,53	19,00± 1,00	19,67± 0,58
	Ширина	11,50± 2,12			9,00± 1,00	13,00± 1,00	16,33± 0,58
<i>Alternaria sp.</i>	Длина	31,33± 3,21	на всю чашку	на всю чашку	21,00± 3,61	44,67± 5,51	50,33± 3,51
	Ширина	28,33± 3,10			17,00± 2,65	35,33± 0,58	49,67± 4,51
<i>Penicillium sp.</i>	Длина	27,33± 5,51	60,00± 4,00	71,00± 5,57	21,00± 3,61	45,00± 3,00	60,00± 5,57
	Ширина	25,00± 6,00	55,33± 1,53	65,00± 1,00	17,00± 2,65	38,67± 1,53	51,00± 4,36
<i>Aspergillus sp.</i>	Длина	на блоке	39,67± 2,52	57,00± 7,00	на блоке	23,33± 3,10	35,00± 5,57
	Ширина		36,67± 2,52	54,33± 5,51		20,67± 2,08	33,00± 6,00
<i>Степень антагонистической активности</i>							
Штаммы грибов	Площадь колонии грибов в контроле на 14 сутки, см ²		Площадь колонии грибов в опыте на 14 сутки, см ²		Показатель подавления, %		
<i>P. infestans</i>	63,59		2,52		96,03		
<i>Alternaria sp.</i>	63,59		19,62		69,14		
<i>Penicillium sp.</i>	36,23		24,02		33,69		
<i>Aspergillus sp.</i>	24,31		9,07		62,71		

*: за длину колонии грибов принимали величину, параллельную штриху бактерий, ширину – перпендикулярную штриху бактерий

При использовании данного метода определения антагонистической активности антигрибковый эффект прототипа препарата оказался не столь абсолютным, как с методом блоков. Возможно, это обусловлено тем, что в данном случае площадь, занимаемая бациллами, меньше – только два штриха, а не вся поверхность чашки. Поэтому в толщу среды диффундировало меньшее количество антифунгальных веществ. Но все же угнетающий эффект регистрировали со всеми фитопатогенами. Значительного роста колоний грибов в длину по сравнению с ростом в ширину также не отметили в опытных чашках по сравнению с контрольными. Штрихи *Bacillus spp.* в ходе эксперимента также больше распространились по чашке.

Наиболее сильное действие опытного препарата на основе консорциума из штаммов *B. pumilus* вновь зафиксировали против *P. infestans*. При этом, очевидно, что КСА оказалась более оптимальной питательной средой для этого фитопатогена, чем питательный агар, так как в данном эксперименте микромицеты распространились по площади контрольных чашек уже к 10-м суткам (90 на 90 мм). В опытных же пробах параметры колонии гриба к окончанию эксперимента в среднем составили 19,67 на 16,33 мм, а показатель подавления роста – 96 %.

Для *Alternaria sp.* КСА также оказался наиболее благоприятной средой. При этом рост микромицета в опытных чашках продолжился после 10 суток эксперимента, чего не наблюдали с применением метода агаровых блоков. Однако показатель подавления роста гриба оказался на высоком уровне – более 69 %.

Самый слабый антагонистический эффект прототипа препарата при использовании данного метода отметили с *Penicillium sp.*, степень подавления составила менее 34 %. При этом на КСА также изменился цвет колоний гриба на более зеленый, как в опыте, так и в контроле. Но в опытных чашках интенсивность окраски оказалась ниже. Также отметили образование экссудата, флуоресценция отсутствовала.

Меньше всего КСА оказалась пригодной для культивирования *Aspergillus sp.*, так как с блока по чашке гриб стал распространяться только на 5-е сутки эксперимента, чего не наблюдали при росте на YEP-агаре. И к окончанию эксперимента размер колонии микромицета в контроле оказался самым маленьким среди других грибков (57,00 на 54,33 мм в среднем) (рисунок 22).

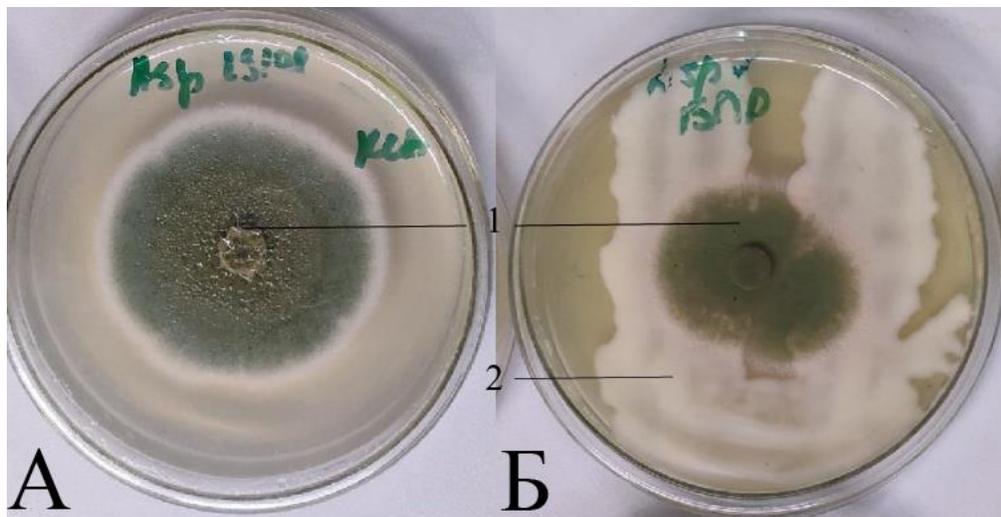


Рисунок 22 – Чашки с *Aspergillus sp.* на 14-й день эксперимента: А – контроль, Б – опыт. 1 – микромицет, 2 – бациллы

Кроме того, на КСА мицелий *Aspergillus sp.* изменился в окраске с красной на зеленую. Вероятно, что неблагоприятные условия для культивирования снизили способность микромицета противостоять действию бактерий из опытного препарата, поэтому показатель подавления его роста составил почти 63 %, хотя раньше был близок к *Penicillium sp.*

Антифунгальную активность прототипа биопрепарата по отношению к фитопатогенам проверили также в лаборатории технологии микробных препаратов ВНИИСХМ. Антагонизм опытного средства защиты растений изучили против 11 микромицетов. На рисунках 23 и 24 представлены результаты по антифунгальной активности биопрепарата против фитопатогенов из коллекции ВНИИСХМ, установленные методами колодцев и параллельных штрихов на среде PDA (картофельно-декстрозный агар).

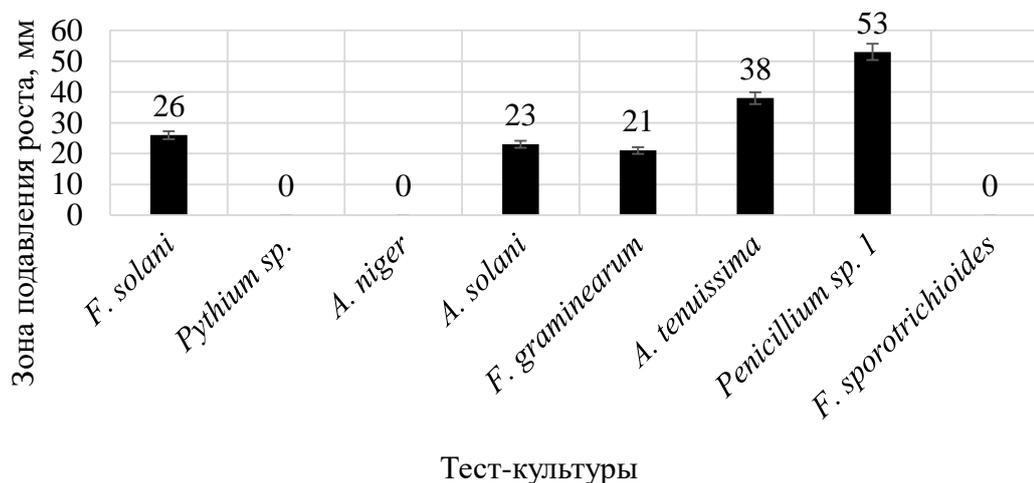


Рисунок 23 – Антифунгальная активность прототипа биопрепарата, установленная методом колодцев

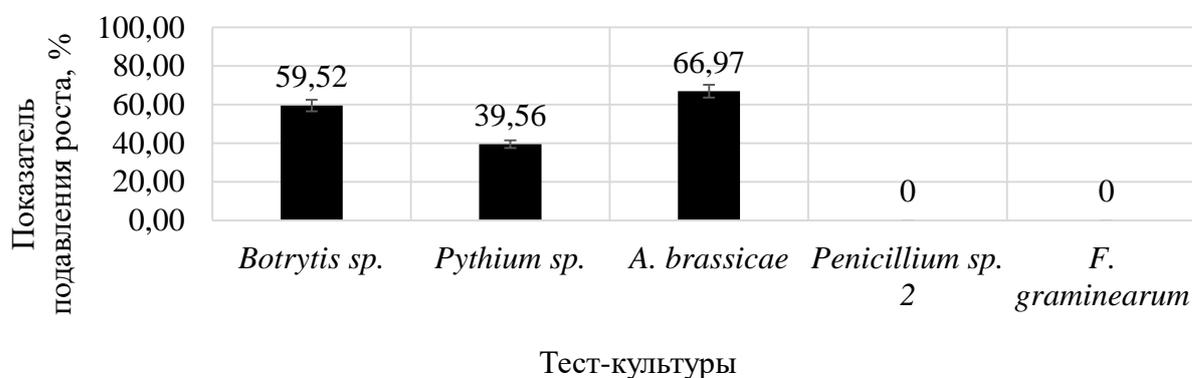


Рисунок 24 – Антифунгальная активность прототипа биопрепарата, установленная методом параллельных штрихов

Для опытного биопрепарата зафиксировали антагонистическую активность почти ко всем исследованным штаммам грибов (кроме *A. niger* и *F. sporotrichioides*). При этом этот эффект проявился по-разному – в виде образования зон отсутствия роста микромицетов, уменьшения размера их колоний, снижения интенсивности окраски грибов (рисунок 25). По отношению к некоторым штаммам грибов отследили антифунгальное действие только при использовании одного метода (*Pythium sp.*, *F. graminearum*). Поэтому для определения наиболее полного спектра антагонистического действия препаратов необходимо использовать различные техники и штаммы тест-культур. Методом колодцев для прототипа препарата зафиксировали самый сильный антагонистический эффект по отношению к *Penicillium sp. 1*, а методом параллельных штрихов – по отношению к *A. brassicae*.

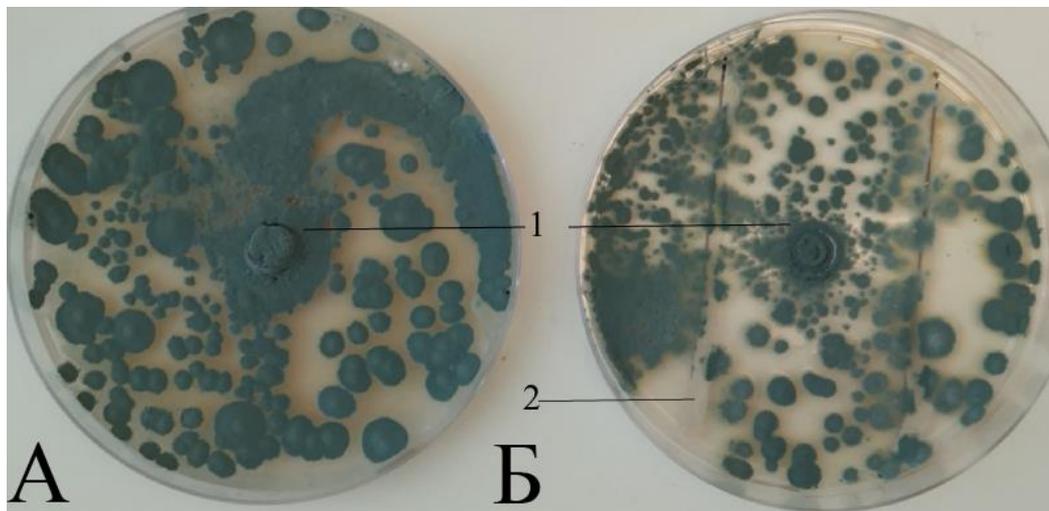


Рисунок 25 – Чашки с *Penicillium sp. 2* к окончанию эксперимента: А – контрольная, Б – опытная. 1 – микромицет, 2 – штрих бацилл

Эти данные во многом сошлись с полученными в нашей лаборатории результатами. Так, во ВНИИСХМ установили антифунгальное действие опытного препарата против 3-х штаммов *Alternaria spp.* различными методами. Причем показатель подавления *A. brassicae* оказался близким с нашим штаммом *Alternaria sp.* (66,97 и 69,14 % соответственно). Кроме того, в данном случае отметили также изменение окраски штрихов бацилл в непосредственной близости с микромицетом – с бело-кремовой на желтую (рисунок 26). Что вероятно связано с продукцией антифунгальных или защитных соединений.

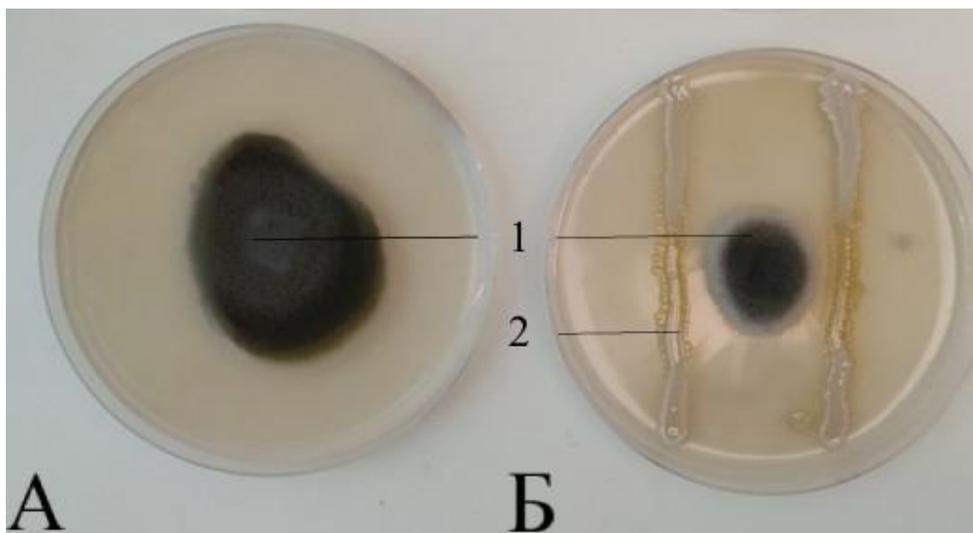


Рисунок 26 – Чашки с *A. brassicae* к окончанию эксперимента: А – контрольная, Б – опытная. 1 – микромицет, 2 – штрих бацилл

И в ИЦ «Промбиотех», и во ВНИИСХМ получили подтверждения антагонизма прототипа биопрепарата против штаммов *Penicillium* spp. Причем при использовании метода параллельных штрихов в обеих лабораториях отметили снижение интенсивности окраски мицелия в опытных чашках (со штаммами *Penicillium* sp. 1 и *Penicillium* sp. 2). Возможно, в лаборатории ВНИИСХМ не получили числового выражения антагонистического эффекта при использовании данной техники из-за особенностей штамма *Penicillium* sp. 2 (рост множеством колоний с блоков, а не единой колонией). Зато при использовании метода колодцев, когда штамм *Penicillium* sp. 1 засеяли в газон, зафиксировали самую большую зону угнетения роста (53 мм, рисунок 27).

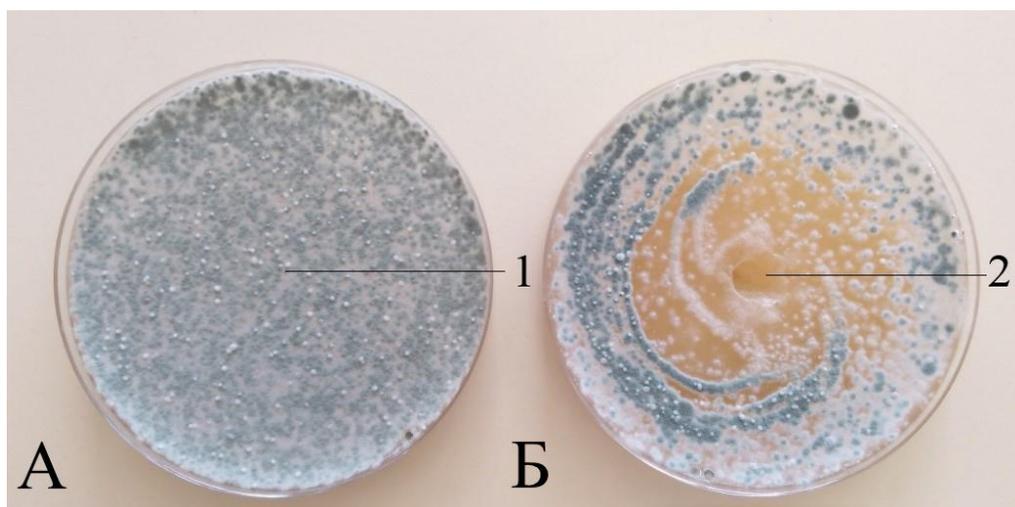


Рисунок 27 – Антагонистическая активность бацилл из прототипа биопрепарата против *Penicillium* sp. 1: А – контрольная чашка, Б – опытная чашка. 1 – газон микромицета, 2 – колодец с бактериальным консорциумом

Опытный биопрепарат не проявил антагонизма против штамма *A. niger*, хотя во ВНИИСХМ исследование провели только одним методом, поэтому нужны дополнительные эксперименты. Штамм *Aspergillus sp.* из коллекции нашего центра очевидно не принадлежит к виду *A. niger* из-за другой окраски мицелия.

Таким образом, разработанный прототип препарата обладает достаточно широким спектром антагонистической активности против грибных фитопатогенов, вызывающих заболевания сельскохозяйственных культур – *P. infestans*, *Penicillium sp.* (3 штамма), *Aspergillus sp.*, *Alternaria sp.*, *A. solani*, *A. tenuissima*, *A. brassicae*, *F. solani*, *F. graminearum*, *Pythium sp.*, *Botrytis sp.* (Woudenberg et al., 2013; Сокирко и др., 2014; Соколова, 2019). Хотя реальный диапазон антифунгального действия опытного препарата, вероятно, шире. Так как условия эксперимента (используемые методики, тест-культуры, питательные среды и пр.) могут способствовать запуску различных механизмов антагонизма, и соответственно, не всегда возможно зафиксировать положительный эффект. Кроме того, активность в лабораторных условиях зачастую не полностью соотносится с результатами в рамках промышленного испытания. Поэтому для получения более полной картины о возможной эффективности прототипа препарата провели дальнейшие исследования.

5.2. Приживаемость бактерий из опытного биопрепарата на семенах рапса, овса, гречихи и подсолнечника

При оценке эффективности биопрепарата для растениеводства в первую очередь ориентируются на его биологическую активность – антифунгальные свойства, продукцию фитогормонов и пр. (Леонтьевская, 2014). Однако другим немаловажным фактором, влияющим на эффективность микробного средства, является приживаемость действующих бактерий на обрабатываемых семенах.

Исследуемые семена обработали рабочим раствором прототипа биопрепарата (опыт). А далее рассеяли на численность сразу после протравливания, через сутки и через неделю. Чашки каждый раз проинкубировали при 37 °С в течение 24 часов. Параллельно заложили эксперимент, в котором контрольные (необработанные) и опытные семена распределили непосредственно на поверхность агаризованной L-среды для визуальной оценки приживаемости бактерий из прототипа биопрепарата. В данном случае инкубирование произвели в течение 72 ч. (Малкова и др., 2022).

В соответствии с данными в таблице 21, численность микроорганизмов на обработанных семенах у всех культур увеличилась в сравнении с контролем. Наименее обсемененными оказались необработанные семена овса.

Таблица 21 – 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 – колониеобразующие единицы

При расसेве на титр обработанных семян сразу после протравки опытным биопрепаратом отметили увеличение численности микроорганизмов по отношению к контрольным образцам на 2–3 порядка. После хранения обработанных семян в течение суток и недели отметили сохранение титра *Bacillus* spp. в том же порядке. Следовательно, посев семян в полевых условиях возможно производить как в первые часы после обработки, так и после хранения сроком не менее 7 дней, что практически для промышленного возделывания культур.

При непосредственном распределении семян на чашки зафиксировали, что морфология колоний микроорганизмов в контроле различна. В опыте же вокруг каждого семени всех растений отметили рост бактерий с характерной морфологией действующих штаммов опытного препарата (кремовые с неровным краем и складчатостью). На микроскопии также выявили палочки небольшого размера, похожие на исследуемые штаммы *B. pumilus*.

Обсемененность рапса в контроле оказалась невысокой, об этом свидетельствовало то, что колонии бактерий выросли не вокруг всех семян (рисунок 28). На это могло повлиять то, что рапс предварительно обработали протравителем «Круйзер, КС». Кроме того, L-агар – не универсальная среда, как и температура 37 °С, поэтому не все микроорганизмы выросли в данных условиях. Но, даже несмотря на это, выявили, что колонии в контрольной чашке не однородны по своей морфологии. А в опыте они оказались однотипными и характерными для штаммов *B. pumilus* из прототипа биопрепарата, кроме того, выросли возле каждого семени.

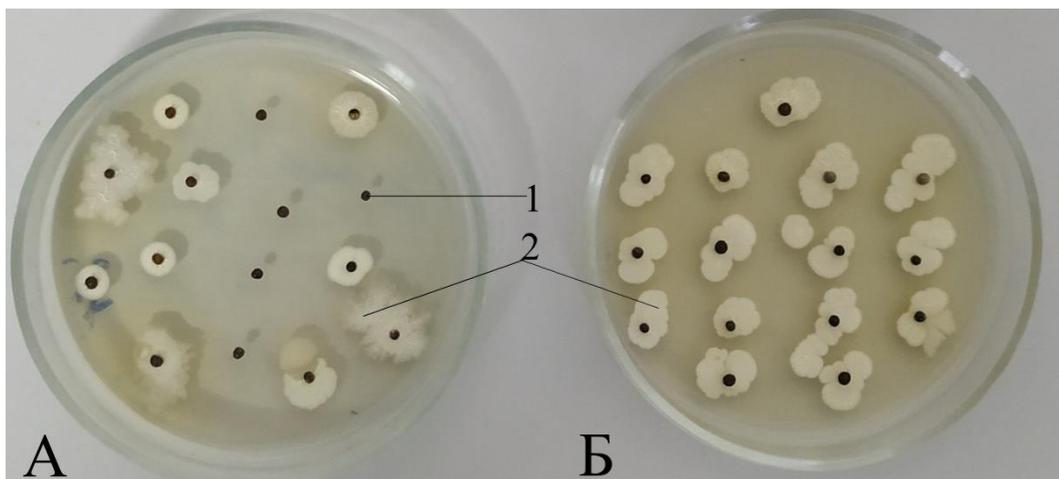


Рисунок 28 – Семена рапса на агаризованной среде после 3 суток культивирования: А – контрольные, Б – обработанные. 1 – необсемененное семя, 2 – колонии бактерий

Для контрольных семян овса выявили большую обсемененность, чем для семян рапса – колонии бактерий отметили возле каждой семечки. Однако определили, что колоний бактерий в контроле относились к разным морфотипам в отличие от опытных. Флора контрольного образца гречихи также была представлена несколькими типами колоний, а в опытной чашке выросли однотипные колонии, характерные для штаммов *B. pumilus* (рисунок 29).

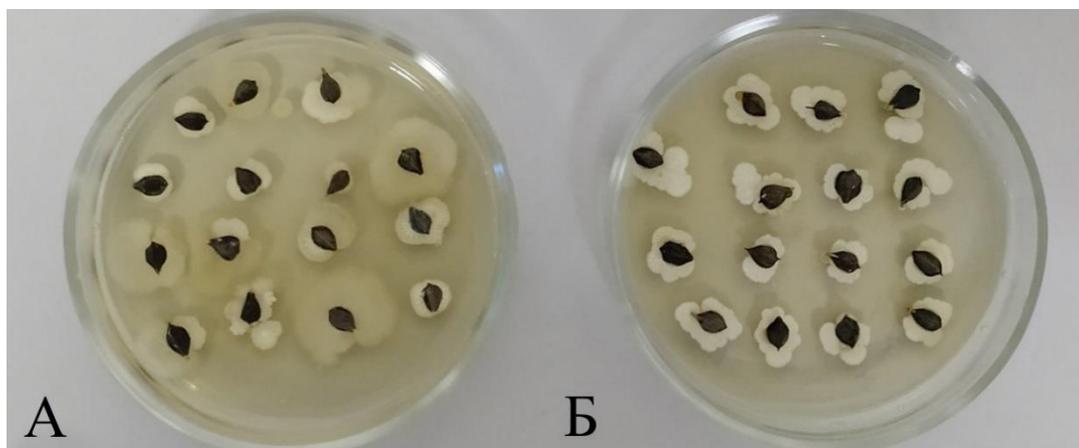


Рисунок 29 – Семена гречихи на агаризованной L-среде после 3 суток культивирования: А – контрольная чашка, Б – опытная чашка

Семена подсолнечника оказались самыми обсемененными из всех, так как помимо бактериальной флоры идентифицировали и микромицеты. Благодаря этому дополнительно подтвердили антагонистический эффект бактерий из опытного препарата по отношению к микроскопическим грибам – в опытных образцах мицелий фактически не развивался (рисунок 30). В других наших исследованиях мы установили, что на данных семенах подсолнечника при проращивании развиваются грибы родов *Mucor*, *Botrytis* и *Penicillium* (Малкова и др., 2021). Фунгистатическое

действие опытного препарата против двух последних и других фитопатогенов показаны в предыдущем пункте.

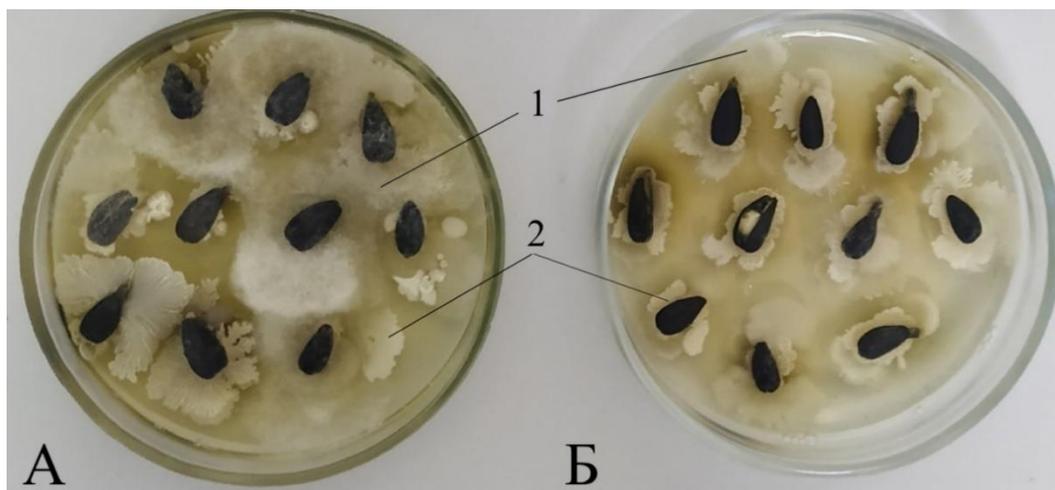


Рисунок 30 – Семена подсолнечника на агаризованной среде после 3 суток культивирования: А – контрольные, Б – обработанные.
1 – колонии микромицетов, 2 – колонии бактерий

Таким образом можно заключить, что бактерии опытного биопрепарата обладают хорошей приживаемостью на семенах, позволяющей хранить обработанный семенной материал сроком не менее одной недели. Кроме того, в данном опыте также подтвердили способность консорциума на основе штаммов *B. pumilus* угнетать рост неблагоприятной грибной флоры. Данный эксперимент позволил сделать вывод о том, что расход опытного препарата на массу семян рассчитан верно, так как все семена оказались обработанными, в виду того, что вокруг каждого из них проросли бактерии из опытного средства для растений.

5.3. Биосовместимость бактериальной композиции из прототипа препарата с микроорганизмами из других биопрепаратов

Как для разработки биопрепарата, так и при оценке возможности совместного применения нескольких микробных препаратов одновременно важно учитывать биосовместимость штаммов из их составов. В соответствии с «Государственным каталогом пестицидов и агрохимикатов» (2022) наиболее распространенными компонентами биопестицидов являются представители рода *Bacillus* среди бактерий и представители рода *Trichoderma* среди грибов. На основании этого подобрали следующие тест-культуры (таблица 22).

Таблица 22 – Источники выделения тест-культур для данного исследования

№ штамма	Штамм	Название биопрепарата	Тип биопрепарата	Препаративная форма
1	<i>B. subtilis</i> В-10	«Алирин-Б»	фунгицид	таблетки
2	<i>B. subtilis</i> 26Д	«Фитоспорин М»	фунгицид, бактерицид	порошок
3	<i>B. subtilis</i> Ч-13	«Экстрасол»	фунгицид, бактерицид	жидкость
4	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	«Лепидоцид»	инсектицид	жидкость
5	<i>Metarhizium anisopliae</i>	«Метаризин»	инсектицид	порошок
6	<i>T. viride</i> 471	«Триходерма вериде»	фунгицид, бактерицид	порошок
7	<i>T. harzianum</i> Г 30 ВИЗР	«Трихоцин»	фунгицид	порошок
8	<i>T. harzianum</i> 18 ВИЗР	«Глиокладин»	фунгицид	таблетки

Для определения биосовместимости консорциума штаммов *B. pumilus* с другими бактериями использовали метод перпендикулярных штрихов. А в случае с микромицетами – метод параллельных штрихов.

Как видно из таблицы 23 консорциум *Bacillus* spp. из опытного биопрепарата однозначно совместим со штаммами *B. subtilis* В-10 и *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Поэтому разработанное опытное средство для защиты растений возможно применять совместно с биопестицидами «Алирин-Б» и «Лепидоцид».

Таблица 23 – Совместимость консорциума бактерий из опытного биопрепарата (БПР) с бациллами из коммерческих биопестицидов (М±m)

Штаммы по вертикали	Штаммы по горизонтали				
	БПР	<i>B. s.</i> В-10	<i>B. s.</i> 26Д	<i>B. s.</i> Ч-13	<i>B. thur.</i>
БПР		+	- (2,33±0,58)	- (21,67±2,08)	+
<i>B. s.</i> * В-10	+	не устанавливалось			
<i>B. s.</i> 26Д	+				
<i>B. s.</i> Ч-13	- (1,00±0,00)				
<i>B. thur.</i>	+				

*: *B. s.* – *B. subtilis*, *B. thur.* – *B. thuringiensis* var. *kurstaki*; **: «+» – биосовместимы, «-» – антагонизм (М±m в мм)

Со штаммом *B. subtilis* 26Д композиция из 3-х штаммов *B. pumilus* оказалась совместима только тогда, когда первым засеяли штамм из препарата «Фитоспорин М». В обратном же случае консорциум *Bacillus* spp. подавил рост тест-культуры на 2,33 мм в среднем. Поэтому совместное применение данных препаратов возможно, но оно должно быть либо единовременным, либо в первую очередь необходимо осуществлять обработку биопестицидом «Фитоспорин М».

Штамм *B. subtilis* Ч-13 и консорциум бацилл из прототипа биопрепарата оказались обоюдно несовместимыми. Причем бактерии из разработанного опытного средства защиты растений в среднем подавили рост штамма из препарата «Экстрасол» почти на 22 мм (рисунок 31). Вероятно, это связано с тем, что в данном случае штаммы *B. pumilus* накопили в среде высокую концентрацию бактериоцинов, эффективных против близкого вида *B. subtilis* (Тагиева, Гахраманова, 2020).



Рисунок 31 – Тест на биосовместимость консорциума штаммов *B. pumilus* со штаммом *B. subtilis* Ч-13: 1 – штрих бацилл из прототипа биопрепарата, 2 – штрих штамма *B. subtilis* Ч-13, 3 – зона подавления роста

В соответствии с данными в таблице 24, микроскопические грибы из биопрепаратов быстрее развились на КСА, нежели фитопатогенные микромицеты. Штаммы *T. viride* 471 и *T. harzianum* Г 30 за 7 суток распространялись по всей чашке в контроле, а некоторые образцы *T. harzianum* 18 развились до максимально возможной площади уже на 3 сутки эксперимента.

Таблица 24 – Совместимость консорциума бактерий из опытного биопрепарата со штаммами грибов из коммерческих биопестицидов

<i>Экспериментальные данные</i>							
Штаммы грибов	Параметры колонии грибов	Размер колонии микромицетов (M±m, мм) в контроле, по суткам			Размер колоний микромицетов (M±m, мм) в опыте, по суткам		
		3	10	14	3	10	14
		3	4	5	6	7	8
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>M. anisopliae</i>	Длина	25,00± 0,00	72,50± 2,12	77,00± 1,41	24,67± 0,58	59,67± 5,51	71,33± 2,52
	Ширина	26,00± 1,41	73,00± 0,00	76,00± 1,41	23,67± 0,58	31,33± 0,58	32,00± 0,00
<i>T. viride</i> 471	Длина	59,00± 4,58	на всю чашку	на всю чашку	46,33± 1,53	на всю чашку	на всю чашку
	Ширина	57,67± 2,52			31,67± 0,58		

Продолжение таблицы 24

<i>T. harzianum</i> Г 30	Длина	83,33± 11,55	на всю чашку	на всю чашку	65,33± 8,51	74,33± 13,65	84,00± 3,61
	Ширина	86,67± 5,77			29,67± 0,58	34,67± 6,11	38,00± 1,73
<i>T. harzianum</i> 18	Длина	85,33± 8,08	на всю чашку	на всю чашку	68,67± 1,15	75,33± 1,53	75,33± 1,53
	Ширина	85,00± 8,66			26,33± 1,53	27,33±0, 58	27,33±0, 58
Степень антагонистической активности							
Штаммы грибов		Площадь колонии грибов в контроле на 14 сутки, см²	Площадь колонии грибов в опыте на 14 сутки, см²	Показатель подавления, %			
<i>M. anisopliae</i>		45,94	17,92	60,99			
<i>T. viride</i> 471		78,50	78,50	0			
<i>T. harzianum</i> Г 30		78,50	25,10	68,08			
<i>T. harzianum</i> 18		78,50	16,16	79,41			

Первоначально зафиксировали фактически идентичные размеры колоний *M. anisopliae* в опыте и контроле (к 3 суткам). Однако в ходе дальнейшего культивирования площадь, занимаемая грибом в чашках с бактериями, оказалась меньше, чем в чистой культуре микромицета за это же время. К моменту окончания эксперимента степень подавления роста *M. anisopliae* бактериями из прототипа биопрепарата составила почти 61 %. Поэтому новый прототип биопестицида не рекомендовано применять с препаратом «Метаризин», так как микроорганизмы из их составов – не совместимы.

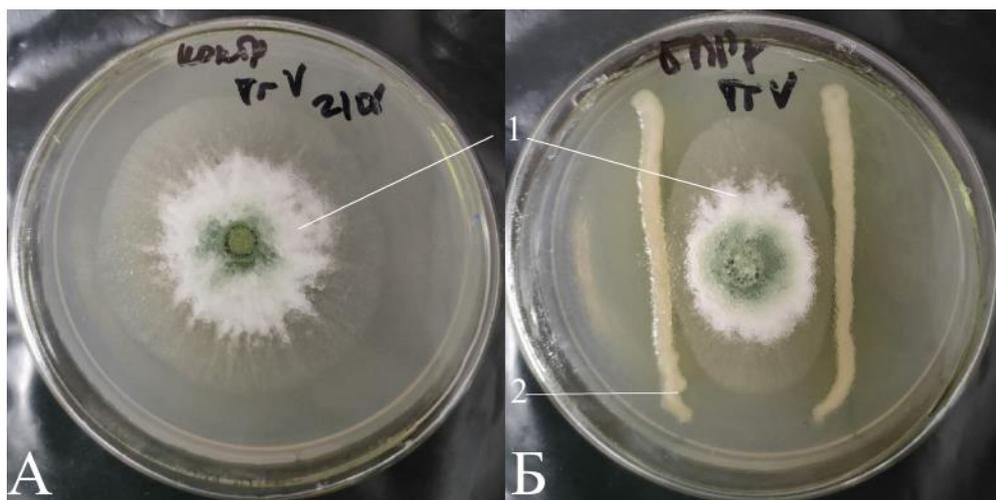


Рисунок 32 – Экспериментальные чашки с культурой *T. viride* 471 на 3-и сутки: А – контрольная, Б – опытная. 1 – культура микромицета, 2 – штрих бактерий

С представителями рода *Trichoderma* зафиксировали отличную картину – в первой контрольной точке исследований отметили более слабое развитие грибов в

опыте, чем в контроле. При этом выявили преобладание роста мицелия в длину, над ростом в ширину (рисунок 32). Вероятно, это связано с тем, что консорциум *Bacillus* spp. со штрихов выделил в среду свои продукты метаболизма.

При дальнейшем культивировании для штамма *T. viride* 471 зафиксировали равномерный рост мицелия по чашке (рисунок 33, А), как в опыте, так и контроле. И к окончанию эксперимента степень подавления роста гриба составила 0 %, поэтому штаммы из опытного бактериального препарата и «Триходерма вериде» можно считать относительно биосовместимыми.

А рост других представителей рода *Trichoderma* к 14-м суткам исследования также оказался замедленным в опыте по сравнению с контролем, как и в начале эксперимента. Мицелий грибов в образцах с бактериями не распространился сплошным газоном к краям чашки, а лишь в виде одиночных колоний, чего не зафиксировали в контроле (рисунок 33, Б). Поэтому разработанный прототип препарата не рекомендовано применять совместно с фунгицидами «Трихоцин» и «Глиокладин».

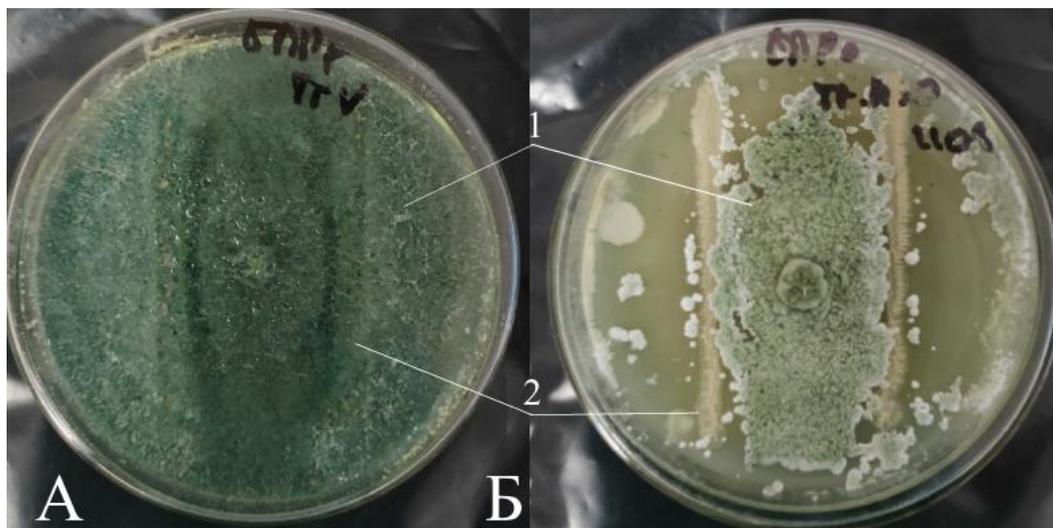


Рисунок 33 – Опытные чашка со штаммами *Trichoderma* spp. к окончанию эксперимента:
 А – со штаммом *T. viride* 471, Б – со штаммом *T. harzianum* Г 30.
 1 – микромицеты, 2 – штрихи бактерий

Таким образом, консорциум штаммов *B. pumilus* из прототипа биопрепарата оказался более совместимым с бактериальными штаммами, нежели грибными. Это могло быть обусловлено высокой фунгистатической активностью данной микробной композиции, предположительно, из-за способности к продукции сурфактинов, хитиназы и пр. (Ghasemi et al., 2010; Сидорова и др., 2021). Разработанное опытное средство для защиты растений возможно применять

совместно с такими биопрепаратами, как «Триходерма вериде», «Алирин-Б» и «Лепидоцид», а также с фунгицидом «Фитоспорин М» при соблюдении очередности обработки растений.

5.4. Возможность совместного использования опытного препарата с химическими протравителями семян

Интегрированная защита растений считается современным подходом в сельском хозяйстве. Поэтому важно оценивать совместимость микробиологических методов с другими способами защиты растений. Установлено, что биологические и химические пестициды эффективнее применять комплексно (Суханова и др., 2019).

В данной работе оценили выживаемость бактерий из опытного биопрепарата в растворе с протравителями семян, представленными в таблице 25. Нормы применения взяли с сайта «Премьер-Агро».

Таблица 25 – Характеристика использованных в работе протравителей семян

Название	Состав	Тип препарата	Норма применения
Престиж, КС*	имидаклоприд 140г/л + пенцикурон 150 г/л.	инсектофунгицид	10 мл препарата на 100 мл воды (на 10 кг клубней)
Инстиво, КС	тиаметоксам 350 г/л	инсектицид	0,5–1,0 л/т, 10 л/т расход рабочей жидкости
Баритон, КС	протиокназол 37,5 г/л + флуоксастробин 37,5 г/л	фунгицид	1,25-1,5 л/т, 10 л/т расход рабочей жидкости
Винцит, КС	флутриафол 25 г/л + тиабендазол 25 г/л	фунгицид	1,5-2 л/т, 4,5-10 л/т расход рабочей жидкости
Максим, КС	флудиоксонил 25 г/л	фунгицид	0,2-10 л/т, 6-15 л/т расход рабочей жидкости

*: концентрат суспензии

Эксперимент заложили с 6 вариантами, 1 из которых был контрольным, а остальные – опытными. Дозировки указаны в таблице 26.

Таблица 26 – Схема эксперимента с протравителями

Вариант	Расход рабочего раствора прототипа биопрепарата, мл	Расход протравителя (или воды), мл
1. Контроль (с водой)	9	1
2. Престиж	9	1
3. Инстиво	9	1
4. Баритон	8,5	1,5
5. Винцит	8	2
6. Максим	8	2

Протравливание семян химическими пестицидами можно осуществлять как непосредственно перед посевом, так и за 7–14 дней до этого без снижения

эффективности. Однако при обработке семян биопрепаратами рекомендовано проводить протравливание непосредственно перед посевом (Семьнина, 2013). Поэтому в данном эксперименте в качестве контрольных точек выбрали посеvy через час после смеси рабочего раствора разработанного прототипа препарата с химическими пестицидами и через сутки (таблица 27).

Таблица 27 – Влияние протравителей на численность бактерий из опытного образца биопрепарата ($M \pm m$)

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 – колониеобразующие единицы

В соответствии с полученными результатами прототип биопрепарата возможно применять совместно с пестицидами «Престиж», «Инстиво» и «Винцит». Так как зафиксировали титр в пределах одного порядка в опыте и контроле.

При этом посев семян, обработанных совместно опытным биопрепаратом и протравителем «Максим», необходимо производить в первые часы после обработки, так как титр бацилл при хранении данной смеси в течение суток снизился на один порядок по сравнению с контролем. Действующим компонентом фунгицида «Максим» является флудиоксонил из класса фенилпирролов, который вызывает ингибирование фосфорилирования глюкозы при клеточном дыхании, однако молекулярный механизм этого процесса еще до конца не выяснен. Во многих источниках для данного вещества указана исключительно фунгицидная активность и отсутствие выраженного токсического действия на защищаемое растение, теплокровных животных и полезные организмы. Сведения о влиянии флудиоксонила на бактерий в литературных данных фактически не встречаются. Однако другие исследователи установили, что препарат «Максим» в производственной дозе снижает численность *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008, а также изучили негативное воздействие самого флудиоксонила не только на фитопатогенные грибы, но и другие микроорганизмы – *Chlorella vulgaris*, *Candida albicans*, *S. cerevisiae*. Кроме того, известны и другие вещества не только с

фунгицидной, но и антибактериальной активностью, например, сурфактин (Попов и др., 2003; Сираева, 2012; Meena et al., 2015; Randhawa et al., 2018; Bersching and Jacob, 2021; Liu et al., 2022). Поэтому в данной сфере необходимы новые исследования.

С пестицидом «Баритон» уже через час после смешивания с опытным биопрепаратом отметили снижение титра в последнем. Что не изменилось и через сутки хранения. Поэтому с данным фунгицидом опытное средство для защиты растений не совместимо. В состав химиката входят протиоконазол (триазолы) и флуоксастробин (стробилурины). Если первое вещество ингибирует синтез стерина, то последнее – клеточное дыхание, в том числе и у бактерий (Зинченко, 2012).

Таким образом, опытный образец препарата оказался наиболее совместимым с 3 из 5 исследуемых пестицидов – «Престиж», «Инстиво» и «Винцит». Совместное использование прототипа биопрепарата с химикатами «Баритон» и «Максим» привело к снижению титра бактерий. Вероятно, это связано с тем, что данные фунгициды оказали негативное влияние на функционирование дыхательной цепи аэробных бактерий.

5.5. Биологическая эффективность прототипа биопрепарата при проращивании семян рапса, гречихи, овса и подсолнечника *in vitro*

С теми же культурами, на которых проверили приживаемость бактерий из опытного биопрепарата, установили и его эффективность при проращивании в лабораторных условиях. С овсом фактически на всех семенах как в опыте, так и контроле выявили рост грибов рода *Alternaria*, т.е. уровень их инфицированности – высокий. Однако это не сказалось на растениях, так как отметили активное развитие ростков и корней (таблица 28). Вероятно, данные микромицеты оказались представителями эпифитной микрофлоры исследуемых семян, и в термостате выдержали оптимальные условия для их роста. Угнетающего действия разработанного прототипа биопрепарата на данные микромицеты не зафиксировали.

Таблица 28 – Эффективность прототипа биопрепарата при проращивании семян овса в лабораторных условиях ($M \pm m$)

Вариант	Всходы, %	Высота проростков, мм	Длина корешков, мм
Контроль	98,00±1,63	82,56±8,91	82,68±15,84
Опыт	99,00±1,15	91,55±7,60	103,46±15,07
+/- к контролю	1,00	8,98	20,78
<i>HCP</i> ₀₅ *	2,45	3,17	7,29

*: *HCP*₀₅ – наименьшая существенная разность для 5 %-ого уровня значимости

Согласно полученным данным, опытный биопрепарат простимулировал прорастание семян овса. Значимого влияния на всхожесть не выявили, она и в контроле оказалась на высоком уровне, а прибавка к высоте проростков и длине корней была значима в опыте и составила почти 11 % и 25 % соответственно (рисунок 34).



Рисунок 34 – Проростки овса: А – в опыте, Б – в контроле

При этом механизм стимуляционного действия опытного биопрепарата в данном случае остался неясным, так как антагонизма по отношению к грибной микрофлоре овса (р. *Alternaria*) не выявили. Вероятно, это связано с продукцией штаммами *B. pumilus* фитогормонов, что характерно для бактерий данного вида по литературным данным (Malfanova et al., 2011; Mazylyte et al., 2022), но для подтверждения этого необходимы дополнительные исследования.

В рамках данного эксперимента на семенах рапса не зафиксировали грибных фитопатогенов при проращивании, однако ранее мы установили, что на них встречаются представители родов *Alternaria*, *Penicillium* и *Aspergillus*. Последние из них выделили в чистую культуру и использовали в экспериментах по определению антагонистической активности.

Следует отметить, что семена рапса как в опыте, так и контроле предварительно обработали инсектицидом «Круйзер». Поэтому положительные результаты по изучению эффективности опытного биопрепарата при проращивании

семян (таблица 29) указали на возможное синергичное действие биологического и химического пестицидов.

Таблица 29 – Эффективность прототипа биопрепарата при проращивании семян рапса в лабораторных условиях ($M \pm m$)

Варианты	Всходы, %	Длина проростка, мм	Длина корня, мм
Контроль	97,50±3,19	15,04±0,82	47,52±5,85
Опыт	98,33±1,92	15,36±0,86	52,64±1,83
+ - к контролю	0,83	0,32	5,12
<i>HCP</i> ₀₅ *	4,57	1,15	3,24

*: *HCP*₀₅ – наименьшая существенная разность для 5 %-ого уровня значимости

Как и в случае с семенами овса, опытный биопрепарат не оказал влияния на всхожесть, которая и так была более 95 %. При этом прибавка к длине корня в опыте по сравнению с контролем оказалась значимой и составила около 11 %, что ниже, чем зафиксировали для овса. Значимой прибавки к длине проростка не выявили.

В виду небольшого размера семян рапса для влажных камер использовали чашки Петри с фильтровальной бумагой. А для гречихи и подсолнечника – простерилизованные лотки (12×20 см), в которые поместили по 50 семян. Для удобства предоставления данных в таблице 30 отражена суммарная длина проростков с корешками.

Таблица 30 – 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±9,87	68,52±11,49	28,00±6,93
	Опыт	92,00±2,00	79,85±17,14	18,00±0,00
	+ - к контролю	25,33	11,33	-10,00
	<i>HCP</i> ₀₅ *	14,24	10,08	9,8
Подсолнечник	Контроль	60,67±3,06	15,66±0,69	64,50±11,70
	Опыт	71,50±4,43	22,23±4,27	71,00±14,47
	+ - к контролю	10,83	6,57	6,50
	<i>HCP</i> ₀₅	6,94	2,56	22,80

*: *HCP*₀₅ – наименьшая существенная разность для 5 %-ого уровня значимости

Степень поражения семян гречихи в контроле составила более 25 % (28 %), по ГОСТ 12038-84 данная инфицированность трактуется как сильная (Малкова и др., 2022). Ранее мы установили, что данные семена поражены мицелием разных цветов (зеленый, белый, желтый, черный) штаммов р. *Alternaria* (Малкова и др., 2021). Причем в данном случае эти микромицеты отрицательно сказались на всходах

гречихи, по сравнению с семенами овса, на которых развился только черный мицелий грибов рода *Alternaria*.

В опытном варианте с применением опытного препарата при проращивании семян гречихи всхожесть семян повысилась на 38 %, а также снизилась инфицированность почти на 36 % по сравнению с контролем. При этом средняя длина проростков с корнями также увеличилась почти на 17 %. Все прибавки оказались значимыми.

Самыми инфицированными из всех исследуемых оказались семена подсолнечника (почти 65 % в контроле). На их поверхности обнаружили микромицеты родов *Mucor*, *Penicillium* и *Botrytis* (Малкова и др., 2021). Первые из них относятся к «грибам хранения» (Дроздова и др., 2017). Это указало на то, что на хранящемся зерне началась смена «полевых грибов» микрофлорой хранения. Инфицированность «плесенями хранения» может не только снижать всхожесть семян, но также придавать им токсические свойства. В рамках нашего исследования для семян подсолнечника выявили самую низкую всхожесть (около 61 %).

В опыте с прототипом препарата инфицированность семян увеличилась еще на 10 %. Хотя данное значение и не оказалось значимым, но, возможно, это связано с тем, что в состав защитной среды для получения прототипа биопрепарата входит сахар, являющийся благоприятным источником питания для грибов. С другими культурами подобное не отметили, вероятно, из-за различного состава грибной микрофлоры и количества спор в целом. Кроме того, семена с такой высокой инфицированностью не рекомендованы для посева.

Протравливание семян опытным биопрепаратом поспособствовало значимому увеличению всхожести почти на 18 %, а также общая длина проростка с корешком в опыте по сравнению с контролем значимо возросла в среднем на 42 %. Поэтому стимуляционную активность прототипа препарата зафиксировали даже на очень сильно инфицированных семенах.

Таким образом, протравливание семян в лабораторных условиях опытным препаратом на основе 3-х штаммов *B. pumilus* положительно сказалось на всхожести, длине проростков и корней растений. А также поспособствовало снижению инфицированности на средне-сильно пораженных семенах. Максимальное

повышение всхожести в опыте зафиксировали с семенами гречихи (38 %), а наибольшее увеличение длины проростков с корнями – с подсолнечником (42 %).

5.6. Биологическая эффективность прототипа биопрепарата при выращивании рапса, гречихи, овса и подсолнечника *in vivo*

Полевой эксперимент осуществили в 2021–2022 гг. Согласно полученным данным, прототип биопрепарата при единичном внесении в ходе протравливания семян не оказал большого влияния на развитие овса (таблицы 31, 32).

В оба года отметили значимое увеличение высоты растения и длины метелки на 3,7 % и 6,1 % в среднем соответственно. Что соотносится с результатами лабораторных испытаний опытного биопрепарата. Однако по другим показателям хоть и зафиксировали положительную динамику, разница в опыте и контроле оказалась незначимой (кроме количества колосков в 2022 году).

Существенного влияния прототипа биопрепарата на количество растений и стеблей на экспериментальных площадках не выявили. Поэтому не установили и влияния прототипа опытного биопрепарата на общую кустистость.

Так как обнаружили увеличение высоты опытных растений, можно предположить, что штаммы *B. pumilus* из опытного биопрепарата способны продуцировать ауксины и/или гиббереллины, ответственные за стимуляцию данного процесса. А отсутствие влияния на кустистость позволило выдвинуть предположение, что бактерии не производят цитокинины в достаточном количестве для данной культуры овса (Чумикина и др., 2021; Иванова, 2022).

В сельском хозяйстве наиболее важным результатом является урожайность растения. Опытный биопрепарат не оказал значимого влияния на этот показатель. Поэтому его применение в данной дозировке и с однократным внесением не оправдано для стимуляции овса. Однако для однозначного утверждения неэффективности разработанного опытного средства необходимы дополнительные исследования – на других сортах, с другими дозировками и пр. Кроме того, антимикотические свойства опытного препарата также не проверили в рамках этого исследования, так как с естественным грибным фоном не отметили развитие болезней растений.

Таблица 31 – Влияние прототипа биопрепарата на элементы структуры урожая овса (M±m)

Вариант	Высота растения, см	Анализ метелки			Масса зерна с 1 растения, г	Масса 1000 зерен, г	Биологическая урожайность зерна, г/м ²
		длина, см	колосков, шт	зерен, шт			
<i>2021 год</i>							
Контроль	88,48±4,26	12,65±0,80	18,44±2,07	32,25±4,91	1,30±0,15	43,06±1,05	409,78±118,09
Опыт	91,40±3,06	13,27±0,55	19,07±0,45	33,01±1,09	1,44±0,12	45,31±1,79	454,39±92,69
+ - к контролю	2,92	0,62	0,63	0,76	0,14	2,25	44,61
<i>HCP₀₅</i> *	2,69	0,56	1,43	3,11	0,16	2,54	183,9
<i>2022 год</i>							
Контроль	106,35±2,85	14,80±0,20	24,61±2,20	49,84±4,07	2,12±0,25	42,45±1,70	740,36±132,29
Опыт	110,73±6,18	15,86±0,38	28,23±2,38	54,15±3,03	2,35±0,15	43,34±1,29	773,90±93,97
+ - к контролю	4,38	1,06	3,62	4,31	0,23	0,89	33,54
<i>HCP₀₅</i>	4,00	0,53	2,72	5,57	0,36	2,61	198,79

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

Таблица 32 – Влияние прототипа биопрепарата количество растений и кустистость (M±m)

Вариант	К уборке на 1 м ²					
	растений, шт	стеблей, шт	общая кустистость	растений, шт	стеблей, шт	общая кустистость
	<i>2021 год</i>			<i>2022 год</i>		
Контроль	320,75±103,75	553,25±100,63	1,72	349,50±47,88	419,75±46,91	1,20
Опыт	316,50±61,98	586,50±47,45	1,85	330,00±36,51	397,25±45,73	1,20
+ - к контролю	-4,25	33,25	0,13	-19,50	-22,50	0,00
<i>HCP₀₅</i>	148,05	136,29	-	73,75	80,25	-

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

Согласно данным в таблице 33, опытный препарат оказал положительное воздействие на урожайность рапса. Разница в опыте и контроле оказалась значимой в 2021–2022 гг. и составила 42,9 % в среднем.

В 2021 г. на увеличение биологической урожайности рапса в варианте с опытным биопрепаратом повлиял вес семян со стручка, который в опыте оказался на 47,5 % больше, чем в контроле. Это также привело к увеличению массы 1000 зерен на 44,5 %. На следующий год урожайность оказалась выше с опытных участков за счет значимого увеличения количества стручков с растения на 45,9 %. Во второй год испытаний также отметили значимую прибавку к высоте растений в опыте. А инфицирование растений, как и в случае с овсом, не зафиксировали.

Несмотря на то, что семена рапса предварительно обработали «Круйзером», на некоторых растениях в 2022 г. на начальном периоде роста выявили капустную моль – известного вредителя ярового рапса (Поддубная, Поддубный, 2014). Поэтому растения на контрольных и опытных участках в фазу бутонизации дополнительно обработали инсектицидом «Эйфория», КС. В итоге даже в контроле урожайность составила почти 2 т/га, что является нормальным значением для Алтайского края (Курсакова, Афанасьева, 2016). Поэтому вредители не оказали существенного влияния на данный показатель. А увеличение урожайности в опыте также подтвердило совместимость прототипа биопрепарата с химикатами, что соотносится с результатами из лаборатории.

В целом, для рапса и овса наиболее урожайным оказался 2022 г., что проследили как в опыте, так и контроле. Возможно, на это повлияли погодные условия – в мае и июне второго года испытаний близ Барнаула оказалось теплее, чем в 2021 г (средние температуры в мае и июне 2021 и 2022 гг. соответственно – 15,6 и 16,9 °С, 17,2 и 18,2 °С). При этом количество осадков в июне и июле также оказалось выше в 2022 г (количество осадков в июне и июле 2021 и 2022 гг. соответственно – 86 и 25 мм, 110 и 56 мм). А исследуемый сорт гречихи, вероятно, оказался более засухоустойчивым, чем рапс и овес, так как в оба года испытаний урожайность осталась примерно на одном уровне, хоть и отметили более существенные прибавки в количестве и весе зерна с растения за 2022 г. (таблица 34).

Таблица 33 – Влияние прототипа биопрепарата на элементы структуры урожая рапса (M±m)

Вариант	Количество растений на 1 м ² , шт	Высота растения, см	Количество стручков с 1 растения, шт	Кол-во семян в стручке, шт	Вес семян со стручка, мг	Масса 1000 зерен, г	Биологическая урожайность, г/м ²
<i>2021 год</i>							
Контроль	246,50±55,26	97,80±2,41	15,80±1,01	21,05±3,36	25,25±6,29	1,19±0,16	107,28±30,21
Опыт	258,00±50,11	102,45±4,32	18,15±2,63	22,03±1,55	37,75±4,03	1,72±0,18	161,40±21,42
+ к контролю	11,50	4,65	2,35	0,98	12,50	0,53	54,12
<i>HCP₀₅</i> *	98,01	5,03	3,13	2,43	9,15	0,30	52,38
<i>2022 год</i>							
Контроль	240,00±38,52	97,83±2,76	15,68±3,31	22,33±1,87	53,55±4,84	2,41±0,25	195,83±15,31
Опыт	212,00±55,51	106,68±4,95	22,88±4,60	23,20±1,28	57,88±3,75	2,50±0,26	271,69±54,12
+ к контролю	-28,00	8,85	7,20	0,88	4,33	0,09	75,87
<i>HCP₀₅</i>	82,78	5,48	6,94	2,74	7,50	0,44	68,90

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

Таблица 34 – Влияние прототипа препарата на элементы структуры урожая гречихи (M±m)

Вариант	Количество растений на 1 м ² , шт	Высота растения, см	Количество зерен с одного растения, шт	Вес зерна с 1 растения, г	Масса 1000 зерен, г	Биологическая урожайность зерна, г/м ²
<i>2021 год</i>						
Контроль	198,75±11,84	113,66±3,80	30,58±6,41	0,89±0,10	29,39±2,84	176,88±30,99
Опыт	220,00±22,91	113,31±3,78	36,05±3,04	1,12±0,12	31,12±1,01	246,48±31,34
+ - к контролю	21,25	-0,35	5,47	0,23	1,73	69,6
<i>HCP₀₅</i> *	31,59	4,16	5,16	0,17	3,69	54,00
<i>2022 год</i>						
Контроль	168,00±21,95	108,95±3,04	28,58±8,01	0,97±0,20	33,35±2,88	164,83±52,97
Опыт	162,00±21,09	109,15±8,89	46,07±0,50	1,57±0,04	34,01±0,89	257,00±45,95
+ - к контролю	-6,00	0,20	17,49	0,60	-0,34	92,17
<i>HCP₀₅</i>	37,29	6,70	9,84	0,25	3,75	91,85

*: *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 %). Однако на массе 1000 зерен это существенно не сказалось. По сравнению с овсом и рапсом в варианте с опытным биопрепаратом ни в один год исследований не отметили значимое увеличение количества растений и их высоты на исследуемых участках. Однако и угнетающего действия не выявили.

При выращивании семян подсолнечника, протравленных опытным препаратом, также не отметили его значимого влияния на количество растений и их высоту по сравнению с контролем к моменту уборки (таблица 35). Однако в первый год испытаний количество растений в обоих вариантах оказалось в 2 раза меньше по сравнению со следующим годом. Это соотносится с данными о высокой инфицированности семян подсолнечника, установленной в лабораторных условиях.

В 2021 году перед уборкой подсолнечника (конец сентября) зафиксировали инфицирование корзинок грибами р. *Penicillium* (рисунок 35). Причем и в опыте, и в контроле, на достаточно высоком уровне. Т.е. как и в лабораторных условиях не зафиксировали фунгистатического эффекта от прототипа препарата при такой степени поражения. Возможно, проявлению инфицированности на растениях поспособствовало также большое количество осадков (выше среднего) во все месяцы вегетационного периода кроме мая в Первомайском районе.



Рисунок 35 – Корзинки подсолнечника с экспериментальных участков 2021 года

Таблица 35 – Влияние прототипа биопрепарата на элементы структуры урожая подсолнечника (M±m)

Вариант	Количество растений на 10 м, шт	Высота растения, см	Диаметр корзинки, см	Кол-во семян с 1 корзинки, шт*	Масса семян с 1 корзинки, г	Масса 1000 зерен, г	Биологическая урожайность, г/10 м
<i>2021 год</i>							
Контроль	12,50±3,99	160,83±6,44	15,06±1,10	610,60±78,99	46,54±7,17	76,11±4,83	498,55±116,77
Опыт	13,83±3,49	162,81±5,26	16,21±0,90	623,37±81,87	55,25±6,18	89,05±6,64	849,83±186,95
+ - к контролю	1,33	1,98	1,14	12,77	8,71	12,94	351,28
<i>HCP₀₅**</i>	4,82	4,68	1,10	103,48	7,52	7,47	227,32
<i>2022 год</i>							
Контроль	28,63±2,88	149,02±13,92	14,22±2,26	668,50±136,75	39,98±10,32	60,03±7,74	1123,99±334,66
Опыт	28,25±3,24	149,55±8,81	15,86±2,05	921,07±143,09	70,33±18,80	72,44±13,72	1871,43±405,25
+ - к контролю	-0,38	0,53	1,64	252,57	30,35	12,41	747,44
<i>HCP₀₅</i>	3,29	12,49	1,92	156,72	17,25	11,00	418,14

*: пустые семечки не учитывались; **: *HCP₀₅* – наименьшая существенная разность для 5 %-ого уровня значимости

В первый год исследований зафиксировали значимое увеличение диаметра корзинки в опыте по сравнению с контролем на 7,6 %, а в 2022 г. – увеличение количества семян с 1 корзинки на 37,8 %. При этом в оба года испытаний отметили значимое увеличение биологической урожайности на 67,7 % в среднем, а также массы семян с 1 корзинки и 1000 зерен на 47,3 % и 18,9 % в среднем соответственно. А большую вариабельность значений можно объяснить тем, что для посевов использовали сорт, а не гибрид.

Растения подсолнечника, семена которых обработали прототипом препарата, быстрее выросли в высоту в середине вегетации, нежели контрольные (рисунок 36). Однако в Алтайском крае вегетационный период (160–170 дней) не такой длительный, как например в Краснодарском крае (220–240 дней, <https://clck.ru/DPEzM>, 2023), поэтому данный эффект не столь значим с практической точки зрения в нашем регионе. К тому же к моменту уборки высота растений оказалась примерно на одном уровне без значимых расхождений.



Рисунок 36 – Ряды подсолнечника в 2022 году: А – контрольный, Б – опытный

Таким образом, за 2021–2022 гг. полевых испытаний зафиксировали значимый эффект от применения опытного 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 опытного препарата.

Полученные результаты соответствуют предположению о том, что наибольшую эффективность опытный препарат может проявлять с растениями тех семейств, из которых выделили штаммы *Bacillus* spp.: *B. pumilus* 4 – из ризосферы растения семейства Крестоцветные, как и рапс, *B. pumilus* 7 – из ризосферы растения семейства Гречишные, как и гречиха, *B. pumilus* 16 – из ризосферы растения семейства Сложноцветные, как и подсолнечник. Вероятно, в данном случае проявился схожий эффект, как и с применением гомобиотиков в животноводстве – наибольшая эффективность штаммов в их естественных условиях обитания (Ноздрин и др., 2019). Кроме того, исследования в этой области известны и с растениями, ученые выявили сильную корреляцию между растительными и почвенными микробиомами, обусловленную специфичной корневой экссудацией (Kumar et al., 2011).

В целом, опытный препарат не проявил фитотоксичного действия на исследуемые культуры, а антимикотическую активность в рамках данных исследований с естественным грибным фоном не оценили. Поэтому важно продолжать испытания в новых условиях.

5.7. Расчетная экономическая эффективность опытного биопрепарата

Так как прототип биопрепарата еще не запустили в реализацию, для определения его полной себестоимости невозможно точно указать коммерческие и ряд других расходов. Поэтому для установления его примерной цены для реализации определили среднерыночную цену препаратов-конкурентов.

В соответствии с «Государственным каталогом пестицидов и агрохимикатов» (2022) в России зарегистрировано 2 препарата на основе бацилл в порошкообразном виде и с титром не менее 1×10^{11} КОЕ/г. Это «Алирин-Б» и «Гамаир». Их средняя цена на основании данных с 3-х источников (<https://gavrishshop.ru/>; <https://formularosta.ru/>; <https://pr-agro.ru/>) представлена в таблице 36.

Таблица 36 – Средняя цена на коммерческие препараты-конкуренты

Название	Действующий микроорганизм	Вес упаковки, г	Цена за упаковку, руб.	Цена за 1 кг, руб.
Алирин-Б, СП*	<i>B. subtilis</i> В-10 ВИЗР	120	6731,67	56097,22
Гамаир, СП	<i>B. subtilis</i> М-22 ВИЗР	60	5538,33	92305,55

*: СП – смачиваемый порошок

Оба аналогичных препарата содержат в своем составе только по 1 микроорганизму в качестве действующего компонента, а разработанный прототип биопрепарата – композицию из 3-х штаммов. Средняя цена за 1 кг препарата конкурентов составляет 74 200 руб. В виду того, что разработанный нами прототип препарата является многоштаммовым и для удобства подсчетов цену за 1 кг прототипа условно выбрали в размере 80 000 руб./кг. И это значение все равно ниже, чем цена за самый дорогой препарат-конкурент.

В таблице 37 представлены данные о расчетной экономической эффективности опытного биопрепарата на основании данных, полученных в предыдущем пункте. Привели средние показатели биологической урожайности за 2 года экспериментов. Средние цены реализации семян в Алтайском крае взяли с сайта <https://agroru.com/>.

Для установления расхода прототипа биопрепарата на 1 м² учли расход семян, который различен для разных культур. На засев 200 м² опытных делянок с овсом и гречихой взяли по 5 кг семян и по 0,5 г прототипа биопрепарата соответственно. Исходя из цены прототипа биопрепарата в 80 000 руб. за 1 кг, на каждое растение израсходовали прототип на 40 руб. В таком случае, стоимость обработки 1 м² опытным биопрепаратом составила 0,20 руб. На засев 200 м² рапсом израсходовали 1 кг семян и 0,1 г прототипа биопрепарата. Следовательно, на обработку всех опытных делянок затратили прототип на 8 рублей, а на 1 м² – 0,04 руб.

Для засева 600 м² подсолнечника (4 ряда по 200 м с шириной междурядья 0,75 м) израсходовали 10 кг семян и 1 г опытного биопрепарата. На всю площадь израсходовали прототип на 80 рублей, а на 1 м² – 0,13 руб.

Таблица 37 – Расчетная экономическая эффективность применения опытного биопрепарата

Растение		Биологическая урожайность, г/м ²	Цена прототипа биопрепарата для обработки, руб./м ²	Цена реализации культур, руб./г	Выручка от реализации, руб./м ²	Экономическая эффективность, руб./руб.
Рапс	Контроль	151,56	0,00	0,05	7,58	-
	Опыт	216,55	0,04	0,05	10,83	-
	+ - к контролю	64,99	-	-	3,25	81,24
	+ - к контролю, %	42,88%	-	-	42,88%	-
Гречиха	Контроль	170,86	0,00	0,048	8,20	-
	Опыт	251,74	0,20	0,048	12,08	-
	+ - к контролю	80,89	-	-	3,88	19,41
	+ - к контролю, %	47,34%	-	-	47,34%	-
Овес	Контроль	575,07	0,00	0,012	6,90	-
	Опыт	614,15	0,20	0,012	7,37	-
	+ - к контролю	39,08	-	-	0,47	2,34
	+ - к контролю, %	6,80%	-	-	6,80%	-
Подсолнечник	Контроль	811,27	0,00	0,045	36,51	-
	Опыт	1360,63	0,13	0,045	61,23	-
	+ - к контролю	549,36	-	-	24,72	185,87
	+ - к контролю, %	67,72%	-	-	67,72%	-

В соответствии с полученными расчетными данными возделывание рапса, подсолнечника и гречихи с применением прототипа препарата экономически оправдано. По овсу не выявили значимой прибавки в биологической урожайности, поэтому и расчетная выручка (экономический эффект) составит менее 7 %, что экономически не оправдано. Наиболее выгодно выращивание подсолнечника с применением опытного биопрепарата – экономический эффект может составить более 65 %.

В данной таблице при расчете экономической эффективности не учли расходы хозяйств на затраты по применению опытного биопрепарата (а только на приобретение). Это обусловлено тем, что затраты не возрастут с внедрением нового опытного биопрепарата в виду того, что семена в основном засеваются с обработкой химическими протравителями (например, как рапс в данном случае), а для применения биопрепаратов не нужны отдельные технологии.

Ресурсоотдача показывает сколько рублей получит хозяйство дополнительно на 1 рубль, вложенный в препарат. Для рапса экономическая эффективность составила 81,24 руб./руб., для гречихи – 19,41 руб./руб., для овса – 2,34 руб./руб., для подсолнечника – 185,87 руб./руб.

Оказалось, что внедрение нового опытного биопрепарата наиболее экономически оправдано при выращивании таких культур как гречиха, рапс и подсолнечник, что подтвердили высокой расчетной ресурсоотдачей. Полученные нами данные соотносятся с результатами, установленными при внедрении других биопрепаратов («Бисолбифит» и пр.) для обработки различных сельскохозяйственных растений (Доброхотов и др., 2017; Зевакин, Сухорукова, 2018; Чевердин, 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактерии рода *Bacillus* за счет высокой выживаемости и способности к спорообразованию, антагонистической активности по отношению к фитопатогенным микроорганизмам, а также безопасности для теплокровных животных являются распространенными агентами для разработки микробных биопрепаратов для сельского хозяйства. Бациллы активно используются в производстве бактериальных препаратов для растениеводства с середины XX века, однако до сих пор большинство из них содержат в своей основе представителей видов *B. subtilis* и *B. thuringiensis*. При этом другие представители рода *Bacillus* обладают высокой биологической активностью (*B. sphaericus*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* и др.), поэтому биопрепараты на их основе могут оказаться перспективными и конкурентоспособными в сравнении с существующими аналогами (Kumar et al., 2011; Земцова, Грицкевич, 2018; Долженко, 2021).

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 23.09.2022 г.), технологическая инструкция (ТИ приказ ректора от 31.10.2022 г. №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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов
- КСАМ (ВКСМ) – с англ. Сетевая биоресурсная коллекция в области генетических технологий для сельского хозяйства
- ФГБНУ ВНИИСХМ – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии
- ФГБНУ ФАНЦА – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий»
- ТУ – технические условия
- ТИ – технологическая инструкция
- НТД – нормативно-технические документы
- sp.* – с лат. (*species*) вид (для неидентифицированных)
- spp.* – все виды данного рода
- p.* – род
- сем. – семейство
- КОЕ/г(мл) – колониеобразующих единиц на грамм(миллилитр)
- РФ – Российская Федерация
- ИЦ – Инжиниринговый центр
- Пат. – патент
- L – среда Лурия
- YEP – с англ. (*Yeast Extract Peptone*) питательная среда на основе дрожжевого экстракта и пептона
- КСА – картофельно-сахарозный агар
- pH – водородный показатель
- СП – смачиваемый порошок
- КС – концентрат суспензии
- ОП – оптическая плотность
- БАВ – биологически активные вещества
- БГКП – бактерии группы кишечной палочки
- БПР – биопрепарат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамкова, Н.В. Сравнительная эффективность применения спорообразующих пробиотиков в технологии выращивания поросят / Н.В. Абрамкова // Вестн. Крас. Гос. Аграрн. Универ. – 2015. – № 8. – С. 173–176.
2. Агриэн. Алтайский край [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clck.ru/33Q4Ns>.
3. Агриэн. Краснодарский край [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clck.ru/DPEzM>.
4. Агрору.ком. Сельское хозяйство, пищевая промышленность, объявления [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://agroru.com>.
5. Акылбаева, И.Е. Подбор наполнителя для активных штаммов микроорганизмов, проверка их выживаемости при включении в различные наполнители минеральной природы / И.Е. Акылбаева, А.Ж. Аюпова, Ж.Т. Ботбаева, А.К. Жамангара // «Биология будущего: традиции и инновации»: матер. Всеросс., с Междунар. Участ. Конф. молодых учёных, посвященной 90-летию Урал. Гос. Универ. им. А.М. Горького. Екатеринбург: Изд. АМБ. – 2010. – С. 92–93.
6. Александров, И.Н. Возбудители микозов растений, включенные в сигнальный список карантинного перечня ЕОКЗР / И.Н. Александров // Защ. и Карант. Раст. – 2011. – № 8. – С. 33–36.
7. Алексеева, А.С. Механизмы положительного влияния ризобактерий на жизнедеятельность растений / А.С. Алексеева, Н.И. Потатуркина-Нестерова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=12671>.
8. Алфорова, Н.А. Анализ технологий получения биопрепаратов на основе торфа / Н.А. Алфорова, Л.И. Шапошникова, Е.С. Бобкова // Успехи в химии и химической технологии. – 2018. – Т. 32. – № 14. – С. 63–64.
9. Андреев, М.И. Система защиты растений как важный компонент в борьбе с вредными объектами растений / М.И. Андреев, О.Г. Марьина-Чермных // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства. – 2018. – № 20. – С. 102–105.

10. Андреева, М.М. Корреляционный анализ в социологических исследованиях / М.М. Андреева, В.Р. Волков // Вестн. Казанск. Техн. Универ. – 2013. – Т. 16. – № 7. – С. 271–274.
11. Андрюков, Б.Г. Базовые методы описательной статистики в микробиологических исследованиях / Б.Г. Андрюков, Н.Ф. Тимченко // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2013. – Т. 53. – № 4. – С. 29–36.
12. Андрюков, Б.Г. Данные микробиологических исследований как объект статистического анализа / Б.Г. Андрюков, Н.Ф. Тимченко // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2015. – Т. 60. – №2. – С. 33–39.
13. Ануарбекова С.С. Отработка условий лиофильного хранения азотфиксирующих микроорганизмов / С.С. Ануарбекова Э. Нагызбеккызы, С.С. Даулбай, Г.К. Абитаева, Н.Е. Бекенова // Нов. Наук. Каз. – 2014. – № 3. – С. 97–106.
14. Апаева, Н.Н. Влияние биологических препаратов на поражение болезнями и урожайность ярового ячменя / Н.Н. Апаева, А.Н. Чипурнова // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства. – 2021. – № 21. – С. 14–17.
15. Артамонова, М.Н. Ризосферные бактерии *Bacillus subtilis* и их ростстимулирующее влияние на *Cucurbita pepo* L.: дис. ... кандидата биологических наук: 03.02.03 / Артамонова Марина Николаевна – Ульяновск, 2017. – 181 с.
16. Асташкина, А.П. Приготовление питательных сред и культивирование микроорганизмов / А.П. Асташкина. – Томск: Изд. Том. Полит. Унив. – 2015. – 19 с.
17. Асямова, А.В. Производные гуанидина в медицине и сельском хозяйстве / А.В. Асямова, В.И. Герунов // Вест. Омс. Гос. Агр. Ун. – 2017. – № 4. – С. 130–135.
18. Бабамурадова, А.Б. Болезни древесных растений / А.Б. Бабамурадова // Инновационное развитие. – 2018. – № 6 (23). – С. 5–6.
19. Белоусова, М.Е. Энтомоцидная активность новых штаммов и экспериментальных инсектицидов на основе *Bacillus thuringiensis Berliner*: дис. ... кандидата биологических наук: 06.01.07 / Белоусова Мария Егоровна – СПб., 2019. – 150 с.
20. Белошапкина О.О. Защита растений: фитопатология и энтомология / О.О. Белошапкина, В.В. Гриценко, И.М. Митюшев, С.И. Чебаненко. – Ростов-на-Дону: Феникс. – 2017. – 477 с.

21. Благовещенская, Е.Ю. Метод последовательных отпечатков для выявления грибов филлопланы / Е.Ю. Благовещенская // Матер. VII Всеросс. микологической школы-Конф. с Междун. Участ. «Биотические связи грибов: мосты между царствами». М.: Изд. Мос. Гос. Универ. – 2015. – С. 5–9.
22. Блажевич, О.В. Культивирование клеток / О.В. Блажевич. – Минск: Изд. Белор. Гос. Универ. – 2004. – 78 с.
23. Бойко, С.С. Влияние ультразвука на численность *Bacillus subtilis* в процессе стационарного культивирования / С.С. Бойко, Е.С. Яценко // Материалы и технологии XXI века: доклады IV Всеросс. научно-практ. конф. молодых ученых и специалистов. – Бийск: Изд-во Алт. Гос. Техн. Универ. – 2017. – С. 322–325.
24. Боломатова, А.В. Исследование токсичности солей лития на жизнеспособность бактерий *Rhodococcus ruber* / А.В. Боломатова, А.П. Чернова // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XXI Междунар. Научно-Практ. Конф. студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л. П. Кулёва и Н. М. Кижнера, посвященной 110-летию со дня рождения профессора А. Г. Стромберга. – 2020. – С. 303–304.
25. Борисюк, Н.К. Экономическая эффективность предприятия: понятие, способы определения, особенности повышения / Н.К. Борисюк, Л.А. Солдатова, Т.Г. Масюкова // Интеллект. Инновации. Инвестиции. – 2017. – № 8. – С. 14–19.
26. Бородин С.Г. Бактериальные болезни подсолнечника / С.Г. Бородин, И.А. Котлярова, Г.А. Терещенко, Н.В. Пашаян // Масл. Культ. – 2012. – № 1 (150). – С. 116–128.
27. Бородин, С.Г. Видовой состав грибов рода *Rhizopus* Ehrenb на подсолнечнике / С.Г. Бородин, И.А. Котлярова, Г.А. Терещенко // Масл. Культ. – 2012. – № 2. – С. 151–152.
28. Бородин, С.Г. Грибы рода *Rhizopus* Ehrenb. на подсолнечнике / С.Г. Бородин, И.А. Котлярова, Ю.М. Соснина // Масл. Культ. – 2007. – № 2. – С. 55–57.
29. Боронин, А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений / А.М. Боронин // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С. 25–31.
30. Бугаева, Л.Н. Эффективность бактерий Р. *Bacillus* в отношении галловой нематоды *Meloidogyne incognita* Kof / Л.Н. Бугаева, Г.А. Слободянюк, Е.В.

Кашутина, А.М. Асатурова, А.И. Хомяк // Междунар. Научн.-Исслед. Журн. – 2018. – № 11 (77) – Часть 2. – С. 15–20.

31. Васильев, Д.А. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики / Д.А. Васильев, А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин. – Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина. – 2013. – 98 с.

32. Васильева, Е.Н. Эндобитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве / Е.Н. Васильева, Г.А. Ахтемова, В.А. Жуков, И.А. Тихонович // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17. – № 1. – С. 19–32.

33. Власенко, Н.Г. Плюсы и минусы агротехнического метода защиты растений / Н.Г. Власенко, Коротких Н.А. // Защ. и Карант. Раст. – 2012. – № 2. – С. 16–19.

34. Власов, Ю.И. Сельскохозяйственная фитовирусология СПб / Ю.И. Власов, Э.И. Ларина, Э.В. Трускинов. – Пушкин: Изд. ВИЗР. – 2016. – 236 с. Прилож. к Журн. «Вестн. защиты растений». – № 17.

35. Волкова, Г.С. Изучение биологических межштаммовых взаимодействий и ростовых свойств производственных штаммов молочнокислых бактерий / Г.С. Волкова, Е.В. Куксова, Е.М. Сербя // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством. – 2020. – Т. 1. – № 1 (1). – С. 104–109.

36. Воронин, Б.А. Карантин растений: история правового регулирования; современная практика / Б.А. Воронин, И.А. Тухбатов, Я.В. Воронина // Аграрн. Вестн. Урала. – 2014. – № 12 (130). – С. 58–62.

37. Гавриш Шоп. Магазин профессиональных семян [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://gavrishshop.ru/>.

38. Гагкаева, Т.Ю. Фузариоз зерновых культур / Т.Ю. Гагкаева, О.П. Гаврилова // Защ. и Карант. Раст. – 2009. – № 12. – С. 13–15.

39. Гагкаева, Т.Ю. Фузариоз зерновых культур / Т.Ю. Гагкаева, О.П. Гаврилова, М.М. Левитин, К.В. Новожилов // Приложение к журналу «Защ. и Карант. Раст.». – 2011. – № 5. – С. 70–120.

40. Гайстер, А. И. Сельскохозяйственный словарь-справочник / А.И. Гайстер. – М.-Ленинград: Гос. Изд. Колхоз. и Совхоз. Литер. – 1934. – 1280 с.

41. Галимов, А.Ш. Модернизация протравливающего органа протравливателя семян / А.Ш. Галимов // Росс. Электрон. Научн. Журн. – 2021. – № 2 (40). – С. 39–46.
42. Ганнибал, Ф.Б. Идентификация грибов рода *Alternaria* секции *Alternaria* с помощью ПЦР / Ф.Б. Ганнибал, Д.А. Новичкова // Вестн. защиты растений. – 2015. – № 4 (86). – С. 26–32.
43. Гниненко, Ю.И. Современные химические препараты для защиты растений / Ю.И. Гниненко // Лесохоз. Инф. – 2013. – № 1. – С. 43–48.
44. Гнутова, Р.В. Вирусные инфекции овощных культур на юге Дальнего Востока / Р.В. Гнутова, В.Ф. Толкач // Защ.и Карант.Раст. – 2009. – № 10. – С. 49–52.
45. Головин, С.Е. Гриб *Sphaeropsis Malorum* Peck. Один из возбудителей усыхания стеблей смородины / С.Е. Головин // Плодоводство и ягодоводство России. – 2020. – № 62. – С. 172–178.
46. Горбунов, О.П. Совершенствование препаратов на основе *Pseudomonas aureofaciens* / О.П. Горбунов // Защ. и Карант. Раст. – 2011. – № 5. – С. 35–36.
47. Горельникова, Е.А. Микробиология / Е.А. Горельникова. – Саратов: Изд. Саратов. Гос. Аграрн. Универ. – 2018. – 66 с.
48. Горленко, М.В. Бактериальные болезни растений / М.В. Горленко. – М.: Высшая школа. – 1966. – 292 с.
49. ГОСТ 10444.1-8 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе. – М.: Стандартиформ. – 2010. – 18 с.
50. ГОСТ 12038-84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. – М.: Стандартиформ. – 2011. – 29 с.
51. ГОСТ 12044-93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями. – М.: Стандартиформ. – 2011. – 55 с.
52. ГОСТ 21507-2013 Защита растений. Термины и определения. – М.: Стандартиформ. – 2020. – 28 с.
53. ГОСТ 28085-2013 Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности. – М.: Стандартиформ. – 2014. – 14 с.

54. ГОСТ 28471-90 Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение. – М.: Стандартинформ. – 2005. – 7 с.
55. ГОСТ 33980-2016 Продукция органического производства. Правила производства, переработки, маркировки и реализации. – М.: Стандартинформ. – 2016. – 42 с.
56. ГОСТ ISO 7218-2015 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям. – М.: Стандартинформ. – 2016. – 69 с.
57. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. – М.: Минсельхоз России. – 2022. – Ч. 1. Пестициды. – 903 с.
58. Граскова, И.А. Характеристика штамма AC-1405 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, вызывающего кольцевую гниль картофеля / И.А. Граскова, А.И. Перфильева, К.Ю. Арсентьев, И.В. Клименков, С.М. Мотылева, В.К. Войников // Агрохимия. – 2018. – № 3. – С. 73–82.
59. Грачева, И.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред / И.В. Грачева, А.В. Осин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 3. – С. 5–12.
60. 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.
61. Гульяева, Е.И. Болезни зерновых культур в Северо-Западном регионе России / Е.И. Гульяева, М.М. Левитин, Н.Ф. Семенякина, Н.В. Никифорова, Н.И. Савельева // Защ. и Карант. Раст. – 2007. – № 6. – С. 15–16.
62. Гуревич, К.Г. Применение пробиотиков в составе комплексной терапии дисбиотических нарушений при некоторых заболеваниях кишечника / К.Г. Гуревич, Е.Л. Никонов, В.А. Заборова, Т.Ю. Шелехова, О.Ю. Зольникова // Вопросы питания. – 2019. – Т. 88. – № 1. – С. 77–84.

63. Далинова, А.А. Грибы рода *Alternaria* как продуценты биологически активных соединений и биогербицидов (обзор) / А.А. Далинова, Д.Р. Салимова, А.О. Берестецкий // Прикл. Биох. и Микроб. – 2020. – Т. 56. – № 3. – С. 223–241.
64. Джалилов, Ф.С. Биологические препараты против болезней растений / Ф.С. Джалилов // Картофель и овощи. – 2018. – № 8. – С. 2–4.
65. Добровольский, Г.В., Роль почвы в формировании и сохранении биологического разнообразия / Г.В. Добровольский, И.Ю. Чернов. – М.: Товарищество научных изданий КМК. – 2011. – 273 с.
66. Доброхотов, С.А., Эффективность микробиологического препарата Бисолбифита на овощных культурах / С.А. Доброхотов, А.И. Анисимов, У.Б. Рогозева // Вестн. Студ. Научн. Общ. – 2017. – Т. 8. – № 1. – С. 72–74.
67. Долженко, В.И. Защита растений: настоящее и будущее / В.И. Долженко // Плодородие. – 2018. – № 1. – С. 24–26.
68. Долженко, В.И. Современный ассортимент средств защиты растений: биологическая эффективность и безопасность / В.И. Долженко, А.Б. Лаптиев // Плодородие. – 2021. – №3. – С. 71–75.
69. Долженко, Т.В. Бактериальные инсектоакарициды для защиты растений: изучение и перспективы применения / Т.В. Долженко // Биология растений и садоводство: теория, инновации. – 2021. – № 3 (160). – С. 50–62.
70. Дорохов, А.С. Перспективы развития методов и технических средств защиты сельскохозяйственных растений / А.С. Дорохов, И.А. Старостин, А.В. Ещин // Агроинженерия. – 2021. – № 1 (101). – С. 26–35.
71. Дроздова, Е.А. Микрофлора продовольственного сырья и продуктов его переработки / Е.А. Дроздова, Е.С. Алешина, Н.А. Романенко. – Оренбург: Изд. Оренб. Гос. Универ. – 2017. – 338 с.
72. 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: материалы XVI Междунар. Научно-Практ. Конф. (24–26 июня 2019 года). Барнаул: Изд. Алт. Гос. Универ. – 2019. – С. 243–246.
73. Дэлгэрмаа, С. Микробиологическое исследование энтомопатогенных бактерий вида *Bac. thuringiensis*, выделенных из биоценозов Монголии / С. Дэлгэрмаа, Б. Нандин-Эрдэнэ // Евраз. Союз Ученых. – 2015. – №12 (21). – С. 36–38.

74. Дятлов, Н.В. Разработка пробиотического средства для обработки сосков вымени у коров: дис. ... кандидата ветеринарных наук: 06.02.03 / Дятлов Никита Викторович – Краснодар, 2021. – 131 с.
75. Егорова, М.С., Видовое разнообразие фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas*, поражающие растения семейства Мятликовые / М.С. Егорова, А.Н. Игнатов, Е.С. Мазурин // Защита картофеля. – 2014. – № 2. – С. 35–39.
76. Елинов, Н.П. Химическая микробиология / Н.П. Елинов. – М.: Высшая школа. – 1989. – 448 с.
77. Еременко, Е.И. Группа бактерий «*Bacillus cereus*» - проблемы идентификации и таксономии / Е.И. Еременко // Медиц. Вестн. Северн. Кавказа. – 2008. – № 3. – С. 57–60.
78. Ерина, Н.В. Видовой состав эпифитной микрофлоры некоторых растений семейства *Grossulariaceae* и различные типы их взаимодействий / Н.В. Ерина, Т.С. Коптева, И.А. Заикина // Науч. Жур. КГАУ. – 2015. – № 114. – С. 1–9.
79. Ертаева, Ж.Т. Методы защиты растений / Ж.Т. Ертаева, К.Т. Курманова, Н.А. Алимбекова // Вестн. Наук. и Образов. – 2015. – № 1 (3). – С. 7–9.
80. Ефимова, Л.В. Эффективные микроорганизмы в кормлении крупного рогатого скота и свиней / Л.В. Ефимова, Т.А. Удалова. – Красноярск: Красноярский НИИЖ Россельхозакадемии. – 2011. – 100 с.
81. Ефимочкина, Н.Р. Токсигенные свойства микроскопических грибов / Н.Р. Ефимочкина, И.Б. Седова, С.А. Шевелева, В.А. Тутельян // Вестн. Томск. Гос. Универ. Биология. – 2019. – № 45. – С. 6–33. <https://doi.org/10.17223/19988591/45/1>
82. Забокрицкий, Н.А. Биологически активные вещества, синтезируемые пробиотическими микроорганизмами родов *Bacillus* и *Lactobacillus* / Н.А. Забокрицкий // Здор. и Образ. в XXI веке. – 2015. – №3. – С. 80–90.
83. Зазимко, М.И. Агротехнический метод защиты растений - основополагающий, но не однозначный / М.И. Зазимко, В.И. Долженко // Защ. и Карант. Раст. – 2011. – № 5. – С. 11–16.
84. Заикина, И.А. Экологическая роль бактериального сообщества эпифитов филлосферы в жизнедеятельности растений: дис. ... кандидата биологических наук: 03.00.07 / Заикина Ирина Аркадьевна – Ставрополь, 2008. – 150 с.

85. Зевакин А.С., Сухорукова Н.С. Эффективность использования микробных препаратов в агроценозах сои в зависимости от уровня минерального питания растений // Научный журнал молодых ученых, 2018. – № 1 (10). – С. 24–27.
86. Зейрук, В.Н. Механический Способ Борьбы С Колорадским Жуком / В.Н. Зейрук, С.В. Васильева, В.И. Старовойтов, В.М. Глез // Защ. и Карант. Раст. – 2020. – № 3. – С. 16–17.
87. Зеленцов, С.В. Первичная причина развития семядольного бактериоза у сои и других зернобобовых культур / С.В. Зеленцов, Г.М. Саенко, Е.В. Мошненко, Е.Н. Будников // Масл. Культ. – 2021. – № 1 (185). – С. 73–89.
88. Земцова, В.О. Биопрепараты на основе бактерии рода *Bacillus* – экологически безопасная альтернатива химическим пестицидам / В.О. Земцова, Е.Р. Грицкевич // Матер. 18-й Междунар. Научн. Конф. «Сахаровские чтения 2018 года: экологические проблемы XXI века». Минск: ИВЦ Минфина. – 2018. – С. 48–50.
89. Зиганшин, Д.Д. Особенности глубинного и поверхностного культивирования грибов *Trichoderma* для получения биопрепаратов на основе клеток гриба/ Д.Д. Зиганшин, А.С. Сироткин // Вестн. Казанск. Техн. Универ. – 2017. – Т. 20. – № 10. – С. 155–158.
90. Зинченко, В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность / В.А. Зинченко. – М.: КолосС. – 2012. – 127 с.
91. Зотиков, А.С. Выбор технологий и технических средств для борьбы с колорадским жуком и его личинками / А.С. Зотиков // Вестн. Чуваш. Гос. Сельскохоз. Академ. – 2021. – № 1 (16). – С. 72–78.
92. Зубков, А. Ф. Агробиоценологическая модернизация защиты растений / А.Ф. Зубков. – СПб.: Всер. Научн.-Исс. Инст. Защ. Раст. РАСХН. – 2014. – 117 с.
93. Иванова, М.С. Применение стимуляторов роста при предпосевной обработке семян / М.С. Иванова // Аграрн. Образ. и Наук. – 2022. – № 4. – С. 1–9.
94. Игнатов, А.Н. *Xanthomonas arboricola* - бактериальный патоген сельскохозяйственных культур в России / А.Н. Игнатов, Н.В. Пунина, Е.В. Матвеева, Э.Ш. Пехтерева, В.А. Политыко // Защ. и Карант. Раст. – 2010. – № 4. – С. 41–43.
95. Илларионов, А.И. Химический метод защиты растений: история становления, современное состояние и перспективы развития / А.И. Илларионов // Вестн. Ворон. Гос. Аграрн. Универ. – 2014. – № 4 (43). – С. 70–78.

96. Исемберлинова, А.А. Влияние обработки импульсным электронным пучком на фитопатогенные грибы р. *Penicillium* в семенах пшеницы / А.А. Исемберлинова, И.С. Егоров, С.А. Нужных, М.А. Серебренников, А.В. Полосков, Г.Е. Ремнев // Сборн. Докл. Междун. Научн.-Практ. Конф. «Ядерно-физические исследования и технологии в сельском хозяйстве». – Обнинск: ФГБНУ ВНИИРАЭ. – 2020. – С. 329–331.

97. Кандыбин, Н.В. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis* / Н.В. Кандыбин, Т.И. Патыка, В.П. Ермолова, В.Ф. Патыка. –СПб-Пушкин: Инновационный центр защиты растений. – 2009. – 244 с.

98. Каратыгин, И.В. Определитель грибов России. Порядки Тафриновые, Протомициевые, Экзобазидиевые, Микростромациевые / И.В. Каратыгин. – СПб.: Изд. «Наука». – 2002. – 136 с.

99. Карпунина, Л.В. Биотехнология получения белков и биологически активных веществ / Л.В. Карпунина. – Саратов: Изд. Саратов. Гос. Аграрн. Универ. им. Н.И. Вавилова. – 2016. – 87 с.

100. Кашнер, Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях. – Пер. с англ.: Верховцева М.И., Кунин Е.В., Плакунов В.К., Калакуцкий Л.В., Кондратьева Е.Н. / Д. Кашнер. – М.: Мир. – 1981. – 521 с.

101. Клишевич, Н.Г., Микробные препараты для ускорения разложения нефти в почве / Н.Г. Клишевич, З.М. Алещенкова, Е.М. Глушень, Г.М. Петрова, А.Э. Томсон, Т.В. Соколова, Н.Е. Сосновская // Микробн. Биотех.: Фундам. и Прикл. Асп. Сборник научных трудов. – Т. 10. – 2018. – С. 466–476.

102. Ковалевская, В.С., Изучение биосовместимости и биотехнологических свойств молочнокислых бактерий / В.С. Ковалевская, Н.Р. Молодкина, Т.И. Тимофеев // Научн. Труды Куб. Гос. Техн. Универ. – 2016. – № 14. – С. 284–288.

103. Коготько, Л.Г. Защита растений / Л.Г. Коготько, Е.В. Стрелкова, П.А. Саскевич, Ю.А. Миренков. – Минск: РИПО. – 2016. – 340 с.

104. Кожемяков, А.П. Агротехнологические основы создания усовершенствованных форм микробных биопрепаратов для земледелия / А.П. Кожемяков, Ю.В. Лактионов, Т.А. Попова, А.Г. Орлова, А.Л. Кокорина, О.Б. Вайшля, Е.В. Агафонов, С.А. Гужвин, А.А. Чураков, М.Т. Яковлева // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – № 3. – С. 369–376.

105. Колесников, Л.Е. Совместное использование штаммов микроорганизмов и хитозановых комплексов для повышения урожайности пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / Л.Е. колесников, Э.В. Попова, И.И. Новикова, Н.С. Прияткин, М.В. Архипов, Ю.Р. Колесникова, Н.Н. Потрахов, В.В. Duijn, А.С. Гусаренко // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т. 54. – № 5. – С. 1024–1040.

106. Колмыкова, В.Е. Применение искусственных инфекционных фонов в исследованиях на устойчивость к болезням плодово-ягодных культур / В.Е. Колмыкова // Селекц. и Сорторазв. Сад. Культ. – 2020. – Т. 7. – № 1–2. – С. 84–88.

107. Коломиец, Э.И. Инновационные биотехнологии в экономике Республики Беларусь / Э.И. Коломиец // Тез. Пленарн. Докл. XIV Междунар. Научн.-Практ. Конф. «Биологически активные препараты для растениеводства». – Минск: Изд. Белор. Гос. Универ. – 2018. – С. 20–23.

108. Комарова, О.П. Биологическая защита растений – одно из основных направлений снижения пестицидной нагрузки на агроценозы / К.Ю. Козенко, С.В. Земляницына // Межд. Научн.-Исслед. Журн. – 2021. – № 9 (111). – Ч. 1. – С. 98–102.

109. Конурбаева, М.У. Антагонистические свойства бактерий рода *Pseudomonas* / М.У. Конурбаева, Т.Д. Доолоткельдиева // Manas Journal of Natural Sciences. – 2008. – №. 1 (9). – С. 9–15.

110. Коняева, Н.М. Зараженнность семян сои фитопатогенными грибами в условиях ее адаптации в лесостепи западной Сибири / Н.М. Коняева, Л.Ф. Ашмарина, А.С. Коробейников, Б.И. Тепляков // Вестн. Новосиб. Гос. Аграрн. Универ. – 2016. – № 1. – С. 22–28.

111. Коростелева, Н.И. Биотехнология / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. – Барнаул: Изд. Алт. Гос. Аграрн. Универ. – 2006. – 127 с.

112. Котова, Е.А. Пробиотики в аквакультуре / Е.А. Котова, Н.А. Пышманцева, Д.В. Осепчук, А.А. Пышманцева, Л.Н. Тхакушинова // Сельскохозяйственный журнал. – 2012. – Т. 3. – № 1-1. – С. 100–103.

113. Красникова, Е.С. Ветеринарная вирусология / Е.С. Красникова. – Саратов: Изд. Саратов. Гос. Аграрн. Универ. – 2017. – 36 с.

114. Краснопольский, Ю.М., Фармацевтическая биотехнология: производство биологически активных веществ / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев. – Харьков: Изд. НТУ «Харьк. Политехн. Инст.». – 2013. – 192 с.

115. Куделькин, Н.С. Правовая охрана растений от вредных организмов / Н.С. Куделькин // Сельское хозяйство. – 2019. – № 2. – С. 33–38.
116. Кудряшов, Л.С. Влияние лактата натрия на микробиологические и окислительные изменения фарша говяжьего / Л.С. Кудряшов, О.А. Кудряшова, С.Л. Тихонов // Матер. VI Междунар. Научно-Практ. Конф. «Инновационные технологии в пищевой промышленности и общественном питании». – 2019. – С. 71–74.
117. Кузьмичев, Е.П. Болезни древесных растений: справочник / Е.П. Кузьмичев, Э.С. Соколова, Е.Г. Мозолевская. – М.: Изд. ФБУ Всеросс. Научн.-Исслед. Инст. Лесовод. и Механиз. Лесн. Хоз. – 2004. – 120 с.
118. Курамшина, З.М., Повышение толерантности культурных растений, инокулированных эндофитными штаммами *Bacillus subtilis*, к действия тяжелых металлов / З.М. Курамшина, Ю.В. Смирнова, Р.М. Хайруллин // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 545.
119. Курсакова, В.С. Влияние препаратов ризосферных бактерий на урожайность ярового рапса в степной зоне Алтайского края / В.С. Курсакова, О.В. Афанасьева // Вестн. Красноярск. Гос. Аграрн. Универ. – 2016. – № 3. – С. 89–94.
120. Лазарев, А.М. Ареал и зона вредоносности бактериального рака томата *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (smith) davis, et al / А.М. Лазарев, И.Н. Надточий, Ф.А. Попов // Вестн. защиты растений. – 2014. – № 1. – С. 72–73.
121. Лазарев, А.М. Бактериальный рак плодовых, ягодных и декоративных культур, вызываемый *Agrobacterium spp.* / А.М. Лазарев, А.Н. Игнатов, М.В. Воронина // Вестн. защиты растений. – 2020. – № 103 (2). – С. 87–93.
122. Ламан, Н. Современная технология предпосевной обработки семян / Н. Ламан, Г. Алексейчук, Ж. Калацкая // Наук. и Иннов. – 2006. – №9 (43). – С. 37–41.
123. Леванова, Л.А. Систематика, таксономия и классификация бактерий / Л.А. Леванова, Ю.В. Захарова // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2017. – Т. 2. – № 1. – С. 91–101.
124. Лекомцева, С.А. Особенности грибов рода *Penicillium* и возможности их использования / С.А. Лекомцева, О.Ю. Малозёмов // Форум молодых ученых. – 2021. – № 11 (63). – С. 210–214.
125. Леонов, Н.Н. Эффективность биопрепарата Гамаир в защите сливы от плодовой гнили / Н.Н. Леонов // Защ. и Карант. Раст. – 2018. – № 1. – С. 19–20.

126. Леонтьевская, Е.А. Структура эпифитно-сапротрофных бактериальных комплексов зерновых и овощных культур: дис. ... кандидата биологических наук: 03.02.03 / Леонтьевская, Елена Алексеевна – Москва, 2014. – 89 с.

127. Леонтьевская, Е.А. Структура эпифитно-сапротрофных бактериальных комплексов зерновых и овощных культур: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03. / Леонтьевская Елена Алексеевна. – М., 2014. – 89 с.

128. Литвинов, С.С. Методика полевого опыта в овощеводстве / С.С. Литвинов. – М.: ГНУ Всеросс. Научно-Исслед. Инст. Овощеводства. – 2011. – 648 с.

129. Логвинова, Т.С. Производство и применение биологических средств защиты в России и в мире / Т.С. Логвинова, В.П. Булгакова // Матер. I Национ. Научн.-Практ. Конф. с Междун. Участ. «Инновации природообустройства и защиты окружающей среды». Саратов: Изд. «КУБиК». – 2019. – С. 546–551.

130. Логвиновский, В.Д. Методы защиты растений от вредителей (организационно-хозяйственный, агротехнический, химический, физический, механический, селекционный, карантин растений) / В.Д. Логвиновский. – Воронеж: Изд. Ворон. Гос. Универ. – 2005. – 31 с.

131. Луканин, А.В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств / А.В. Луканин. – М.: ИНФРА-М. – 2016. – 304 с.

132. Луканин, А.В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств / А.В. Луканин. – М.: ИНФРА-М. – 2016. – 304 с.

133. Лысак, В.В. Микробиология / В.В. Лысак, Р.А. Желдакова. – Минск: Изд. Белор. Гос. Универ. – 2002. – 100 с.

134. 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.

135. 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.

136. Малкова, А.В. Изучение антагонизма ризосферных бацилл к *Phytophthora infestans* для создания средства защиты растений / А.В. Малкова, А.Н.

Ирkitова, Д.Е. Дудник, Е.Н. Каргашилова // Материалы IV Межрег. Научно-практ. Конф. (с международным участием) «От биопродуктов к биоэкономике» (23–26 сентября 2021 г.). Барнаул: Изд. Алт. Гос. Универ. – 2021. – С. 39–41.

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

138. Малкова, А.В. Изучение влияния нового бациллярного препарата на показатели качества семян гречихи в лабораторных условиях / А.В. Малкова, А.Н. Ирkitова, Д.Е. Дудник, Е.Н. Каргашилова // Материалы Междунар. Научно-Практ. Конф. «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем» (13–15 сентября 2022 г.). Краснодар: «ЭДВИ». – 2022. – С. 263–267.

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

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

141. Малкова, А.В. Приживаемость бактерий поликомпонентного бациллярного препарата на семенах различных сельскохозяйственных культур / А.В. Малкова, А.Н. Ирkitова, Д.Е. Дудник, Е.Н. Каргашилова // Материалы VIII Пушинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». – 2022. – С. 253–254.

142. 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. Ирkitова, Д.Е. Дудник // Известия вузов. Прикл. Хим. и Биотехнол. – 2021. – № 1 (3). – С. 393–402.

143. Марченко, А.Б. Микромицеты рода *Alternaria* на однолетних цветочно-декоративных растениях / А.Б. Марченко // Вестн. Полесск. Гос. Универ. Серия природоведческих наук. – 2014. – № 2. – С. 9–16.

144. Матвиенко, Е.В. Плесневения семян сорго (обзор) / Е.В. Матвиенко, П.Н. Константинова // Междун. Журн. Гум. и Естеств. Наук. – 2018. – № 11-2. – С. 41–45.

145. Машанов, А.И. Микробиология с основами биотехнологии / А.И. Машанов, Н.А. Величко, Ж.А. Плынская. – Красноярск: Изд. Краснояр. Гос. Аграрн. Универ. – 2015. – 171 с.

146. Машанов, А.И. Микробиология с основами биотехнологии / А.И. Машанов, Н.А. Величко, Ж.А. Плынская. – Красноярск: Изд. Краснояр. Гос. Аграр. Универ. – 2015. – 171 с.

147. Меледина, Т.В. Аппаратурно-методическая база экспериментов в области пищевой биотехнологии продуктов из растительного сырья / Т.В. Меледина, В.А. Иванова, А.В. Федоров. – СПб: Изд. Ун. Инф. Техн., Мех. и Опт. – 2017. – 60 с.

148. Минаева, О.М. Биопрепараты для защиты растений: оценка качества и эффективности / О.М. Минаева, Е.Е. Акимова, Т.И. Зюбанова, Н.Н. Терещенко. – Томск: Изд. Дом Томск. Гос. Универ. – 2018. – 130 с.

149. Мишустин, Е.Н. Ассоциации почвенных микроорганизмов / Е.Н. Мишустин. – М.: Изд. «Наука». – 1975. – 107 с.

150. Мишустин, Е.Н. Закон зональности и учение о микробных ассоциациях почвы / Е.Н. Мишустин // Успех. Совр. Биол. – 1954. – Т. 37. – № 1. – С. 1–27.

151. Мишустин, Е.Н. Микроорганизмы и продуктивность земледелия / Е.Н. Мишустин. – М.: Изд. «Наука». – 1972. – 343с.

152. Мишустин, Е.Н. Микрофлора почв севера СССР / Е.Н. Мишустин, В.Н. Мирзоева // Микрофлора почв северной и средней части СССР. – М.: Изд. «Наука». – 1966. – С. 24–53.

153. Морозова, М.А. Мирзоян А.В. Экологические особенности формирования бактериоценоза ихтиофауны в природных условиях и в аквакультуре нижнего Дона / М.А. Морозова, А.В. Мирзоян // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 12 (8) – С. 1672–1676.

154. Морозова, М.В. Определение содержания бактерий рода *Bacillus* в корме и фекалиях лабораторных мышей при содержании в стерильных и нестерильных условиях / М.В. Морозова, Калмыкова Г.В., Акулова Н.И., Литвинова Е.А. // Лабораторные животные для научных исследований. – 2021. – № 3. – С. 11–16.

155. МР 2.3.2.2327-08 Методические рекомендации по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности. – М.: ГНУ ВНИИМС. – 2008. – 243 с.

156. МУ 1.3.2411–08 Биологическая безопасность при глубинном аппаратном культивировании микроорганизмов I–II групп патогенности. – М.: Федер. Цен. Гиг. и Эпид. Роспотребнадзора. – 2009. – 12 с.

157. Муродова, С.С. Комплексные микробные препараты. Применение в сельскохозяйственной практике / С.С. Муродова, К.Д. Давранов // *Biotechnologia Acta*. – 2014. – Т. 7. – № 6. – С. 92–101.

158. Назаренко, Л.В. Основы биотехнологии / Л.В. Назаренко, Н.В. Загоскина, Ю.Г. Кропова, Е.А. Живухина, Е.А. Калашникова. – М.: Изд. Юрайт. – 2019. – 219 с.

159. Назаров, П.А. Инфекционные болезни растений: этиология, современное состояние, проблемы и перспективы защиты растений / П.А. Назаров, Д.Н. Балеев, М.И. Иванова, Л.М. Соколова, М.В. Каракозова // *Acta Naturae*. – 2020. – Т. 12. – № 3 (46). – С. 46–59.

160. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук. – М.: Академия. – 2005. – 608 с.

161. Никуличев, Д.А. Современные методы и средства сушки зерна и пути снижения энергозатрат / Д.А. Никуличев // *Наук. и Обр.Сег.* – 2020. – № 6. – С. 9–10.

162. Новиков, В.Е. Фармакологическая регуляция микробиоценоза кишечника / В.Е. Новиков // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2009. – Т. 7. – № 2. – С. 51–57.

163. Новиков, Д.А. Выделение и очистка продуктов биотехнологии / Д.А. Новиков. – Минск: Изд. Белорус. Гос. Универ. – 2014. – 256 с.

164. Новиков, М.Н. Биологические приемы борьбы с болезнями растений в агроценозах / М.Н. Новиков // *Владимирский земледелец*. – 2021. – № 1. – С. 15–19.

165. Новикова, И.И. Биологическое обоснование оптимизации препаративных форм биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для контроля популяций фитопатогенных грибов и бактерий – возбудителей болезней растений / И.И. Новикова, Ю.А. Титова, И.В. Бойкова, В.Н. Зейрук, И.Л. Краснобаева, Т.А. Серова // *Вестн. защиты растений*. – 2017. – № 3 (93). – С. 16–23.

166. Ноздрин, Г.А. Динамика приростов у гусей в условиях сочетанной фармакопрофилактики гомобиотиками, пробиотиками на основе рекомбинантных штаммов бацилл и энрофлоксацина / Г.А. Ноздрин, Н.А. Готовчиков, М.С. Яковлева, Н.С. Яковлева, М.В. Лазарева // Вестн. Новосиб. Гос. Аграрн. Универ. – 2019. – № 2. – С. 104–110.

167. Нугманова, Т.А. Использование биопрепаратов для растениеводства / Т.А. Нугманова // Сборн. Научн. Труд. ГНБС. – 2017. – Т. 144. – Ч. 1. – С. 211–214.

168. О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами: Федеральный закон от 19.07.1997 N 109-ФЗ – М.: Кремль. – 1997. – С. 10.

169. О внесении изменений в федеральный закон «О развитии сельского хозяйства»: Федеральный закон от 11.06.2021 года N 175-ФЗ – М.: Кремль. – 2021. – 15 с.

170. О карантине растений: Федеральный закон от 21.07.2014 N 206-ФЗ. – М.: Кремль. – 2014. – С. 82.

171. О развитии сельского хозяйства: Федеральный закон от 29.12.2006 N 264-ФЗ – М.: Кремль. – 2006. – 15 с.

172. О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации: Указ Президента РФ от 01.12.2016 г. № 642. – М.: Кремль. – 2016. – С. 24.

173. Об органической продукции и о внесении изменений в отдельные законодательные акты РФ: Федеральный закон от 03.08.2018 N 280-ФЗ – М.: Кремль. – 2018. – 15 с.

174. 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.

175. ОФС.1.7.2.0012.15. Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 2015. – Т. 2. – 49 с.

176. Паносян, О.А. Термофильные бациллы термальных источников Армении / О.А. Паносян // Биол. Журн. Арм. – 2008. – № 3 (60). – С. 19–24.

177. Пат. 2447143 Российская Федерация МПК⁵¹ С 12 N 1/20, С 12 R 1/02. Способ глубинного культивирования *Bacillus brevis* для получения грамицидина С / Дербышев В.В., Клыков С.П., Кураков В.В.; заявители и патентообладатели Дербышев В.В., Клыков С.П., Кураков В.В. – № 2008146193/10; заявл. 24.11.2008; опубл. 10.04.2012, Бюл. № 10. – 14 с.

178. Пат. 2551968 Российская Федерация МПК⁵¹ С 12 N 1/20, С 12 R 1/07. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* А 1.5, в качестве средства повышения продуктивности растений и их защиты от болезней, вызываемых фитопатогенными микроорганизмами / Чеботарь В.К., Ерофеев С.В., Щербаков А.В., Чижевская Е.П.; заявитель и патентообладатель ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии. – № 2013136149/10; заявл. 01.08.2013; опубл. 10.06.2015, Бюл. № 16. – 12 с.

179. Пат. 2560277 Российская Федерация, МПК⁵¹ А 61 К 35/741, А 61 К 35/744. Средство для профилактики мастита у коров в период лактации / Коба И.С., Новикова Е.Н., Решетка М.Б., Лунева А.В., Зимин К.В., Ярошенко В.А.; заявитель и патентообладатель ООО «Парадигма». – № 2014133266/10; заявл. 12.08.14; опубл. 20.08.15, Бюл. № 23. – 8 с.

180. Пат. 2675934 Российская Федерация МПК⁵¹ С 12 N 1/20, С 12 R 1/07. Комбинированный пробиотический препарат на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus* (варианты) для использования в животноводстве, способ его производства (варианты) и штамма *Bacillus subtilis* (*Natto*), используемый в качестве добавки к препарату / Джавахия В.В., Глаголева Е.В., Воинова Т.М., Карташов М.И., Овчинников А.И.; заявитель и патентообладатель ООО «Фермлаб». – № 2017112086; заявл. 10.04.2017; опубл. 25.12.2018, Бюл. № 36. – 22 с.

181. 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.

182. 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.

183. Пестициды. Болезнь растения [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.pesticity.ru/dictionary/Plant_disease.

184. Петров, В.Б. Микробиологические препараты в биологизации земледелия России / В.Б. Петров, В.К. Чеботарь, А.Е. Казаков // Достижения науки и техники АПК. – 2002. – № 10. – С. 16–20.

185. Плотникова, Е.Ю. Место пробиотиков в современной клинической практике / Е.Ю. Плотникова, Ю.В. Захарова // Педиатрия (Прил. к журн. Consilium Medicum). – 2018. – № 1. – С. 95–99.

186. Погода и климат. Погода в Барнауле. Температура воздуха и осадки [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.pogodaiklimat.ru/monitor.php?id=29838&month=5&year=2022>.

187. Погода и климат. Погода в Первомайском. Температура воздуха и осадки [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.pogodaiklimat.ru/monitor.php?id=29348&month=9&year=2022>.

188. Поддубная, Е.Н. Вредители ярового рапса в Западной Сибири / Е.Н. Поддубная, Т.Н. Поддубный // Защ. и Карант. Раст. – 2014. – № 5. – С. 34–36.

189. Попов, С.Я. Основы химической защиты растений / С.Я. Попов, Л.А. Дорожкина, В.А. Калинин. – М.: Арт-Лион. – 2003. – 208 с.

190. Похиленко, В.Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность / В.Д. Похиленко, В.В. Перельгин // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2-3 (32-33). – С. 20–41.

191. Премьер-Агро. Каталог [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pr-agro.ru/>.

192. Премьер-Агро. Протравители семян [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://pr-agro.ru/product-cat/product_type/pesticides/protraviteli-semyan.

193. Родионов, Л.А. Мобильная СВЧ-установка для борьбы с колорадским жуком / Л.А. Родионов, С.С. Нугманов // Матер. 64-й Студ. Научн.-Прак. Конф.

Инжен. Фак. ФГБОУ ВО «Самарский государственный аграрный университет»: сборник статей. Кинель: РИО СамГАУ. – 2019. – С. 118–124.

194. Романенко, Н.Д. Биологические средства защиты растений в борьбе с фитопаразитическими нематодами, другими патогенами и перспективы их использования в XXI веке / Н.Д. Романенко, В.Г. Заец, Н.И. Козырева, И.О. Попов, С.Б. Таболин // Вестн. Росс. Универ. Друж. Нар. Серия: Агронимия и животноводство. – 2008. – № 2. – С. 39–51.

195. Ручай, Н.С. Технология микробного синтеза / Н.С. Ручай. – Минск: Изд. Белор. Гос. Техн. Универ. – 2014. – 167 с.

196. Рыскалиева, Б.Ж. Характеристика бактерии рода *Pectobacterium carotovorum* / Б.Ж. Рыскалиева, А.К. Беккалиева, Е.А. Ляшенко // Научно-практические исследования. – 2018. – № 3 (12). – С. 137–140.

197. Рязанова, Л.Г. Основы статистического анализа результатов исследований в садоводстве / Л.Г. Рязанова, А.В. Проворченко, И.В. Горбунов. – Краснодар: Куб. Гос. Аграрн. Универ. – 2013. – 61 с.

198. Савустьяненко, А.В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* / А.В. Савустьяненко // Акт. Инфект. – 2016. – № 2 (11). – С. 35–44.

199. Саламатова, Ю.А. Эффективность хранения ряда бактериальных препаратов в жидкой форме / Ю.А. Саламатова, О.М. Минаева, Е.Е. Акимова // Вестн. Томск. Гос. Универ. Биология. – 2010. – № 1 (9). – С. 20–28.

200. Санин, С.С. Защита растений и устойчивое земледелие в XXI столетии / С.С. Санин // Защ. и Карант. Раст. – 2021. – № 4. – С. 9–16.

201. Санин, С.С. Контроль болезней сельскохозяйственных растений – важнейший фактор интенсификации растениеводства / С.С. Санин // Вестн. защиты растений. – 2010. – № 1. – С. 3–14.

202. Сафронова, Л.А. Бактерии рода *Bacillus* – активные продуценты гидролитических ферментов / Л.А. Сафронова, А.И. Осадчая, В.М. Иляш, Е.В. Мишак // Наук. Вісн. Ужгород. Універ. Серія Біологія. – 2006. – № 19. – С. 155–159.

203. Сверчкова, Н. В поисках альтернативы ветеринарным и кормовым антибиотикам / Н. Сверчкова, Э. Коломиец // Наук. и Инн. – 2014. – № 8. – С. 21–24.

204. Свистунов, А.И. Классификация способов ферментации и ферментеров / А.И. Свистунов // Вестн. НГИЭИ. – 2013. – Т. 10. – № 29. – С. 109–114.

205. Севрюков, А.В. Эффективность применения синбиотического препарата на основе штамма *Bacillus subtilis* В1895 в аквакультуре и ветеринарии / А.В. Севрюков, М.А. Морозова, Ю.И. Левченко, Т.С. Колмакова, В.А. Чистяков // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2013. – № 4 (20). – С. 49–55.
206. Семенов, М.В. Структура бактериальных и грибных сообществ ризосферного и внекорневого локусов серой лесной почвы / М.В. Семенов, Д.А. Никитин, А.Л. Степанов, В.М. Семенов // Почвоведение. – 2019. – № 3. – С. 355–369.
207. Семенов, С.С. Перспективы применения спорообразующих бактерий рода *Bacillus* в сельском хозяйстве Якутии / С.С. Семенов, А.А. Былгаева // Международный научно-исследовательский журнал. – 2015. – №5 (36). – С. 100–102.
208. Семьнина, Т.В. Качество семян не позволяет экономить на протравливании / Т.В. Семьнина // Защ. и Карант. Раст. – 2013. – № 8. – С. 19–21.
209. Серегин, М.В. Учебная практика по растениеводству и кормопроизводству / М.В. Серегин, А.А. Скрябин. – Пермь: ПГСХА. – 2009. – 113 с.
210. Сидорова, Т.М., Особенности антагонизма бактерий рода *Bacillus* по отношению к токсиногенным грибам *Fusarium* при защите растений от болезни и контаминации микотоксинами (обзор) / Т.М. Сидорова, А.М. Асатурова, В.В. Аллахвердян // Юг России: экология, развитие. – 2021. – Т. 16. – № 4. – С. 86–103.
211. Сираева, З.Ю. Биопрепарат для стимуляции роста и защиты растений от болезней на основе *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008: автореф. ... кандидата биологических наук: 03.02.03 / Сираева Зульфия Юнысовна. – Казань, 2012. – 24 с.
212. Слинкина, Е.А. Использование химического метода в системе защиты растений / Е.А. Слинкина // Матер. Всеросс. Научн.-Практ. Конф. «Проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса России». Благовещенск: Изд. Дальнев. Гос. Аграрн. Универ. – 2017. – С. 77–78.
213. Сокирко, В.П. Фитопатогенные грибы (морфология и систематика) / В.П. Сокирко, В.С. Горьковенко, М.И. Зазимко. – Краснодар: Изд. КГАУ. – 2014. – 178 с.
214. Соколова, Л.М. Анализ видового разнообразия грибов из рода *Fusarium* / Л.М. Соколова // Аграрная наука. – 2019. – № (1). – С. 118–122.
215. СП 1.3.2322-08 Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. – М.: Роспотребнадзор. – 2009. – 66 с.

216. Старовойтова, С.А. Пробиотики на основе трансгенных микроорганизмов / С.А. Старовойтова, О.И. Скряцкая // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – Т. 6. – № 1. – С. 34–45.

217. Степашкина, А.В. Бактериальная пенициллинацилаза: взаимосвязь структура – функция и получение одноцепочечной формы фермента: дис. ... кандидата химических наук: 03.01.04., 03.01.06 / Степашкина Анастасия Владимировна – М., 2017. – 164 с.

218. Стогниенко, О.И. Патоконплексы микобиоты сахарной свёклы и методы снижения их вредоносности в ЦЧР России: дис. ... доктора биологических наук: 06.01.07 / Стогниенко Ольга Ивановна – Москва, 2018. – 474 с.

219. Сулейманов, Т.Н. Особенности биотехнологического производства / Т.Н. Сулейманов, А.А. Сидоров // *Вестн. Молод. Учен. Самар. Гос. Эконом. Универ.* – 2016. – № 2 (34). – С. 114–116.

220. Суханова, М.В. Актуальность использования интеллектуальных систем управления динамическими процессами смешивания компонентов сыпучего тела в устройствах для предпосевной обработки семян / М.В. Суханова, В.В. Мирошникова, А.В. Суханов // *Вестн. Аграрн. Наук. Дона*. – 2019. – № 1. – С. 45–54.

221. Сухорученко, Г.И. Формирование ассортимента химических средств защиты растений от вредителей в XX веке / Г.И. Сухорученко, Л.А. Буркова, Г.П. Иванова, Т.И. Васильева, О.В. Долженко, С.Г. Иванов, В.И. Долженко // *Вестн. защиты растений*. – 2020. – № 103 (1). – С. 5–24.

222. Сычева, И.В. Защита растений от болезней / И.В. Сычева. – Брянск: Изд. Брянской ГСХА. – 2012. – 100 с.

223. Сычева, И.В. Эффективность карантинного фитосанитарного контроля в Брянской области / И.В. Сычева, С.А. Земченкова // *Вестн. Брянск. Гос. Сельскохоз. Акад.* – 2019. – № 1 (71). – С. 17–24.

224. Тагиева, С.А. Преимущества применения бактериоцидных препаратов по сравнению с химическими антибиотиками для лечения инфекций у человека и животных / С.А. Тагиева, Ф.Х. Гахраманова // *Вестн. Ворон. Гос. Универ.* – 2020. – № 4. – С. 122–128.

225. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур. – 2009. – 936 с.

226. Тихонович, И.А. Биопрепараты в сельском хозяйстве (Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве) / И.А. Тихонович, А.П. Кожемяков, В.К. Чеботарь, Ю.В. Круглов, Н.В. Кандыбин, Г.Ю. Лаптев. – М.: Россельхозакадемия. – 2005. – 154 с.
227. Тишков, Т.М. Современные вспомогательные вещества / А.В. Погребняк, Л.В. Погребняк // Сов. Пробл. Наук. и Обр. – 2015. – № 2. – С. 1–7.
228. Фатина, П.Н. Применение микробиологических препаратов в сельском хозяйстве / П.Н. Фатина // Вестн. Астр. Гос. Техн. Унив. – 2007. – № 4. – С. 133–136.
229. Федоров, А.А. Жизнь растений. В 6-ти томах. Введение. Бактерии и актиномицеты / А.А. Федоров. – М.: «Просвещение». – 1974. – Т. 1. – 487 с.
230. Федорова, О.В. Питательные среды в производствах медицинских и ветеринарных препаратов / О.В. Федорова, С.А. Понкратова, Р.Т. Валеева, И.Р. Исламгулов // Вестн. Технол. Универ. – 2017. – Т. 20. – № 4. – С. 130–133.
231. Федорова, О.В. Пробиотические препараты на основе микроорганизмов рода *Bacillus* / О.В. Федорова, А.И. Назмиева, Э.И. Нуретдинова, Р.Т. Валеева // Вестн. Казан. Технол. Универ. – 2016. – Т. 19. – № 15. – С. 170–174.
232. Феоктистова, Н.В. Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* в птицеводстве / Н.В. Феоктистова, А.М. Марданова, Г.Ф. Хадиева, М.Р. Шарипова // Учен. зап. Казан. Универ. Серия: Естественные науки. – 2017. – Т. 159. – С. 85–107.
233. Феоктистова, Н.В. Ризосферные бактерии / Н.В. Феоктистова, А.М. Марданова, Г.Ф. Хадиева, М.Р. Шарипова // Учен. зап. Казан. Универ. Серия: Естественные науки. – 2016. – № 2. – С. 207–224.
234. Фирсова, М.С. Подбор питательной среды и оптимизация режима глубинного культивирования *Avibacterium paragallinarum* / М.С. Фирсова, В.А. Евграфова, А.В. Потехин // Ветеринария сегодня. – 2019. – № 2. – С. 12–16.
235. Фирсова, М.С. Подбор питательной среды и оптимизация режима глубинного культивирования *Avibacterium paragallinarum* / М.С. Фирсова, В.А. Евграфова, А.В. Потехин // Ветеринария сегодня. – 2019. – № 2. – С. 12–16.
236. Формула Роста. Производство почвогрунтов и субстратов. Услуги по озеленению городской среды [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://formularosta.ru/>.

237. Франк, Р.И. Биопрепараты в современной земледелии / Р.И. Франк, В.И. Кищенко // *Защ. и Карант. Раст.* – 2008. – № 4. – С. 30–32.
238. Хвасько, А.В. Инфекционные болезни ветвей и ствола дуба в Беларуси / А.В. Хвасько // *Труды БГТУ. Серия 1: Лесное хозяйство, природопользование и переработка возобновляемых ресурсов.* – 2013. – № 1. – С. 250–252.
239. Хуррамов, А.Г. Болезни декоративных хвойных пород в городских условиях Узбекистана / А.Г. Хуррамов, Х.Х. Нуралиев // *Бюллетень науки и практики.* – 2018. – Т. 4. – № 9. – С. 36–41.
240. 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.
241. Церковная, В.С. Фузариоз лука в условиях орошаемого земледелия / В.С. Церковная // *Защ. и Карант. Раст.* – 2012. – № 7. – С. 38–39.
242. Чевердин, А.Ю. Биоэнергетическая и экономическая эффективность применения ассоциативных микробных препаратов на яровом ячмене / А.Ю. Чевердин // *АгроФорум.* – 2019. – № 8. – С. 62–64.
243. Черкасский, Б.Л. Сибирская язва диких животных и проблема природной очаговости этой инфекции / Б.Л. Черкасский, М.Я. Лаврова // *Бюлл. Моск. Общ. Испытат. Прир.* – М.: Изд. Моск. Универ. – 1969. – Т. 74. – Вып. 5. – С. 5–19.
244. Черткова, В.В. Болезни передающиеся семенами яровой пшеницы в зауралье / В.В. Черткова // *Сборн. Стат. по Матер. XIII Всеросс. Научн.-Практ. Конф. Молод. Учен. «Развитие научной, творческой и инновационной деятельности молодежи».* Курган: Изд. Кург. Гос. Сельскохоз. Академ. – 2021. – С. 114–117.
245. Чикин, Ю.А. Общая фитопатология (часть 1) / Ю.А. Чикин. – Томск: Изд. Томск. Гос. Универ. – 2001. – 170 с.
246. Чичерин, И.Ю. Сравнительная экспериментальная оценка эффективности современных пробиотиков, пребиотиков, синбиотиков и метабиотиков при коррекции нарушений микробиоценоза кишечника у животных с антибиотико-ассоциированным дисбиозом / И.Ю. Чичерин, И.П. Погорельский, И.Г. Лундовских, И.В. Дармов, М.Р. Шабалина, А.С. Подволоцкий // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* – 2016. – № 131 (7). – С. 106–120.

247. Чумикина, Л.В. Фитогормоны и абиотические стрессы (обзор) / Л.В. Чумикина, Л.И. Арабова, В.В. Колпакова, А.Ф. Топунов // Хим. Раст. Сырья. – 2021. – № 4. – С. 5–30.
248. Шабурова, Л.Н. Микробиота пивоваренного ячменя Республики Таджикистан / Л.Н. Шабурова, С.Н. Минходжов, Г.А. Ермолаева // Пиво и напитки. – 2008. – № 5. – С. 18–19.
249. Шах М.Р. Бактериофаги почвенных бацилл: новый поливалентный фаг *Bacillus altitudinis* / М.Р. Шах, К.И. Гарифулина, В.В. Ульянова, В.Г. Евтюгин, Л.Н. Миндубаева, Л.Р. Хазиева, Е.В. Дудкина, В.И. Вершинина, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская // Молек. Ген., Микроб. и Вирус. – 2017. – № 2. – С. 59–64.
250. Шашко, Ю. Селекционные методы борьбы с болезнями растений / Ю. Шишко // Наука и инновации. – 2010. – № 7 (89). – С. 24–25.
251. Шендеров, Б.А. Метабиотики — новая технология профилактики и лечения заболеваний, связанных с микроэкологическими нарушениями в организме человека / Б.А. Шендеров, Е.И. Ткаченко, Л.Б. Лазебник, М.Д. Ардатская, А.В. Сеница, М.М. Захарченко // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – № 151 (3). – С. 83–92.
252. Шкаликов, В.А. Защита растений от болезней / В.А. Шкаликов, О.О. Белошапкина, Д.Д. Букреев, И.В. Горбачев, Ф.С.-У. Джалилов, И.В. Корсак, В.Ю. Минаев, Ю.М. Стройков. – М.: Изд. «Колос». – 2010. – 404 с.
253. Штерншис, М.В. Биологическая защита растений / Ф.С.-У. Джалилов, И.В. Андреева, О.Г. Томилова. – М.: Изд. «Колос». – 2004. – 264 с.
254. Штерншис, М.В. Тенденции развития биотехнологии микробных средств защиты растений в России / М.В. штерншис // Вестн. Томск. Гос. Универ. Биология. – 2012. – № 2 (18). – С. 92–100.
255. 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, П.Г. Васильев, В.И. Фролов, Р.В. Котельников // Биопрепараты. – 2014. – № 1 (49). – С. 36–39.

256. Abdel-Monaim, M.F. *Bacillus megaterium*, a new pathogen on lupine plants in Egypt / M.F. Abdel-Monaim, M.R. Gabr, S.M. El-Gantiry, M.N. Shaat, A.A. El-Bana // *Journal of Bacteriology Research*. – 2012. – Vol. 4, N 2. – P. 24–32.
257. Achi, S. Antimicrobial Peptides from *Bacillus* spp. Use in Antimicrobial Packaging. *Antimicrobial Food Packaging* / S. Achi, P.M. Halami. – London: Elsevier. – 2016. – P. 527–537.
258. Adimpong, D.B. Antimicrobial Susceptibility of *Bacillus* Strains Isolated from Primary Starters for African Traditional Bread Production and Characterization of the Bacitracin Operon and Bacitracin Biosynthesis / D.B. Adimpong, K.I. Sorensen, L. Thorsen, B. Stuer-Lauridsen, W.S. Abdelgadir, D.S. Nielsen, P.M.F. Derkx, L. Jespersen // *Appl. and Environm. Microb.* – 2012. – Vol. 78 (22). – P. 7903–7914.
259. Afzal, H. Morphological identification of *Aspergillus* species from the soil of larkana district (Sindh, Pakistan) / H. Afzal, S. Shazad, S.Q. Nisa // *Asian Journal of Agriculture and Biology*. – 2013. – Vol. 1, N 3. – P. 105–117.
260. Alam, S. *Bacillus* species; a potential source of anti-SARS-CoV-2 main protease inhibitors / S. Alam, S. Sadiqi, M. Sabir, S. Nisa, S. Ahmad, S.W. Abbasi // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2021. – P. 1–11.
261. Al-Deriny, S.H. The synergistic effects of *Spirulina platensis* and *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal histomorphology, and immune response of *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*) / S.H. Al-Deriny, M.A.O. Dawood, A.A.A. Zaid, W.F. El-Tras, B.A. Paray, D.H. Van, R.A. Mohamed // *Aquaculture Reports*. – 2020. – Vol. 17. – Ar. 100390.
262. Alina, S.O. Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection / S.O. Alina, F. Constantinescu, C.P. Cornea // *Romanian Biotechnological Letters*. – 2015. – Vol. 20, N 5. – P. 10737–10750.
263. Amoah, K. Dietary supplementation of probiotic bacteria, *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* / K. Amoah, Q.C. Huang, B.P. Tan, S. Zhang, S.Y. Chi, Q.H. Yang, X.H. Dong // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2019. – Vol. 87. – P. 796–808.
264. An, S. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas* / S. An, N. Potnis, M. Dow, F.-J. Vorholter, Y. He, A.

Becker, D. Teper, Y. Li, N. Wang, L. Bleris, J. Tang // FEMS Microbiology Reviews. – 2020. – Vol. 44, N 1. – P. 1–32.

265. Andrews, J.M. Susceptibility testing of *Bacillus* species / J.M. Andrews, R. Wise // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2002. – Vol. 49, N 6. – P. 1040–1042.

266. Ansari, F.A. Fluorescent *Pseudomonas* -FAP2 and *Bacillus licheniformis* interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes / F.A. Ansari, I. Ahmad // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9, N 1. – Ar. 4547.

267. Awais, M. Production of Antimicrobial Metabolites by *Bacillus subtilis* Immobilized in Polyacrylamide Gel / M. Awais, A. Pervez, A. Yaqub, M. Shah // Pakistan J. Zool. – 2010. – Vol. 42, N 3. – P. 267–275.

268. Babiker, B.M. Isolation & Identification of Catalase Producing *Bacillus* spp: A Comparative Study / B.M. Babiker, M.A.E. Ahmed, H.M. Ibrahim // International Journal of Advanced Research. – 2016. – Vol. 4, N 2. – P. 1206–1211.

269. Backer, R. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture / R. Backer, J.S. Rokem, G. Ilangumaran, J. Lamont, D. Praslickova, E. Ricci, A. Subramanian, D.L. Smith // Front Plant Sci. – 2018. – Vol. 9. – Ar. 1473.

270. Baruzzi, F. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food / F. Baruzzi, L. Quintieri, M. Morea, L. Caputo // Sci. against Microb. Path.: Communic. Cur. Res. and Technol. Adv. – 2011. – Vol. 2. – P. 1102–1111.

271. Basu, A. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects / A. Basu, P. Prasad, S.N. Das, S. Kalam, R.Z. Sayyed, M.S. Reddy, E.H. Enshasy // Sustainability. – 2021. – Vol. 13 (3). – Ar. 1140.

272. Baumann, P. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins / P. Baumann, M.A. Clark, L. Baumann, A.H. Broadwell // Microbiological Reviews. – 1991. – Vol. 55, N 3. – P. 425–436.

273. Beltran-Garcia, M.J. Nitrogen acquisition in *Agave tequilana* from degradation of endophytic bacteria / M.J. Beltran-Garcia, J.F. White, F.M. Prado, K.R. Prieto, L.F. Yamaguchi, M.S. Torres, P. Mascio // Sci. Rep. – 2014. – Vol. 4. – Ar. 6938.

274. Benlioglu, K. First Report of Bacterial Blight Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* on Pea in Turkey / K. Benlioglu, U. Ozyilmaz, D. Ertan // Plant Disease. – 2010. – Vol. 94, N 7. – Ar. 923.

275. Bergey, D.H. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1st ed. / D.H. Bergey, F.C. Harrison, R.S. Breed, B.W. Hammer, F.M. Huntoon. – Baltimore: The Williams & Wilkins Co. – 1923. – 442 p.

276. Berkeley, R. Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives / R. Berkeley, M. Heyndrickx, N. Logan, D.P. Vos. – Oxford: Bl. Pub. Comp. – 2002. – 317 p.

277. Bersching, K. The Molecular Mechanism of Fludioxonil Action Is Different to Osmotic Stress Sensing / K. Bersching, S. Jacob // J. of Fungi. – Vol. 7 (5). – Ar. 393.

278. Bilal, M. Effects of novel probiotic strains of *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* on production, gut health, and immunity of broiler chickens raised under suboptimal conditions / M. Bilal, W. Si, F. Barbe, E. Chevaux, O. Sienkiewicz, X. Zhao // Poultry Science. – 2021. – Vol. 100, N 3. – Ar. 100871.

279. Bjerre, K. Development of *Bacillus subtilis* mutants to produce tryptophan in pigs / K. Bjerre, M.D. Cantor, J.V. Nørgaard, H.D. Poulsen, K. Blaabjerg, N. Canibe, B.B. Jensen, B. Stuer-Lauridsen, B. Nielsen, P.M.F. Derkx // Biotechnology Letters. – 2016. – Vol. 39, N 2. – P. 289–295.

280. Blum, S.J. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov. two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic / S.J. Blum, A.B. Bindi, J. Buzzelli, J.F. Stolz R.S. Oremland. // Arch. Microbiol. – 1998. – Vol. 171. – P. 19–30.

281. Boch, J. Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline / J. Boch, B. Kempf, E. Bremer // Journal of Bacteriology. – 1994. – Vol. 176. – Is. 17. – P. 5364–5371.

282. Boone, D.R. *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)-reducing and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface / D.R. Boone, Y.T. Liu, Z.J. Zhao, D.L. Balkwill, G.R. Drake, T.O. Stevens, H.C. Aldrich // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1995. – Vol. 45. – P. 441–448.

283. Borriss, R. Plant Growth Promoting Bacteria – Early Investigations, Present state and Future prospects/ R. Borriss // Intern. J. of Pl. Res. – 2017. – Vol. 30. – Ar. 211.

284. Bottone, E.J. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen / E.J. Bottone // Clinical Microbiology Reviews. – 2010. – Vol. 23, N 2. – P. 382–398.

285. Brozel, V.S. Studying the Life Cycle of Aerobic Endospore-forming Bacteria in Soil. Endospore-Forming Soil Bacteria / V.S. Brozel, Y. Luo, S. Vilain. – Heidelberg: Springer. – 2011. – P. 115–133.
286. Burke, S.A. Detection of Molecular Diversity in *Bacillus atrophaeus* by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis / J.D. Wright, M.K. Robinson, B.V. Bronk, R.L. Warren // Appl. and Env. Microb. – 2004. – Vol. 70, N 5. – P. 2786–2790.
287. Butsenko, L. Characteristic of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* Isolated from Weeds of Wheat Field / L. Butsenko, L. Pasichnyk, Y. Kolomiets, A. Kalinichenko, D. Suszanowicz, M. Sporek, V. Patyka // Appl. Sci. – 2020. – Vol. 11, N 1. – Ar. 286.
288. Cano, R.J. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber / R.J. Cano, M.K. Borucki // Science. – 1995. – Vol. 268 (5213). – P. 1060–1064.
289. Carter, G.R. *Bacillus*. Diagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology / G.R. Carter. – London: Academic Press. – 1990. – P. 221–228.
290. Caulier, S. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group / S. Caulier, C. Nannan, A. Gillis, F. Licciardi, F. Bragard, J. Mahillon // Frontiers in Microbiology. – 2019. – Vol 10. – Ar. 302.
291. Caulier, S. Versatile Antagonistic Activities of Soil-Borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and Other Potato Pathogens / S. Caulier, A. Gillis, G. Colau, F. Licciardi, M. Liépin, N. Desoignies, P. Modrie, A. Legrève, J. Mahillon, C. Bragard // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol. 9. – Ar. 143.
292. Cenci, G. Tolerance to challenges miming gastrointestinal transit by spores and vegetative cells of *Bacillus clausii* / G. Censi, F. Trotta, G. Caldini // Journal of Applied Microbiology. – 2006. – Vol. 101, N 6. – P. 1208–1215.
293. Cohn, F. Untersuchungen über Bakterien. Beiträge zur Biologie der Pflanzen / F. Cohn. – Heft 1. – Breslau: J.U. Kern's Verlag. – 1872. – P. 127–224.
294. Compant, S. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects / S. Compant, B. Duffy, J. Nowak, C. Clement, E.A. Barka // Appl. Env. Microb. – 2005. – Vol. 71. – P. 4951–4959.
295. Crater, J.S. Scale-up of industrial microbial processes / J.S. Crater, J.C. Lievens // FEMS Microbiology Letters. – 2018. – Vol. 365, N 13. – Ar. fny138.

296. Cruz, P.M. Use of Probiotics in Aquaculture / P.M. Cruz, A.L. Ibanez, O.A. Hermosillo, H.C. Saad // Intern. Schol. Res. Netw. – 2012. – Vol. 2012. – Ar. 916845.

297. Derkx, P.M. The art of strain improvement of industrial lactic acid bacteria without the use of recombinant DNA technology / P.M. Derkx, T. Janzen, K.I. Sørensen, J.E. Christensen, B. Stuer-Lauridsen, E. Johansen // Microb. Cell Fact. – 2014. – Vol. 13. – Ar. S5.

298. Desmyttere, H. Antifungal activities of *Bacillus subtilis* lipopeptides to two *Venturia inaequalis* strains possessing different tebuconazole sensitivity / H. Desmyttere, C. Deweer, J. Muchembled, K. Sahmer, J. Jacquin, F. Coutte, P. Jacques // Front. Microbiol. – 2019. – Vol. 10. – Ar. 2327.

299. Dong, C-J. Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants / C-J. Dong, L-L. Wang, Q. Li, Q-M. Shang // PLoS ONE. – 2019. – Vol. 14, N 11. – Ar. e0223847.

300. Du, R. Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* C-1 Improves Growth Performance, Stimulates GH/IGF-1, and Regulates the Gut Microbiota of Growth-Retarded Beef Calves / R. Du, S. Jiao, Y. Dai, J. An, J. Lv, X. Yan, J. Wang, B. Han // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol. 9. – Ar. 2006.

301. Dutta, B. Interactions of Seedborne Bacterial Pathogens with Host and Non-Host Plants in Relation to Seed Infestation and Seedling Transmission / B. Dutta, R. Gitaitis, S. Smith, D. Langston // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 6. – Ar. e99215.

302. Egamberdiyeva, D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils / D. Egamberdiyeva // Applied Soil Ecology. – 2007. – Vol. 36, N 2-3. – P. 184–189.

303. Ehrenberg, C.G. Dritter Beitrag zur Erkenntniss grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes / C.G. Ehrenberg // Physikal. Abhand. der Koenig. Akad. der Wissen. zu Berlin aus den Jahren 1833–1835. – 1835. – P. 145–336.

304. Fajardo-Cavazos, P. Evolution in the *Bacillaceae* / P. Fajardo-Cavazos, H. Maughan, W.L. Nicholson // Microb. Spect. – 2014. – Vol. 2, N 5. – Ar. TBS-00202014.

305. Fakhry, S. Characterization of spore forming *Bacilli* isolated from the human gastrointestinal tract / S. Fakhry, I. Sorrentini, E. Ricca, M. De Felice, L. Baccigalupi // J. Appl. Microbiol. – 2008. – Vol. 105. – P. 2178–2186.

306. Fiedler, G. Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets / G. Fiedler, C. Schneider, E.O. Igbinosa, J. Kabisch, E. Brinks, B. Becker, D.A. Stoll, G.-S. Cho, M. Huch, C.M.A.P. Franz // *BMC Microbiology*. – 2019. – Vol. 19 (1). – Ar. 250.
307. Fischer, A. Untersuchungen über Bakterien / A. Fischer // *Jahrbuch für Wissenschaftliche Botanik*. – 1895. – Vol. 27. – P. 1–163.
308. Fritze, D. Spore-forming, lactic acid producing bacteria of the genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. The Genera of Lactic Acid Bacteria. The Lactic Acid Bacteria / D. Fritze, D. Claus. – Boston: Springer. – 1995. – Vol. 2. – P. 368–391.
309. Fujikawa, H. Diversity of the growth patterns of *Bacillus subtilis* colonies on agar plates / H. Fujikawa // *FEMS Microb. Ecol.* – 1994. – Vol. 13. – Is. 3. – P. 159–168.
310. Fujita, T. Description of *Bacillus carboniphilus* sp. nov. / T. Fujita, O. Shida, H. Takagi, K. Kunugita, A.N. Pankrushina, M. Matsushashi // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1996. – Vol. 46, N 1. – P. 116–118.
311. Gao, H. *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematocidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine / H. Gao, G. Qi, R. Yin, H. Zhang, C. Li, X. Zhao // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – Ar. 28756.
312. Gardener, B.B.M. Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA / B.B.M. Gardener, D.R. Fravel // *Plant Health Progress*. – 2002. – Vol. 3. – Ar. 17.
313. Gbif. *Bacillus Cohn, 1872* [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.gbif.org/ru/species/3227637>
314. Ghasemi, S. Antifungal chitinases from *Bacillus pumilus* SG2: preliminary report / S. Ghasemi, G. Ahmadian, N.B. Jelodar, H. Rahimian, S. Ghandili, A. Dehestani, P. Shariati // *World Journ. of Microb. and Biotech.* – 2010. – Vol. 26 (8). – P. 1437–1443.
315. Gil-Turnes, C. Properties of the *Bacillus Cereus* strain used in probiotic CenBiot / C. Gil-Turnes, A.F. Santos, F.W. Cruz, A.V. Monteiro // *Revista de Microbiologia*. – 1999. – Vol. 30, N 1. – P. 11–14.
316. Gong, M. Study of the Antifungal Ability of *Bacillus subtilis* Strain PY-1 in Vitro and Identification of its Antifungal Substance (Iturin A) / M. Gong, J.-D. Wang, J. Zhang, H. Yang, X.-F. Lu, Y. Pei, J.-Q. Cheng // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. – 2006. – Vol. 38, N 4. – P. 233–240.

317. Gordon, R.E. One hundred and seven years of the genus *Bacillus*. The aerobic endosporeforming bacteria / R.E. Gordon. – London: Academic Press. – 1981. – P. 1–15.
318. Gugliandolo, C. *Bacillus aeolius* sp. nov. a Novel Thermophilic, Halophilic Marine *Bacillus* Species from Eolian Islands (Italy) / C. Gugliandolo, T.L. Maugeri, D. Caccamo, E. Stackebrandt // Syst. Appl. Microb. – 2003. – Vol. 26, N 2. – P. 172–176.
319. Han, S. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in viable but nonculturable state from tomato seed using improved qPCR / S. Han, N. Jiang, Q. Lv, Y. Kan, J. Hao, J. Li, L. Luo // PLOS ONE. – 2018. – Vol. 13, N 5. – Ar. e0196525.
320. Han, S.-R. (2021). *Bacillus subtilis* Inhibits Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Infection in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Intestinal Epithelial Cells / S.-R. Han, H.M. Munangandu, I.-K. Yeo, S.-H. Kim // Viruses. – 2021. – Vol. 13. – Ar. 28.
321. Harwood, C.R. Introduction to the biotechnology of *Bacillus*. *Bacillus* / C.R. Harwood. – London: Springer. – 1989. – P. 1–2.
322. He, C.-N. Antifungal Activity of Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus thuringiensis* against Five Common Spoilage Fungi on Loquats / C.-N. He, W.-Q. Ye, Y.-Y. Zhu, W.-W. Zhou // Molecules. – 2020. – Vol. 25, N 15. – Ar. 3360.
323. Henrici, A.T. The biology of bacteria: an introduction to general microbiology / A.T. Henrici. – Boston: D.C. Heath and Company. – 1934. – 472 p.
324. Heyndrickx, M. Proposal of *Virgibacillus proomii* sp. nov. and emended description of *Virgibacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950) Heyndrickx et al. 1998 / L. Lebbe, K. Kersters, B. Hoste, R. De Wachter, P. De Vos, G. Forsyth, N.A. Logan // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1999. – Vol. 49. – P. 1083–1090.
325. Hori, K. Integrated Production and Separation. Comprehensive Biotechnology / K. Hori. – Oxford: Elsevier. – 2011. – P. 579–590.
326. Horst, R.K. Westcott's Plant Disease Handbook / R.K. Horst. – Boston, MA: Springer. – 2001. – 1008 p.
327. Hoyles, L. Recognition of greater diversity of *Bacillus* species and related bacteria in human faeces / L. Hoyles, H. Honda, N.A. Logan, G. Halket, R.M. La Ragione, A.L. McCartney // Res. Microbiol. – 2012. – Vol. 163. – P. 3–13.
328. Hussain, T. Bio-nematicidal activities by culture filtrate of *Bacillus subtilis* HussainT-AMU: new promising biosurfactant bioagent for the management of Root

Galling caused by *Meloidogyne incognita* / T. Hussain, M. Haris, A. Shakeel, G. Ahmad, K.A. Ahmad, M.A Khan // *Vegetos.* – 2020. – Vol. 33, N 2. – P. 229–238.

329. Ibrahim, M.A. *Bacillus thuringiensis* / M.A. Ibrahim, N. Griko, M. Junker, L.A. Bulla // *Bioengineered Bugs.* – 2010. – Vol. 1. – P. 31–50.

330. Ikeda, M. Towards bacterial strains overproducing l-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering / M. Ikeda // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2005. – Vol. 69, N 6. – P. 615–626.

331. Ilinskaya, O.N. Secretome of Intestinal Bacilli: A Natural Guard against Pathologies / O.N. Ilinskaya, V.V. Ulyanova, D.R. Yarullina, I.G. Gataullin // *Frontiers in Microbiology.* – 2017. – Vol. 8. – Ar. 1666.

332. 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.

333. 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.

334. Jang, M. Genetic Background Behind the Amino Acid Profiles of Fermented Soybeans Produced by Four *Bacillus* spp / M. Jang, D-W. Jeong, G. Heo, H. Kong, C-T. Kim, J-H. Lee // *J. of Microb. and Biotech.* – 2021. – Vol. 31, N 3. – P. 447–455.

335. Jeyaram, K. Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance / K. Jeyaram, W. Romi, T.A. Singh, G.A. Adewumi, K. Basanti, F.A. Oguntoyinbo // *J. of Microb. Meth.* – 2011. – Vol. 87. – P. 161–164.

336. Jimenez, G. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations / G. Jimenez, M. Urdiain, A. Cifuentes, A. Lopez-Lopez, A.R. Blanch, J. Tamames, P. Kampfer, A.B. Kolsto, D. Ramon, J.F. Martinez, F.M. Codoner, R. Rossello-Mora // *Systematic and Appl. Microb.* – 2013. – Vol. 36 (6). – P. 383–391.

337. Jiménez, G. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations / G. Jiménez, M. Urdiain, A. Cifuentes, A. López-López, A.R.

Blanch, J. Tamames, P. Kämpfer, A.B. Kolstø, D. Ramón, J.F. Martínez, F.M. Codoñer, R. Rosselló-Mora // *Syst. Appl. Microb.* – 2013. – Vol. 36. – P. 383–391.

338. Johnston-Monje, D. Seed-Transmitted Bacteria and Fungi Dominate Juvenile Plant Microbiomes / D. Johnston-Monje, J.P. Gutiérrez, L.A.B. Lopez-Lavalle // *Frontiers in Microbiology.* – 2021. – Vol. 12. – Ar. 737616.

339. Kang, Y. A plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) mixture does not display synergistic effects, likely by biofilm but not growth inhibition / Y. Kang, M. Shen, X. Yang, D. Cheng, Q. Zhao // *Microbiology.* – Vol. 83, N 5. – P. 666–673.

340. Khan, N.P. Antifungal Activity of *Bacillus* Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol / N.P. Khan, Martínez-Hidalgo, T.A. Ice, M. Maymon, E.A. Humm, N. Nejat, E.R. Sanders, D. Kaplan, A.M. Hirsch // *Frontiers in Microbiology.* – 2018. – Vol. 9. – Ar. 2363.

341. Kilian, M.U. FZB24 R *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality / M.U. Kilian, Steiner, B. Krebs, H. Junge, G. Schmiedeknecht, R. Hain // *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer.* – 2000. – Vol. 1. – P. 72–93.

342. Koch, R. Die Ätiologie der Milbrandkrankheit, begründet die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus Anthracis* / R. Koch // *Beitrag Biol. Pflanz.* – 1876. – Vol. 2. – P. 277–310.

343. Kristensen, N.B. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials / N.B. Kristensen, T. Bryrup, K.H. Allin, T. Nielsen, T.H. Hansen, O. Pedersen // *Genome Med.* – 2016. – Vol. 8. – Ar. 52.

344. Kumar, A. *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. *Bacteria in Agrobiolology: Crop Ecosystems* / A. Kumar, A. Prakash, B.N. Johri. – Berlin: Springer. – 2011. – P. 37–59.

345. Lahlali, R. Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective / R. Lahlali, S. Ezrari, N. Radouane, J. Kenfaoui, Q. Esmaeel, H. El Hamss, Z. Belabess, E.A. Barka // *Microorganisms.* – 2022. – Vol. 10. – Ar. 596.

346. Lee, N.K. *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier / N.K. Lee, W.S. Kim, H.D. Paik // *Food Science and Biotechnology.* – 2019. – Vol. 28. – P. 1297–1305.

347. Link, H. Medium Formulation and Development. Comprehensive Biotechnology / H. Link, D. Weuster-Botz. – Oxford: Elsevier. – 2011. – P. 119–134.

348. Liu, G. Diversity of *Bacillus*-like species isolated from potato rhizosphere soils in Yili, Xinjiang / G. Liu, B. Liu, J. Che, Q. Chen, N. Lin, W. Cui // Biodiversity Science. – 2017. – Vol. 25, N 8. – P. 856–863.

349. Liu, X. Toxic effects of fludioxonil on the growth, photosynthetic activity, oxidative stress, cell morphology, apoptosis, and metabolism of *Chlorella vulgaris* / X. Liu, X. Wang, F. Zhang, X. Yao, Z. Qiao, J. Deng, Q. Jiao, L. Gong, X. Jiang // Science of The Total Environ. – 2022. – Vol. 838. – Ar. 156069.

350. Liu, Y. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group / Y. Liu, Q. Lai, M. Göker, J.P. Meier-Kolthoff, M. Wang, Y. Sun, L. Wang, Z. Shao // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5, N 1. – Ar. 14082.

351. Logan, N.A. *Bacillus*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / N.A. Logan, P.D. Vos. – Wiley Online Library. – 2015. – 163 p.

352. Lord, J.C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control / J.C. Lord // J. of Invert. Pathol. – 2005. – Vol. 89, N 1. – P. 19–29.

353. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://lpsn.dsmz.de/phylum/bacillota>

354. Lu, Z. Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis* / Z. Lu, W. Guo, C. Liu // J. of Vet. Med. Sci. – 2018. – Vol. 80, N 3. – P. 427–433.

355. Mahdinia, E. Enhanced Vitamin K (Menaquinone-7) Production by *Bacillus subtilis natto* in Biofilm Reactors by Optimization of Glucose-based Medium / E. Mahdinia, A. Demirci, A. Berenjian // Current Pharmaceutical Biotechnology. – 2018. – Vol. 19, N 11. – P. 917–924.

356. Malfanova, N. Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed / N Malfanova, F. Kamilova, S. Validov, A. Shcherbakov, V. Chebotar, I. Tikhonovich, B. Lugtenberg // Microbial Biotechnology. – 2011. – Vol. 4, N 4. – P. 523–532.

357. 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.

358. Malusá, E. Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers / E. Malusá, L. Sas-Paszt, J. Ciesielska // *The Scientific World Journal*. – 2012. – Vol. 2012. – Ar. 491206.

359. Mancini, S. Probiotics in Rabbit Farming: Growth Performance, Health Status, and Meat Quality / S. Mancini, G. Paci // *Animals*. – 2021. – Vol. 11. – Ar. 3388.

360. Martins, R.F. Starch-hydrolyzing bacteria from Ethiopian soda lakes / R.F. Martins, W. Davids, W. Al-Soud, F. Levander, P. Radström, R. Hatti-Kaul // *Extremophiles*. – 2001. – Vol. 5, N 2. – P. 135–144.

361. Mattingly, S.J. Effect of Temperature on the Integrity of *Bacillus psychrophilus* Cell Walls / S.J. Mattingly, G.K. Best // *Journal of Bacteriology*. – 1972. – Vol. 109, N 2. – P. 645–651.

362. Mayor, S. Probiotics have no effect on gut microbiota in healthy people, review suggests / S. Mayor // *BMJ*. – 2016. – Vol. 353. – Ar. i2617.

363. Mazylyte, R. Phosphate Solubilizing Microorganism *Bacillus sp.* MVY-004 and Its Significance for Biomineral Fertilizers’ Development in Agrobiotechnology / R. Mazylyte, J. Kaziuniene, L. Orola, V. Valkovska, E. Lastauskiene, A. Gegeckas // *Biology*. – 2022. – Vol. 11. – Ar. 254.

364. Mbewe, W.K. Epidemiology of potato late blight disease and other major postharvest biotic stresses in Malawi / W.K. Mbewe, O.J. Mwenye, E. Gondwe, A. Nyirenda, G. Supa, K. Masamba, S.P. Kwendani, M. Chiipanthenga, F.P. Chipungu // *MOJ Food Process Technols*. – 2021. – Vol. 9, N 3. – P. 80–86.

365. McKenney, P.T. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat / P.T. McKenney, A. Driks, P. Eichenberger // *Nature Reviews Microbiology*. – 2012. – Vol. – 11, N 1. – P. 33–44.

366. Meena, K.R., Kanwar, S. S. (2015). Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics / // *BioMed Res. Intern*. – 2015. – Ar. 473050.

367. Mendes, R. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms / R. Mendes, P. Garbeva, J.M. Raaijmakers // *FEMS Microbiol Rev*. – 2013. – Vol. 37. – P. 634–663.

368. Milner, R.J. History of *Bacillus thuringiensis* / R.J. Milner // Agriculture, Ecosystems & Environment. – 1994. – Vol. 49, N 1. – P. 9–13.

369. Moayeri, M. Anthrax Pathogenesis / M. Moayeri, S.H. Leppla, C. Vrentas, A.P. Pomerantsev, S. Liu // Ann. Rev. of Microb. – 2015. – Vol. 69. – Is. 1. – P. 185–208.

370. Mohammed, Y. Development of a two-step cultivation strategy for the production of vitamin B12 by *Bacillus megaterium* / Y. Mohammed, B. Lee, Z. Kang, G. Du // Microbial Cell Factories. – 2014. – Vol. 13, N 1. – Ar. 102.

371. Moore, T. Antagonistic Activity of *Bacillus* Bacteria against Food-Borne Pathogens / T. Moore, L. Globa, J. Barbaree, V. Vodyanoy, I. Sorokulova // J Prob Health. – 2013. – Vol. 1. – Ar. 110.

372. Morton, V. A Short History of Fungicides / V. Morton, T. Staub // Online, APSnet Features. – 2008.

373. Mual, P. Reclassification of *Bacillus isronensis* Shivaji et al. 2009 as *Solibacillus isronensis* comb. nov. and emended description of genus *Solibacillus* Krishnamurthi et al. 2009 / P. Mual, N.K. Singh, A. Verma, P. Schumann, S. Krishnamurthi, S. Dastager, S. Mayilra // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2016. – Vol. 66. – P. 2113–2120.

374. Nakano, M.M. Molecular Biology of Antibiotic Production in *Bacillus* / M.M. Nakano, P. Zuber // Crit. Rev. in Biotech. – 1990. – Vol. 10, N 3. – P. 223–240.

375. Nicholson, W.L. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments / W.L. Nicholson, N. Munakata, G. Horneck, H.J. Melosh, P. Setlow // Microb. and Molec. Biol. Rev. – 2000. – Vol. 64, N 3. – P. 548–572.

376. Nielsen, P. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species / P. Nielsen, D. Fritze, F.G. Priest // Microbiology. – 1995. – Vol. 141, N 7. – P. 1745–1761.

377. Nwagu, T.N. Evaluation of the probiotic attributes of *Bacillus* strains isolated from traditional fermented African locust bean seeds (*Parkia biglobosa*), “daddawa.” / T.N. Nwagu, C.J. Ugwuodo, C.O. Onwosi, O. Inyima, O.C. Uchendu, C. Akpuru // Annals of Microbiology. – 2020. – Vol. 70, N 1. – Ar. 20.

378. Oren, A. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes / A. Oren, G.M. Garrity // Int J Syst Evol Microbiol. – 2021. – Vol. 71, N 10. – Ar. 5056.

379. Owusu-Kwarteng, J. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products / J. Owusu-Kwarteng, A. Wuni, F. Akabanda, K. Tano-Debrah, L. Jespersen // BMC Microbiology. – 2017. – Vol. 14. – Ar. 65.

380. Pandey, A. *Bacillus* species: The dominant bacteria of the rhizosphere of established tea bushes / A. Pandey, L.M.S. Palni // Microbiological Research. – 1997. – Vol. 152, N 4. – P. 359–365.

381. Park, H.-W. Properties and applied use of the mosquitocidal bacterium, *Bacillus sphaericus* / H.-W. Park, D.K. Bideshi, B.A. Federici // Journal of Asia-Pacific Entomology. – 2010. – Vol. 13, N 3. – P. 159–168.

382. Park, S.J. The role of AiiA, a quorum quenching enzyme from *Bacillus thuringiensis* on the rhizosphere competence / S.J. Park, S.Y. Park, C.-M. Ryu, S.W. Park, J.K. Lee // J Microbiol Biotechnol. – 2008. – Vol. 18. – Ar. 1518–1521.

383. Parte, A.C. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on / A.C. Parte // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2018. – Vol. 68, N 6. – P. 1825–1829

384. Pinheiro, V. Influence of Toyocerin® (*Bacillus cereus* var. *toyoi*) on the breeding performances of primiparous rabbit does / V. Pinheiro, J.L. Mourao, G. Jimenez // World Rabbit Science. – 2007. – Vol. 15. – P. 179–188.

385. Priest, F.G. A numerical classification of the genus *Bacillus* / F.G. Priest, M. Goodfellow, C. Todd // J. of Gen. Microb. – 1988. – Vol. 134. – P. 1847–1882.

386. Radhakrishnan, R. *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments / R. Radhakrishnan, A. Hashem, A.E.F. Abd // Frontiers in Physiology. – 2017. – Vol. 8. – Ar. 667.

387. Ramakrishna, B.S. The Normal Bacterial Flora of the Human Intestine and Its Regulation / B.S. Ramakrishna // J. of Clin. Gastroenter. – 2007. – Vol. 41. – P. 2–6.

388. Randhawa, A. Over-expression of the CORVET complex alleviates the fungicidal effects of fludioxonil on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing Hybrid histidine kinase 3 / A. Randhawa, D. Kundu, A. Sharma, R. Prasad, A.K. Mondal // Journ. of Biol. Chem. – 2019. – Vol. 294 (2). – P. 461–475.

389. Remize, F. Spore-Forming Bacteria. The Microbiological Quality of Food / F. Remize. – Cambridge: Woodhead Publishing. – 2017. – P. 99–120.

390. Rojas-Solís, D. Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) / D. Rojas-Solís, C.E. Hernández-Pacheco, G. Santoyo // Revista Chapingo Serie Horticultura. – 2016. – Vol. 22, N 1. – P. 45–57.

391. Sarr, M. Taxono-genomics description of *Bacillus dakarensis* sp. nov., *Bacillus sinesaloumensis* sp. nov., and *Bacillus massiliogabonensis* sp. nov., three new species isolated from human stools / M. Sarr, C.I. Lo, M.L. Tall, A. Fadlane, B. Senghor, C. Sokhna, D. Raoult, M. Million, F. Fenollar // New Microbes and New Infections. – 2020. – Vol. 37. – Ar. 100718.

392. Satapute, P.P. Isolation and characterization of nitrogen fixing *bacillus subtilis* strain as-4 from agricultural soil / P.P. Satapute, H.S. Olekar, A.A. Shetti, A.G. Kulkarni, G.B. Hiremath, B.I. Patagundi, C.T. Shivsharan, B. Kaliwal // Intern. J. of Recent Scien. Research. – 2012. – Vol. 3, N 9. – P. 762–765.

393. Sato, T. Production of Menaquinone (vitamin K₂)-7 by *Bacillus subtilis* / T. Sato, Y. Yamada, Y. Ohtani, N. Mitsui, H. Murasawa, S. Araki // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2001. – Vol. 91, N 1. – P. 16–20.

394. Sekar, A. Screening and selection of bacteria inhibiting white spot syndrome virus infection to *Litopenaeus vannamei* / A. Sekar, M. Kim, H. Jeon, K. Kim // Biochemistry and Biophysics Reports. – 2019. – Vol. 19. – Ar. 100663.

395. Sella, S.R. *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications - a review / S.R. Sella, L.P. Vandenberghe, C.R. Socol // Crit. Rev. Biotechnol. – 2015. – Vol. 35. – P. 533–545.

396. Senol, M. Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum* / M. Senol, H. Nadaroglu, N. Dikbas, R. Kotan // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. – 2014. – Vol. 13, N 1. – Ar. 35.

397. Setlow, P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals / P. Setlow // J. of Appl. Microb. – 2006. – Vol. 101, N 3. – P. 514–525.

398. Shah Mahmud, R. Ribonuclease from *Bacillus* Acts as an Antiviral Agent against Negative- and Positive-Sense Single Stranded Human Respiratory RNA Viruses /

R. Shah Mahmud, C. Müller, Y. Romanova, A. Mostafa, V. Ulyanova, S. Pleschka, O. Ilinskaya // *BioMed Research International*. – 2017. – Vol. 2017. – Ar. 5279065.

399. Shida, O. Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. / O. Shida, H. Takagi, K. Kadowaki, K. Komagata // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1996. – Vol. 46, N 4. – P. 939–946.

400. Silva, D.S. Antiviral activity of a *Bacillus* sp: P34 peptide against pathogenic viruses of domestic animals / D.S. Silva, C.C. Castro, F.S. Silva, V. Santanna, G.D. Vargas, M. Lima, G. Fischer, A. Brandelli, A.S. Motta, S.O. Hübner // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2014. – Vol. 45, N 3. – P. 1089–1094.

401. Singha, P. Microbial pesticides: trends, scope and adoption for plant and soil improvement. *Biopesticides. Advances in Bio-Inoculants Advances in Bio-inoculant Science* / P. Singha, P. Mazumdar. – Cambridge: Woodhead Publ. – 2022. – P. 37–71.

402. Slepecky, R.A. The Genus *Bacillus*–Nonmedical. *The Prokaryotes* / R.A. Slepecky, H.E. Hemphill. – New York: Springer. – 2006. – P. 530–562.

403. Smith, N.R. *Aerobic Sporeforming Bacteria*. United States Department of Agriculture Monograph no. 16 / N.R. Smith, R.E. Gordon, F.E. Clark. – Washington: USDA. – 1952. – 148 p.

404. Soleha, S. The identification and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* causing acacia seedling wilt disease / S. Soleha, A. Muslim, S. Suwandi, S. Kadir, R. Pratama // *Journal of Forestry Research*. – 2021. – Vol. 33, N 2. – P. 711–719.

405. Soni, A. *Bacillus* Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies / A. Soni, I. Oey, P. Silcock, P. Bremer // *Compreh. Rev. in Food Sci. and Food Saf.* – 2016. – Vol. 15, N 6. – P. 1139–1148.

406. Sood, S. *Inoculum Preparation*. *Comprehensive Biotechnology* / S. Sood, R. Singhal, S. Bhat, A. Kumar. – Oxford: Elsevier. – 2011. – P. 151–164.

407. Sorokulova, I. Modern Status and Perspectives of *Bacillus* Bacteria as Probiotics / I. Sorokulova // *J. Prob. Health*. – 2013. – Vol. 1, N 4. – Ar. 1000e106.

408. Spatafora, J.W. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data / J.W. Spatafora, Y. Chang, G.L. Benny, K. Lazarus, M.E. Smith, M.L. Berbee, G. Bonito, N. Corradi, I. Grigoriev, A. Gryganskyi, T.Y. James, K. O'Donnell, R.W. Roberson, T.N. Taylor, J. Uehling, R. Vilgalys, M.M. White, J.E. Stajich // *Mycologia*. – 2016. – Vol. 108, N 5. – P. 1028–1046.

409. Stein, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions / T. Stein // Mol. Microbiol. – 2005. – Vol. 56, N 4. – P. 845–857.

410. Stoica, R.M. Antimicrobial compounds of the genus *Bacillus*: A review / R.M. Stoica, M. Moscovici, C. Tomulescu, A. Cășărică, N. Băbeanu, O. Popa, H.I.A. Kahraman // Romanian Biotechnological Letters. – 2019. – Vol. 24, N 6. – P.1111–1119.

411. Su, Y. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine / Y. Su, C. Liu, H. Fang, D. Zhang // Microb. Cell Fact. – 2020. – Vol. 19, N 1. – Ar. 173.

412. Tancos, M.A. Tomato Fruit and Seed Colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through External and Internal Routes / M.A. Tancos, L. Chalupowicz, I. Barash, S. Manulis-Sasson, C.D. Smart // Applied and Environmental Microbiology. – 2013. – Vol. 79, N 22. – P. 6948–6957.

413. Tariq, M. Non-rhizobial bacteria for improved nodulation and grain yield of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] / M. Tariq, S. Hameed, T. Yasmeen, A. Ali // Afr J Biotechnol. – 2012. – Vol. 11. – P. 15012–15019.

414. Tkalec, V. Analysis of seed-associated bacteria and fungi on staple crops using the cultivation and metagenomic approaches / V. Tkalec, A. Mahnic, P. Gselman, M. Rupnik // Folia Microbiologica. – 2022. – Vol. 67. – P. 351–361.

415. Tojo, S. Activation of Antibiotic Production in *Bacillus* spp. by Cumulative Drug Resistance Mutations / S. Tojo, Y. Tanaka, K. Ochi // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2015. – Vol. 59, N 12. – P. 7799–7804.

416. Vilain, S. Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil / S. Vilain, Y. Luo, M.B. Hildreth, V.S. Brozel // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72, N 7. – P. 4970–4977.

417. Villarreal-Delgado, M.F. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity / M.F. Villarreal-Delgado, E.D. Villarodríguez, L.A. CiraChávez, Estrada- M.I. Alvarado, F.I. Parra-Cota, S.-V.S. Delos // Revista Mexicana de Fitopatología. – 2017. – Vol. 36, N 1. – P. 95–130.

418. Vocciante, M. The Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Mitigating Plant's Environmental Stresses / M. Vocciante, M. Grifoni, D. Fusini, G. Petruzzelli, E. Franchi // Applied Sciences. – 2022. – Vol. 12 (3). – Ar. 1231.

419. Vos, P. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / P. Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W.B. Whitman. – New York: Springer-Verlag. – 2009. – Vol. 3. – 1450 p.

420. Wahyudi, A.T. Characterization of *Bacillus sp.* strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria / A.T. Wahyudi, R.P. Astuti, A. Widyawati, A. Meryandini, A.A. Nawangsih // *Jour. of Microb. Indonesia*. – 2011. – Vol. 3, N 2. – P. 34–40.

421. Walther, G. Updates on the Taxonomy of Mucorales with an Emphasis on Clinically Important Taxa / G. Walther, L. Wagner, O. Kurzai // *Journal of Fungi*. – 2019. – Vol. 5, N 4. – Ar. 106.

422. Wang, Y.C. Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, than single probiotic strains / Y.C. Wang, S.Y. Hu, C.S. Chiu, C.H. Liu // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2019. – Vol. 84. – P. 1050–1058.

423. Whipps, J.M. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype / J.M. Whipps, P. Hand, D. Pink, G.D. Bending // *Journal of Applied Microbiology*. – 2008. – Vol. 105, N 6. – P. 1744–1755.

424. Win, T.T. The effect of a consortium of *Penicillium sp.* and *Bacillus spp.* in suppressing banana fungal diseases caused by *Fusarium sp.* and *Alternaria sp.* / T.T. Win, B. Bo, P. Malec, P. Fu // *J. of Appl. Microb.* – 2021. – Vol. 131, N 4. – P. 1890–1908.

425. Wisotzkey, J.D. Comparative Sequence Analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and Proposal for Creation of a New Genus, *Alicyclobacillus* gen. Nov / J.D. Wisotzkey, P. Jurtshuk, G.E. Fox, G. Deinhard, K. Poralla // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1992. – Vol. 42, N 2. – P. 263–269.

426. Woudenberg, J.H.C. *Alternaria* redefined / J.H.C. Woudenberg, J.Z. Groenewald, M. Binder, P.W. Crous // *Stud. in Mycol.* – 2013. – Vol. 75. – P. 171–212.

427. Wragg, P. Comparison of Biolog GEN III MicroStation semi-automated bacterial identification system with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and 16S ribosomal RNA gene sequencing for the identification of bacteria of veterinary interest / P. Wragg, L. Randall, A.M. Whatmore // *Journ. of Microb. Meth.* – 2014. – Vol. 105. – P. 16–21.

428. Wu, J. Isolation and characterization of *Bacillus sp.* GFP-2, a novel *Bacillus* strain with antimicrobial activities, from Whitespotted bamboo shark intestine / J. Wu, G. Xu, Y. Jin, C. Sun, L. Zhou, G. Lin, R. Xu, L. Wei, H. Fei, D. Wang, J. Chen, Z. Lv, K. Liu // *AMB Express.* – 2018. – Vol. 8, N 1. – Ar. 84.
429. Xin, X.-F. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen / X.-F. Xin, B. Kvitko, S.Y. He // *Nat. Rev. Microb.* – 2018. – Vol. 16, N 5. – P. 316–328.
430. Yuan, J. Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense* / J. Yuan, W. Raza, Q. Shen, Q. Huang // *Appl. and Envir. Microb.* – 2012. – Vol. 78, N 16. – P. 5942–5944.
431. Yumoto, I. *Bacillus krulwichiae sp. nov.*, a halotolerant obligate alkaliphile that utilizes benzoate and m-hydroxybenzoate / I. Yumoto // *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* – 2003. – Vol. 53, N 5. – P. 1531–1536.
432. Zhang, N. A Review of Advanced Technologies and Development for Hyperspectral-Based Plant Disease Detection in the Past Three Decades / N. Zhang, G. Yang, Y. Pan, X. Yang, L. Chen, C. Zhao // *Rem. Sen.* – 2020. – Vol. 12, N 19. – Ar. 3188.
433. Zheng, Z. Nematicidal spore-forming Bacilli share similar virulence factors and mechanisms / Z. Zheng, J. Zheng, Z. Zhang, D. Peng, M. Sun // *Scientific Reports.* – 2016. – Vol. 6. – Ar. 31341.
434. Zulkifli, N.A. Morphological and Molecular Diversity of *Aspergillus* from Corn Grain Used as Livestock Feed / N.A. Zulkifli, L. Zakaria // *HAYATI Journal of Biosciences.* – 2017. – Vol. 24, N 1. – P. 26–34.

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 Практик. – 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* RCAM05516 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. – 6 с.

4. Пат. 2797699 Российская Федерация, МПК51 С 12 N 1/20, С12R 1/07. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* RCAM05517 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 плесеням, 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 Пущинской 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.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Документы, подтверждающие внедрение результатов диссертационного исследования

<p>Алтайский государственный университет, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, тел. +7 (3852) 291 291</p> <p style="text-align: center;">УТВЕРЖДАЮ Первый проректор по учебной работе Алтайского государственного университета Е.А. Жданова «21» августа 2023 г.</p> <p style="text-align: center;">АКТ Внедрения в учебный процесс на кафедре экологии, биохимии и биотехнологии Алтайского государственного университета результатов диссертационной работы А.В. Малковой на тему «Разработка биологического препарата для растениеводства на основе новых штаммов бактерий рода <i>Bacillus</i> и оценка его эффективности»</p> <p>Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: зав. кафедрой экологии, биохимии и биотехнологии, д.б.н., профессор Соколова Г.Г., к.б.н., доцент Шарлаева Е.А., к.с.-х.н., доцент Бородулина И.Д., к.б.н., доцент Хлебова Л.П., к.б.н., доцент Бобина И.В. удостоверяем, что результаты диссертационной работы Малковой А.В. используются в учебном процессе кафедры экологии, биохимии и биотехнологии Алтайского государственного университета (курсы Микробиология и вирусология, Пищевая микробиология, Санитарная микробиология, Пищевая биотехнология).</p> <p>Зав. каф. экологии, биохимии и биотехнологии, д.б.н., профессор  Г.Г. Соколова</p> <p>К.б.н., доцент кафедры экологии, биохимии и биотехнологии  Е.А. Шарлаева</p> <p>К.с.-х.н., доцент кафедры экологии, биохимии и биотехнологии  И.Д. Бородулина</p> <p>К.б.н., доцент кафедры экологии, биохимии и биотехнологии  Л.П. Хлебова</p> <p>К.б.н., доцент кафедры экологии, биохимии и биотехнологии  И.В. Бобина</p> <p>«21» августа 2023 г.</p>	<p style="text-align: center;">УТВЕРЖДАЮ Ректор ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», д.э.н. С.Н. Бочаров «21» августа 2023 г.</p> <p style="text-align: center;">УТВЕРЖДАЮ Директор ООО «АгроУспех» В.И. Терновой «21» августа 2023 г.</p> <p style="text-align: center;">АКТ ВНЕДРЕНИЯ результатов научно-исследовательской работы «Разработка биологического препарата для растениеводства на основе новых штаммов бактерий рода <i>Bacillus</i> и оценка его эффективности»</p> <p>Место проведения: Алтайский край, Первомайский район, ООО «АгроУспех» Время проведения: 2021–2022 гг.</p> <p>Настоящим актом утверждается, что результаты работы «Разработка биологического препарата для растениеводства на основе новых штаммов бактерий рода <i>Bacillus</i> и оценка его эффективности», выполненной А.В. Малковой под руководством и.о. директора ИЦ «Промбиотех», к.б.н. Иркитовой А.Н., внедрены в 2021–2022 годах на производственных полях ООО «АгроУспех».</p> <p>В полевых условиях на площади 600 м² был заложен производственный эксперимент по определению эффективности разработанного прототипа биопрепарата (ТИ приказ ректора от 31.10.2022 г. №1551/п; ТУ 20.15.80-002-02067818-2022, введено впервые 23.09.2022 г.) на основе трех штаммов <i>Bacillus pumilus</i> (Пат. РФ 2797825, Пат. РФ 2797699, Пат. РФ 2694522) при предпосевной обработке семян подсолнечника.</p> <p>В результате исследований было установлено, что в оба года испытаний отмечалось значимое увеличение биологической урожайности подсолнечника на 68,5 % в среднем в опыте по сравнению с контролем (без обработки семян), а также массы семян с 1 корзинки и 1000 зерен на 47,3 % и 18,9 % в среднем соответственно. Согласно расчетам, экономический эффект (выручка) с применением предложенного прототипа биопрепарата при возделывании подсолнечника может составить более 65 %. А ресурсоотдача, отражающая сколько рублей прибыли получит хозяйство дополнительно на каждый рубль, вложенный в опытный препарат, может составить – 185,87 руб./руб.</p> <p>Представители ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»: И.о. директора ИЦ «Промбиотех», к.б.н. М.н.с. ИЦ «Промбиотех» Представитель хозяйства</p> <p style="text-align: right;"> А.Н. Иркитова  А.В. Малкова  П.А. Литвинцев</p>
Акт внедрения в учебный процесс	Акт внедрения в хозяйство

Справки о депонировании и патенты на штаммы *B. pumilus* из состава нового биопрепарата

 <p>Russian Collection of Agricultural Microorganisms</p> <p>МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ</p> <p>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСХМ)</p> <hr/> <p>196608 Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3 Телефон 8-812-470-51-00 Факс 470-43-62</p> <p>Выдано в ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»</p> <p><i>28.04.2022</i> № <i>56/04</i></p> <p>СПРАВКА о депонировании культуры микроорганизмов в Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства (RCAM)</p> <p>1.Депозиторы: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный университет», 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, д.61.</p> <p>2.Авторы: Малкова А.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е.</p> <p>3.Штамм <i>Bacillus pumilus</i> 4 является высокоэффективным антагонистом фитопатогенных грибов <i>Phytophthora infestans</i>, <i>Alternaria</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.</p> <p>4. Штамм <i>Bacillus pumilus</i> 4 депонирован с целью проведения патентной процедуры 20 апреля 2022 г. под регистрационным номером RCAM05516.</p> <p>5.Адрес коллекции: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, ФГБНУ ВНИИСХМ; тел. (812)470-51-00, факс(812)470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru, сайт: http://www.arriam.ru</p> <p>Директор ФГБНУ ВНИИСХМ, д.б.н. <i>Н.А. Проворов</i> Н.А. Проворов Заведующая RCAM, к.б.н. <i>В.И. Сафронова</i> В.И.Сафронова</p>	<p>РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ (19) RU (11) 2 797 825 (13) C1</p>  <p>(51) МПК C12N 1/20 (2006.01) (52) СПК C12N 1/20 (2022.08)</p> <p>ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ</p> <p>(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ</p> <p>Статус: действует (последнее изменение статуса: 10.06.2023) Пошлина: Установленный срок для уплаты пошлины за 3 год: с 04.08.2023 по 03.08.2024. При уплате пошлины за 3 год в дополнительный 6-месячный срок с 04.08.2024 по 03.02.2025 размер пошлины увеличивается на 50%.</p> <p>(21)(22) Заявка: 2022121279, 03.08.2022</p> <p>(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 03.08.2022</p> <p>Дата регистрации: 08.06.2023</p> <p>Приоритет(ы): (22) Дата подачи заявки: 03.08.2022</p> <p>(45) Опубликовано: 08.06.2023 Бюл. № 16</p> <p>(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: КОРНЕВА О.Г., и др., Эффективность применения биопрепаратов для защиты картофеля от болезней в условиях дельты волги, Вестник Мичуринского государственного аграрного университета, 2019, N 2., с. 69-72. RU 2764695 C1, 19.01.2022. POGACEAN M.O., et al., Plant protection products and their sustainable and environmentally friendly use, Environmental Engineering and Management Journal, 2009., vol. 8. - Is. 3. - P. 607-627. doi: 10.30638/eemj.2009.084.</p> <p>Адрес для переписки: 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВО "Алтайский государственный университет", ЦРПТТУИС</p> <p>(72) Автор(ы): Малкова Ангелина Владимировна (RU), Иркитова Алена Николаевна (RU), Евдокимов Иван Юрьевич (RU), Ширманов Максим Вячеславович (RU), Дудник Дина Евгеньевна (RU), Каргашилова Екатерина Николаевна (RU)</p> <p>(73) Патентообладатель(и): федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Алтайский государственный университет" (RU)</p> <p>(54) Штамм бактерий <i>Bacillus pumilus</i> RCAM05516 для защиты растений от фитопатогенных грибов <i>Phytophthora infestans</i>, <i>Alternaria</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> sp. и стимуляции роста растений</p>
<p>На штамм <i>B. pumilus</i> 4 (RCAM05516, Пат. 2797825)</p>	



Russian Collection of Agricultural Microorganisms

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
шоссе Подбельского, 3
Телефон 8-812-470-51-00
Факс 470-43-62

Выдано в ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный университет»

28.04.2022, № 58/04

СПРАВКА

о депонировании культуры микроорганизмов в Сетевой биоресурсной
коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства
(RCAM)

- 1.Депозиторы:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный университет», 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, д.61.
- 2.Авторы:** Малкова А.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е.
- 3.Штамм *Bacillus pumilus* 7** является высокоэффективным антагонистом фитопатогенных грибов *Phytophthora infestans*, *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.
- 4. Штамм *Bacillus pumilus* 7** депонирован с целью проведения патентной процедуры 20 апреля 2022 г. под регистрационным номером **RCAM05517**.
- 5.Адрес коллекции:** 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, ФГБНУ ВНИИСХМ; тел. (812)470-51-00, факс(812)470-43-62, e-mail: v.safronova@rambler.ru, сайт: <http://www.arriam.ru>

Директор ФГБНУ ВНИИСХМ, д.б.н.

Н.А. Проворов

Заведующая RCAM, к.б.н.

В.И.Сафронова



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) **2 797 699** (13) C1



(51) МПК
[C12N 1/20 \(2006.01\)](#)
[C12R 1/07 \(2006.01\)](#)
(52) СПК
[C12N 1/20 \(2022.08\)](#)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 10.06.2023)
Пошлина: Установленный срок для уплаты пошлины за 3 год: с 04.08.2023 по 03.08.2024. При
уплате пошлины за 3 год в дополнительный 6-месячный срок с 04.08.2024 по 03.02.2025
размер пошлины увеличивается на 50%.

(21)(22) Заявка: **2022121280**, 03.08.2022

(72) Автор(ы):

**Малкова Ангелина Владимировна (RU),
Иркитова Алена Николаевна (RU),
Евдокимов Иван Юрьевич (RU),
Ширманов Максим Вячеславович (RU),
Дудник Дина Евгеньевна (RU),
Каргашилова Екатерина Николаевна (RU)**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.08.2022

Дата регистрации:
07.06.2023

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **03.08.2022**

(45) Опубликовано: **07.06.2023** Бюл. № **16**

(73) Патентообладатель(и):

**федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Алтайский государственный
университет" (RU)**

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **КОРНЕВА О.Г., и др.,
Эффективность применения
биопрепаратов для защиты картофеля от
болезней в условиях дельты волги, Вестник
Мичуринского государственного аграрного
университета, 2019, N 2., с. 69-72. RU
2701500 C1,26.09.2019. POGACEAN M.O., et
al, Plant protection products and their
sustainable and environmentally friendly use,
Environmental**

**Engineering and Management Journal, 2009., vol.
8. - Is. 3. - P. 607-627. doi:
10.30638/eamj.2009.084.**

Адрес для переписки:

**656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ
ВО "Алтайский государственный
университет", ЦРПТТУИС**

(54) Штамм бактерий *Bacillus pumilus* RCAM05517 для защиты растений от фитопатогенных грибов *Phytophthora infestans*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. и стимуляции роста растений

На штамм *B. pumilus* 7 (RCAM05517, Пат. 2797699)

<p>НАЦИОНАЛЬНЫЙ БИОРЕСУРСНЫЙ ЦЕНТР Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика</p> <p>117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1, тел: (495) 315 12 10, e-mail: vkpm@genetika.ru</p> <p>13250</p> <p>НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ</p> <p>СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ</p> <p>Биоресурсный Центр Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика приняла на национальное патентное депонирование культуру:</p> <p><i>Bacillus pumilus</i> 16</p> <p>Дата депонирования: 3 декабря 2018 года</p> <p>Депозитор: ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»</p> <p>Область применения штамма (продукт, продуцируемый штаммом): Продуцент антибиотических соединений</p> <p>РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-13250</p> <p>Директор БРЦ ВКПМ Проф.</p> <p>Синеокий С.П.</p>	<p>РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ</p> <p>(19) RU ⁽¹¹⁾ 2 694 522 ⁽¹³⁾ C1</p> <p>ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ (51) МПК C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/07 (2006.01)</p> <p>(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ Статус: действует (последнее изменение статуса: 16.07.2019)</p> <table border="1"> <tr> <td data-bbox="1256 608 1608 1353"> <p>(21)(22) Заявка: 2018146694, 25.12.2018</p> <p>(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 25.12.2018</p> <p>Дата регистрации: 16.07.2019</p> <p>Приоритет(ы): (22) Дата подачи заявки: 25.12.2018</p> <p>(45) Опубликовано: 16.07.2019 Бюл. № 20</p> <p>(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2405821 C1, 10.12.2010. ВУ 9685 C1, 30.11.2006. ГРЕБЕНЩИКОВА А.В., Изучение антагонистической активности бактериальных консорциумов на основе штаммов <i>Bacillus subtilis</i>, Труды молодых ученых Алтайского Государственного Университета. Материалы V региональной молодежной конференции "Мой выбор - наука", XIV научной конференции студентов, магистрантов, аспирантов и учащихся лицейных классов, 1-28 апреля 2018, вып. 15, с. 6-8. ОРЕЛОВА Т.Н., ИРКИТОВА А.Н., ГРЕБЕНЩИКОВА А.В., Антагонистическая активность <i>Bacillus subtilis</i>, Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2018, N 5 (163), с. 141-145. MANOJ KAUSHAL, AJAY KUMAR, RAJESH KAUSHAL, <i>Bacillus pumilus</i> strain YSPMK11 as plant growth promoter and biocontrol agent against <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>, Biotech, 2017, 7:90, p. 1-9. 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВО "Алтайский государственный университет", ЦРТИПТУИС</p> </td> <td data-bbox="1608 608 1960 1353"> <p>(72) Автор(ы): Ирkitова Алена Николаевна (RU), Гребенщикова Ангелина Владимировна (RU)</p> <p>(73) Патентообладатель(и): Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Алтайский государственный университет" (RU)</p> </td> </tr> </table> <p>(54) Штамм бактерий <i>Bacillus pumilus</i> ВКПМ В-13250, обладающий выраженным антагонизмом по отношению к микроорганизмам <i>Escherichia coli</i>, <i>Candida albicans</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>St. epidermidis</i></p>	<p>(21)(22) Заявка: 2018146694, 25.12.2018</p> <p>(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 25.12.2018</p> <p>Дата регистрации: 16.07.2019</p> <p>Приоритет(ы): (22) Дата подачи заявки: 25.12.2018</p> <p>(45) Опубликовано: 16.07.2019 Бюл. № 20</p> <p>(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2405821 C1, 10.12.2010. ВУ 9685 C1, 30.11.2006. ГРЕБЕНЩИКОВА А.В., Изучение антагонистической активности бактериальных консорциумов на основе штаммов <i>Bacillus subtilis</i>, Труды молодых ученых Алтайского Государственного Университета. Материалы V региональной молодежной конференции "Мой выбор - наука", XIV научной конференции студентов, магистрантов, аспирантов и учащихся лицейных классов, 1-28 апреля 2018, вып. 15, с. 6-8. ОРЕЛОВА Т.Н., ИРКИТОВА А.Н., ГРЕБЕНЩИКОВА А.В., Антагонистическая активность <i>Bacillus subtilis</i>, Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2018, N 5 (163), с. 141-145. MANOJ KAUSHAL, AJAY KUMAR, RAJESH KAUSHAL, <i>Bacillus pumilus</i> strain YSPMK11 as plant growth promoter and biocontrol agent against <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>, Biotech, 2017, 7:90, p. 1-9. 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВО "Алтайский государственный университет", ЦРТИПТУИС</p>	<p>(72) Автор(ы): Ирkitова Алена Николаевна (RU), Гребенщикова Ангелина Владимировна (RU)</p> <p>(73) Патентообладатель(и): Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Алтайский государственный университет" (RU)</p>
<p>(21)(22) Заявка: 2018146694, 25.12.2018</p> <p>(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 25.12.2018</p> <p>Дата регистрации: 16.07.2019</p> <p>Приоритет(ы): (22) Дата подачи заявки: 25.12.2018</p> <p>(45) Опубликовано: 16.07.2019 Бюл. № 20</p> <p>(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2405821 C1, 10.12.2010. ВУ 9685 C1, 30.11.2006. ГРЕБЕНЩИКОВА А.В., Изучение антагонистической активности бактериальных консорциумов на основе штаммов <i>Bacillus subtilis</i>, Труды молодых ученых Алтайского Государственного Университета. Материалы V региональной молодежной конференции "Мой выбор - наука", XIV научной конференции студентов, магистрантов, аспирантов и учащихся лицейных классов, 1-28 апреля 2018, вып. 15, с. 6-8. ОРЕЛОВА Т.Н., ИРКИТОВА А.Н., ГРЕБЕНЩИКОВА А.В., Антагонистическая активность <i>Bacillus subtilis</i>, Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2018, N 5 (163), с. 141-145. MANOJ KAUSHAL, AJAY KUMAR, RAJESH KAUSHAL, <i>Bacillus pumilus</i> strain YSPMK11 as plant growth promoter and biocontrol agent against <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>, Biotech, 2017, 7:90, p. 1-9. 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВО "Алтайский государственный университет", ЦРТИПТУИС</p>	<p>(72) Автор(ы): Ирkitова Алена Николаевна (RU), Гребенщикова Ангелина Владимировна (RU)</p> <p>(73) Патентообладатель(и): Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Алтайский государственный университет" (RU)</p>		

На штамм *B. pumilus* 16 (В-13250, Пат. 2694522)

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Протоколы идентификации исследуемых штаммов с помощью Biolog's Microbial
Identification Systems

<p>Result Comment Notice</p> <p style="text-align: center;">Species ID: <i>Bacillus pumilus/safensis</i></p> <hr/> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Rank</th> <th>PROB</th> <th>SIM</th> <th>DIST</th> <th>Organism Type</th> <th>Species</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0.775</td> <td>0.569</td> <td>3.818</td> <td>GP-Rod-SB</td> <td><i>Bacillus pumilus/safensis</i></td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>0.175</td> <td>0.112</td> <td>5.247</td> <td>GP-Rod-SB</td> <td><i>Bacillus safensis/pumilus</i></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>0.026</td> <td>0.014</td> <td>7.082</td> <td>GP-Rod-SB</td> <td><i>Bacillus fortis</i></td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>0.024</td> <td>0.012</td> <td>7.175</td> <td>GP-Rod-SB</td> <td><i>Bacillus simplex/butanolivorans</i></td> </tr> </tbody> </table> <p>Key: <x: positive, x: negative, <x-: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well</p> <p>Well Color Values</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Plate</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>68</td> <td>{ 91</td> <td>71</td> <td>{ 91</td> <td>{ 92</td> <td>{ 98</td> <td>{ 94</td> <td>{ 101</td> <td>64</td> <td>< 263</td> <td>< 269</td> <td>{ 115 +</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>77</td> <td>54</td> <td>80</td> <td>{ 100</td> <td>{ 117</td> <td>{ 111</td> <td>80</td> <td>65</td> <td>68</td> <td>< 262</td> <td>< 259</td> <td>< 238</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>{ 92</td> <td>87</td> <td>{ 104</td> <td>87</td> <td>73</td> <td>69</td> <td>72</td> <td>68</td> <td>76</td> <td>< 262</td> <td>59</td> <td>40 +</td> </tr> <tr> <td>D</td> <td>65</td> <td>{ 101</td> <td>66</td> <td>63</td> <td>80</td> <td>73</td> <td>{ 95</td> <td>< 144</td> <td>60</td> <td>56</td> <td>53</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>E</td> <td>88</td> <td>51</td> <td>{ 108</td> <td>{ 103</td> <td>< 160</td> <td>< 153</td> <td>71</td> <td>83</td> <td>{ 134 -</td> <td>{ 124</td> <td>< 221</td> <td>57</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td>{ 102</td> <td>78</td> <td>78</td> <td>{ 96</td> <td>71</td> <td>{ 91</td> <td>68</td> <td>< 156</td> <td>70</td> <td>55</td> <td>{ 108</td> <td>78</td> </tr> <tr> <td>G</td> <td>59</td> <td>{ 119</td> <td>86</td> <td>{ 92</td> <td>< 197</td> <td>78</td> <td>79</td> <td>< 195</td> <td>{ 125</td> <td>< 262 -</td> <td>< 247</td> <td>< 271</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>85</td> <td>{ 128</td> <td>65</td> <td>72</td> <td>52</td> <td>86</td> <td>82</td> <td>89</td> <td>71</td> <td>< 262</td> <td>< 205</td> <td>{ 106</td> </tr> </tbody> </table>	Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species	1	0.775	0.569	3.818	GP-Rod-SB	<i>Bacillus pumilus/safensis</i>	2	0.175	0.112	5.247	GP-Rod-SB	<i>Bacillus safensis/pumilus</i>	3	0.026	0.014	7.082	GP-Rod-SB	<i>Bacillus fortis</i>	4	0.024	0.012	7.175	GP-Rod-SB	<i>Bacillus simplex/butanolivorans</i>	Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A	68	{ 91	71	{ 91	{ 92	{ 98	{ 94	{ 101	64	< 263	< 269	{ 115 +	B	77	54	80	{ 100	{ 117	{ 111	80	65	68	< 262	< 259	< 238	C	{ 92	87	{ 104	87	73	69	72	68	76	< 262	59	40 +	D	65	{ 101	66	63	80	73	{ 95	< 144	60	56	53	60	E	88	51	{ 108	{ 103	< 160	< 153	71	83	{ 134 -	{ 124	< 221	57	F	{ 102	78	78	{ 96	71	{ 91	68	< 156	70	55	{ 108	78	G	59	{ 119	86	{ 92	< 197	78	79	< 195	{ 125	< 262 -	< 247	< 271	H	85	{ 128	65	72	52	86	82	89	71	< 262	< 205	{ 106	<p>На штамм <i>B. pumilus</i> 4 (RCAM05516)</p>
Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species																																																																																																																																															
1	0.775	0.569	3.818	GP-Rod-SB	<i>Bacillus pumilus/safensis</i>																																																																																																																																															
2	0.175	0.112	5.247	GP-Rod-SB	<i>Bacillus safensis/pumilus</i>																																																																																																																																															
3	0.026	0.014	7.082	GP-Rod-SB	<i>Bacillus fortis</i>																																																																																																																																															
4	0.024	0.012	7.175	GP-Rod-SB	<i>Bacillus simplex/butanolivorans</i>																																																																																																																																															
Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																																																								
A	68	{ 91	71	{ 91	{ 92	{ 98	{ 94	{ 101	64	< 263	< 269	{ 115 +																																																																																																																																								
B	77	54	80	{ 100	{ 117	{ 111	80	65	68	< 262	< 259	< 238																																																																																																																																								
C	{ 92	87	{ 104	87	73	69	72	68	76	< 262	59	40 +																																																																																																																																								
D	65	{ 101	66	63	80	73	{ 95	< 144	60	56	53	60																																																																																																																																								
E	88	51	{ 108	{ 103	< 160	< 153	71	83	{ 134 -	{ 124	< 221	57																																																																																																																																								
F	{ 102	78	78	{ 96	71	{ 91	68	< 156	70	55	{ 108	78																																																																																																																																								
G	59	{ 119	86	{ 92	< 197	78	79	< 195	{ 125	< 262 -	< 247	< 271																																																																																																																																								
H	85	{ 128	65	72	52	86	82	89	71	< 262	< 205	{ 106																																																																																																																																								
<p>Result Comment Notice</p> <p style="text-align: center;">Species ID: <i>Bacillus pumilus/safensis</i></p> <hr/> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Rank</th> <th>PROB</th> <th>SIM</th> <th>DIST</th> <th>Organism Type</th> <th>Species</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0.894</td> <td>0.674</td> <td>4.655</td> <td>GP-Rod-SB</td> <td><i>Bacillus pumilus/safensis</i></td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>0.105</td> <td>0.292</td> <td>5.134</td> <td>GP-Rod-SB</td> <td><i>Bacillus safensis/pumilus</i></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>0.000</td> <td>0.018</td> <td>7.569</td> <td>GP-Rod-SB</td> <td><i>Bacillus simplex/butanolivorans</i></td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>0.000</td> <td>0.016</td> <td>7.626</td> <td>GP-Rod-SB</td> <td><i>Bacillus licheniformis</i></td> </tr> </tbody> </table> <p>Key: <x: positive, x: negative, <x-: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well</p> <p>Well Color Values</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Plate</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>70</td> <td>{ 95</td> <td>78</td> <td>{ 104</td> <td>{ 105</td> <td>{ 105</td> <td>{ 106</td> <td>{ 101</td> <td>71</td> <td>< 268</td> <td>< 269</td> <td>{ 126 +</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>85</td> <td>60</td> <td>87</td> <td>{ 117</td> <td>{ 130</td> <td>{ 126</td> <td>80</td> <td>67</td> <td>69</td> <td>< 253</td> <td>< 268</td> <td>< 252</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>{ 98</td> <td>{ 99</td> <td>{ 118</td> <td>{ 94</td> <td>76</td> <td>72</td> <td>78</td> <td>72</td> <td>86</td> <td>< 268</td> <td>57</td> <td>40 +</td> </tr> <tr> <td>D</td> <td>64</td> <td>{ 123</td> <td>68</td> <td>67</td> <td>{ 104</td> <td>75</td> <td>{ 96</td> <td>< 150</td> <td>60</td> <td>54</td> <td>54</td> <td>58</td> </tr> <tr> <td>E</td> <td>{ 100</td> <td>59</td> <td>< 145</td> <td>{ 112</td> <td>< 164</td> <td>< 151</td> <td>74</td> <td>87</td> <td>< 145 -</td> <td>{ 129</td> <td>< 219</td> <td>57</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td>{ 111</td> <td>83</td> <td>80</td> <td>{ 106</td> <td>72</td> <td>93</td> <td>72</td> <td>< 162</td> <td>80</td> <td>57</td> <td>{ 112</td> <td>85</td> </tr> <tr> <td>G</td> <td>61</td> <td>{ 122</td> <td>80</td> <td>{ 99</td> <td>< 198</td> <td>83</td> <td>82</td> <td>< 196</td> <td>< 139 -</td> <td>< 263 -</td> <td>< 264</td> <td>< 279</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>86</td> <td>{ 134</td> <td>69</td> <td>78</td> <td>56</td> <td>84</td> <td>81</td> <td>89</td> <td>78</td> <td>< 262</td> <td>{ 205</td> <td>{ 120</td> </tr> </tbody> </table>	Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species	1	0.894	0.674	4.655	GP-Rod-SB	<i>Bacillus pumilus/safensis</i>	2	0.105	0.292	5.134	GP-Rod-SB	<i>Bacillus safensis/pumilus</i>	3	0.000	0.018	7.569	GP-Rod-SB	<i>Bacillus simplex/butanolivorans</i>	4	0.000	0.016	7.626	GP-Rod-SB	<i>Bacillus licheniformis</i>	Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A	70	{ 95	78	{ 104	{ 105	{ 105	{ 106	{ 101	71	< 268	< 269	{ 126 +	B	85	60	87	{ 117	{ 130	{ 126	80	67	69	< 253	< 268	< 252	C	{ 98	{ 99	{ 118	{ 94	76	72	78	72	86	< 268	57	40 +	D	64	{ 123	68	67	{ 104	75	{ 96	< 150	60	54	54	58	E	{ 100	59	< 145	{ 112	< 164	< 151	74	87	< 145 -	{ 129	< 219	57	F	{ 111	83	80	{ 106	72	93	72	< 162	80	57	{ 112	85	G	61	{ 122	80	{ 99	< 198	83	82	< 196	< 139 -	< 263 -	< 264	< 279	H	86	{ 134	69	78	56	84	81	89	78	< 262	{ 205	{ 120	<p>На штамм <i>B. pumilus</i> 7 (RCAM05517)</p>
Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species																																																																																																																																															
1	0.894	0.674	4.655	GP-Rod-SB	<i>Bacillus pumilus/safensis</i>																																																																																																																																															
2	0.105	0.292	5.134	GP-Rod-SB	<i>Bacillus safensis/pumilus</i>																																																																																																																																															
3	0.000	0.018	7.569	GP-Rod-SB	<i>Bacillus simplex/butanolivorans</i>																																																																																																																																															
4	0.000	0.016	7.626	GP-Rod-SB	<i>Bacillus licheniformis</i>																																																																																																																																															
Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																																																								
A	70	{ 95	78	{ 104	{ 105	{ 105	{ 106	{ 101	71	< 268	< 269	{ 126 +																																																																																																																																								
B	85	60	87	{ 117	{ 130	{ 126	80	67	69	< 253	< 268	< 252																																																																																																																																								
C	{ 98	{ 99	{ 118	{ 94	76	72	78	72	86	< 268	57	40 +																																																																																																																																								
D	64	{ 123	68	67	{ 104	75	{ 96	< 150	60	54	54	58																																																																																																																																								
E	{ 100	59	< 145	{ 112	< 164	< 151	74	87	< 145 -	{ 129	< 219	57																																																																																																																																								
F	{ 111	83	80	{ 106	72	93	72	< 162	80	57	{ 112	85																																																																																																																																								
G	61	{ 122	80	{ 99	< 198	83	82	< 196	< 139 -	< 263 -	< 264	< 279																																																																																																																																								
H	86	{ 134	69	78	56	84	81	89	78	< 262	{ 205	{ 120																																																																																																																																								
<p>Result Comment Notice</p> <p style="text-align: center;">Species ID: <i>Bacillus pumilus/safensis</i></p> <hr/> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Rank</th> <th>PROB</th> <th>SIM</th> <th>DIST</th> <th>Organism Type</th> <th>Species</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0.954</td> <td>0.697</td> <td>4.333</td> <td>GP-Rod-SB</td> <td><i>Bacillus pumilus/safensis</i></td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>0.044</td> <td>0.238</td> <td>5.351</td> <td>GP-Rod-SB</td> <td><i>Bacillus safensis/pumilus</i></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>0.001</td> <td>0.033</td> <td>7.067</td> <td>GP-Rod-SB</td> <td><i>Bacillus fortis</i></td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>0.001</td> <td>0.032</td> <td>7.128</td> <td>GP-Rod-SB</td> <td><i>Bacillus simplex/butanolivorans</i></td> </tr> </tbody> </table> <p>Key: <x: positive, x: negative, <x-: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well</p> <p>Well Color Values</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Plate</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>63</td> <td>87</td> <td>72</td> <td>87</td> <td>48</td> <td>{ 94</td> <td>87</td> <td>87</td> <td>73</td> <td>< 260</td> <td>< 262</td> <td>{ 107</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>72</td> <td>54</td> <td>82</td> <td>{ 102</td> <td>{ 112</td> <td>{ 103</td> <td>82</td> <td>65</td> <td>66</td> <td>< 264</td> <td>< 249</td> <td>{ 188</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>80</td> <td>84</td> <td>{ 104</td> <td>87</td> <td>72</td> <td>76</td> <td>77</td> <td>71</td> <td>73</td> <td>< 254</td> <td>59</td> <td>39</td> </tr> <tr> <td>D</td> <td>60</td> <td>{ 101</td> <td>66</td> <td>62</td> <td>74</td> <td>75</td> <td>{ 96</td> <td>< 142</td> <td>61</td> <td>54</td> <td>53</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>E</td> <td>84</td> <td>52</td> <td>{ 112</td> <td>{ 101</td> <td>< 152</td> <td>< 143</td> <td>72</td> <td>84</td> <td>{ 127 -</td> <td>{ 109</td> <td>< 223</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td>{ 106</td> <td>78</td> <td>76</td> <td>{ 98</td> <td>68</td> <td>{ 91</td> <td>63</td> <td>< 151</td> <td>71</td> <td>56</td> <td>{ 112</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>G</td> <td>58</td> <td>{ 125</td> <td>80</td> <td>{ 90</td> <td>< 136</td> <td>82</td> <td>78</td> <td>< 209</td> <td>< 135 -</td> <td>< 259 -</td> <td>< 258</td> <td>< 276</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>{ 92</td> <td>{ 121</td> <td>62</td> <td>71</td> <td>52</td> <td>{ 89</td> <td>83</td> <td>{ 89</td> <td>69</td> <td>< 261</td> <td>{ 99 +</td> <td>{ 112</td> </tr> </tbody> </table>	Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species	1	0.954	0.697	4.333	GP-Rod-SB	<i>Bacillus pumilus/safensis</i>	2	0.044	0.238	5.351	GP-Rod-SB	<i>Bacillus safensis/pumilus</i>	3	0.001	0.033	7.067	GP-Rod-SB	<i>Bacillus fortis</i>	4	0.001	0.032	7.128	GP-Rod-SB	<i>Bacillus simplex/butanolivorans</i>	Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A	63	87	72	87	48	{ 94	87	87	73	< 260	< 262	{ 107	B	72	54	82	{ 102	{ 112	{ 103	82	65	66	< 264	< 249	{ 188	C	80	84	{ 104	87	72	76	77	71	73	< 254	59	39	D	60	{ 101	66	62	74	75	{ 96	< 142	61	54	53	60	E	84	52	{ 112	{ 101	< 152	< 143	72	84	{ 127 -	{ 109	< 223	60	F	{ 106	78	76	{ 98	68	{ 91	63	< 151	71	56	{ 112	80	G	58	{ 125	80	{ 90	< 136	82	78	< 209	< 135 -	< 259 -	< 258	< 276	H	{ 92	{ 121	62	71	52	{ 89	83	{ 89	69	< 261	{ 99 +	{ 112	<p>На штамм <i>B. pumilus</i> 16 (B-13250)</p>
Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species																																																																																																																																															
1	0.954	0.697	4.333	GP-Rod-SB	<i>Bacillus pumilus/safensis</i>																																																																																																																																															
2	0.044	0.238	5.351	GP-Rod-SB	<i>Bacillus safensis/pumilus</i>																																																																																																																																															
3	0.001	0.033	7.067	GP-Rod-SB	<i>Bacillus fortis</i>																																																																																																																																															
4	0.001	0.032	7.128	GP-Rod-SB	<i>Bacillus simplex/butanolivorans</i>																																																																																																																																															
Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																																																								
A	63	87	72	87	48	{ 94	87	87	73	< 260	< 262	{ 107																																																																																																																																								
B	72	54	82	{ 102	{ 112	{ 103	82	65	66	< 264	< 249	{ 188																																																																																																																																								
C	80	84	{ 104	87	72	76	77	71	73	< 254	59	39																																																																																																																																								
D	60	{ 101	66	62	74	75	{ 96	< 142	61	54	53	60																																																																																																																																								
E	84	52	{ 112	{ 101	< 152	< 143	72	84	{ 127 -	{ 109	< 223	60																																																																																																																																								
F	{ 106	78	76	{ 98	68	{ 91	63	< 151	71	56	{ 112	80																																																																																																																																								
G	58	{ 125	80	{ 90	< 136	82	78	< 209	< 135 -	< 259 -	< 258	< 276																																																																																																																																								
H	{ 92	{ 121	62	71	52	{ 89	83	{ 89	69	< 261	{ 99 +	{ 112																																																																																																																																								

КАТАЛОЖНЫЙ ЛИСТ ПРОДУКЦИИ			
Код ЦСМ	01 080	Код ОКС(КГС)	02 65.020.20
Регистрационный номер	03	007967	
Код ОКПД 2	10	20.15.80	
Код ОКП	11		
Наименование и обозначение продукции	12	Средство для защиты растений	
«Фитопумилин (Phytopumilin)» для предпосевной обработки семян			
Обозначение национального стандарта (ГОСТ, ГОСТ Р)	13		
Обозначение документа по стандартизации	14	ТУ 20.15.80-002-02067818-2022	
Наименование документа по стандартизации	15	Средство для защиты растений	
«Фитопумилин (Phytopumilin)» для предпосевной обработки семян			
Код предприятия-изготовителя по ОКПО	16	02067818	
Наименование предприятия-изготовителя	17	ФГБОУ ВО «АЛТГУ»	
Юридический адрес предприятия-изготовителя (индекс; область; город; улица; дом)	18	656049, Алтайский край, г	
Барнаул, Ленина пр-кт, дом 61			
Телефон	19	8 (3852) 291291	
Электронная почта	20		
Сайт	21		
Наименование держателя подлинника	23	ФГБОУ ВО «АЛТГУ»	
Юридический адрес держателя подлинника (индекс; область; город; улица; дом)	24	656049, Алтайский край, г Барнаул,	
Ленина пр-кт, дом 61			
Дата введения в действие документа по стандартизации	26	2022-09-23	
Форма подтверждения соответствия (добровольная, декларирование, сертификация)	27		

Каталожный лист продукции, 1 страница

30. ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОДУКЦИИ

30.1 Область применения

Средство защиты растений Фитопумилин (Phytopumilin) биологическое на основе спорообразующих бактерий рода Bacillus (B.pumilusRCAM05516; B. pumilusRCAM05517; B. pumilusB - 13250) предназначено для предпосевной обработки семян. Средство защиты растений Фитопумилин (Phytopumilin) биологическое предназначено для протравливания семенного материала культурных растений, как в промышленных условиях (поля), так и на приусадебных территориях (огороды, сады).

Средство защиты растений Фитопумилин (Phytopumilin) биологическое обладает фунгицидной активностью по отношению к следующим фитопатогенам: Alternaria, Penicillium, Aspergillus, Phytophthora. Доказана характерная устойчивая эффективность при выращивании культур подсолнечника, гречихи, рапса, овса.

30.2 Основные потребительские характеристики

№	Наименование характеристики	Ед.изм.	Значение
1	Внешний вид		Порошок, состоящий из лиофильно высушенного препарата спорообразующих бактерий. Допускается незначительное количество комочков, рассыпающихся при легком механическом воздействии.
2	Цвет		От светло-кремового до темно-бурого, в зависимости от цвета концентратов бактерий
3	Вкус и запах		Запах, характерный для лиофилизата спорных бактерий, слегка сладковатый, иногда с горчинкой
4	Массовая доля влаги	%, не более	5,0
5	Количество жизнеспособных клеток Bacillus pumilus	КОЕ/г, не менее	1×10^{11}
6	Токсичность		Не токсичный



	№	Фамилия	Подпись	Дата	Телефон
Представил	04	Бочаров	<i>[Подпись]</i>	2022-11-30	8 (3852) 291291
Заполнил	05	Бердышева	<i>[Подпись]</i>	2022-12-14	(383) 278-20-39
Зарегистрировал	06	Бердышева	<i>[Подпись]</i>	2022-12-14	(383) 278-20-39
Ввел в каталог	07	Бердышева	<i>[Подпись]</i>	2022-12-14	(383) 278-20-39

Каталожный лист продукции, 2 страница