

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ТГУ)

УДК 63

Рег. № НИОКТР

Рег. № ИКРБС

УТВЕРЖДАЮ

И.о. проректора по научной и
инновационной деятельности ТГУ
д-р физ.-мат. наук, профессор



А.Б. Ворожцов
_____ 2023 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

по теме:

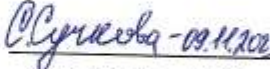
ПОДБОР КОМПОНЕНТОВ ПРЕПАРАТИВНОЙ ФОРМЫ БИОПРЕПАРАТА
ДЛЯ ЗАЩИТЫ КАРТОФЕЛЯ ОТ ФИТОПАТОГЕНОВ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АГЕНТА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ И
ДОЛГОВРЕМЕННОМ ХРАНЕНИИ
(заключительный)

выполненный по договору от 22.09.2023 г. № ДС 22092023/2/4710-23

Начальник научного управления,
канд. геол.- минерал. наук


_____ Т.С. Краснова
подпись, дата 09.11.2023

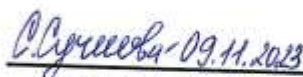
Руководитель НИР,
ст. науч. сотр., канд. с.-х. наук,
доцент


_____ С.А. Сучкова
подпись, дата 09.11.2023

Томск 2023

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР,
ст. науч. сотр.,
канд. с.-х. наук,
доцент


подпись, дата

С.А. Сучкова
(введение, раздел 1, 2,
заключение)

Исполнители:
Доцент,
канд. биол. наук,
доцент


подпись, дата

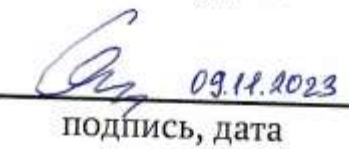
О.М. Минаева
(раздел 2)

Ст. науч. сотр.,
канд. биол. наук


подпись, дата

А.Н. Бутенкова
(раздел 1)

Науч. сотр.


подпись, дата

Д.А. Савельева
(раздел 2)

Нормоконтролер


подпись, дата

Е.Н. Соколенко

РЕФЕРАТ

Отчет 59 с., 1 кн., 13 рис., 4 табл., 53 источн.

БИОПЕСТИЦИДЫ, СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ, БАКТЕРИЗАЦИЯ, ПРЕПАРАТИВНАЯ ФОРМА, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ, АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ

Объект исследования – бактерии *Pseudomonas extremorientalis* PhS1, препаративные формы.

Цель исследования – Изучение возможности применения ряда компонентов препаративной формы для увеличения биологической активности и сохранности биологического агента.

Оценена динамика численности агента биопрепарата, наличие контаминирующей микрофлоры, антифунгальная и ростостимулирующая активность биопрепаратов с разными компонентами и препаративными формами на протяжении трех месяцев хранения.

Установлено снижение антифунгальной и увеличение ростостимулирующей активности биопрепаратов на протяжении исследуемого периода хранения. Наибольшее снижение антифунгальной активности зафиксировано в жидкой форме биопрепарата.

Отмечена наибольшая биологическая активность после периода хранения по отношению к фитопатогенам, а также наиболее стабильный ростостимулирующий эффект для препаративной формы на основе бентонитовой глины.

Рекомендовано использование раствора бентонитовых глин в концентрациях, способствующих образованию квазипластичных систем, в качестве компонента биопрепарата, способствующему лучшему проявлению положительных свойств биопрепарата на основе бактерий *Pseudomonas extremorientalis*.

Работы выполнены в полном объеме в соответствии с техническим заданием.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	8
1 Объекты и методы исследований	12
1.1 Объекты исследования	12
1.2 Методы исследования	18
1.2.1 Питательная среда	18
1.2.2 Культивирование и хранение бактерий <i>Pseudomonas extremorientalis</i>	18
1.2.3 Учет численности бактерий в биопрепаратах путем разведения с последующим высевом на плотную питательную среду (метод Коха)	18
1.2.4 Фитопатологическая экспертиза семян в рулонах фильтровальной бумаги	21
1.2.5 Приготовление препаративных форм биопрепаратов с разными компонентами	30
1.2.6 Хранение препаративных форм биопрепаратов с разными компонентами	31
1.2.7 Схема эксперимента по оценке эффективности использования компонентов препаративной формы биопрепарата для защиты картофеля от фитопатогенов для увеличения биологической активности агента при долговременном хранении	31
1.2.8 Статистический анализ результатов экспериментов	32
2 Результаты исследований	35
2.1 Оценка изменения численности агента биопрепарата бактерий <i>Pseudomonas extremorientalis</i> в препаративных формах с добавлением разных дополнительных компонентов при его хранении в условиях низких положительных температур	35
2.2 Оценка антифунгальных свойств препаративных форм биопрепаратов с разными компонентами на основе бактерий <i>Pseudomonas extremorientalis</i> при его длительном хранении	41

2.3 Оценка ростостимулирующей активности препаративных форм биопрепаратов с разными наполнителями на основе <i>Pseudomonas</i> <i>extremorientalis</i> при его длительном хранении	45
2.4 Заключение о целесообразности применения разных компонентов в составе биопрепарата на основании полученных результатов проведенного исследования	49
Заключение	51
Список использованных источников	53

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения:

ати – атмосфера избыточная

КОЕ – колонии образующая единица

ГРМ – гидролизат рыбной муки

Ж – жидкая препаративная форма

Б – препаративная форма на бентоните

ТПС – текучая паста

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

ГОСТ 12044-93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями. - М. : ИПК Издательство стандартов, 2011. - 55 с.

ГОСТ 21507-2013 Защита растений. Термины и определения. - М. : Стандартиформ, 2014. - 23 с.

ГОСТ 4530-76 Реактивы. Кальций углекислый. Технические условия. - М. : Издательство стандартов, 1992. - 12 с.

ГОСТ 6259-75 Реактивы. Глицерин. Технические условия. - М. : ИПК Издательство стандартов, 2001. - 8 с.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно прогнозам, в течение последующих 30 лет население планеты увеличится на 2 миллиарда человек, достигнув 9,7 миллиарда человек к 2050 г. [1], что приведет к повышению мирового спроса на сельскохозяйственную продукцию на 50 % [2]. Риск возникновения дефицита продовольствия напрямую связан с эффективностью проводимых защитных мероприятий по борьбе с вредителями и болезнями, снижающими урожайность и качество сельскохозяйственной продукции от 21 % до 30 % [3].

В сложившихся условиях современного аграрного производства для получения биологически полноценной продукции растениеводства и сохранения плодородия почв необходимо экологически целесообразное хозяйствование. На сегодняшний день основным методом защиты растений остается использование химических пестицидов, которые, наряду с высокой эффективностью, имеют ряд недостатков: загрязнение окружающей среды (накопление пестицидов в почве, водоемах, грунтовых водах, сельскохозяйственной продукции); возможность развития резистентности у патогенов; отрицательное влияние на здоровье человека; низкая селективность (уничтожение не только вредной, но и полезной биоты) [4].

Крупные химические концерны по производству пестицидов во всем мире меняют стратегию деятельности. Располагая значительными ресурсами и научным потенциалом, они ориентируются на освоение новых, перспективных направлений, прежде всего в области биотехнологии и генной инженерии [1]. Одним из наиболее динамично развивающихся направлений агrobiотехнологии является создание и применение биопрепаратов комплексного действия на основе микроорганизмов, улучшающих корневое питание растений, стимулирующих их рост, защищающих от болезней и вредителей [2, 3, 4, 5, 6]. В настоящее время все более активно разрабатываются биопрепараты для защиты растений, которые являются альтернативой химическим методам защиты. Биологические средства

безопасны для теплокровных организмов и окружающей среды, обладают избирательным действием на целевой организм, отсутствием или низким уровнем фитотоксичности, отсутствием резистентности к ним у вредного организма при длительном применении, способностью повышения плодородия почв, оздоровления почвенной микробиоты [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13].

Во всём мире растут объёмы производства и продаж биопрепаратов, хотя их рынок составляет всего от 1 % до 1,5 % к рынку химических пестицидов. Мировой рынок сельскохозяйственных биопрепаратов вырос с 4 млрд долл. в 2015 г. до 9 млрд. долл. в 2019 г. [14]. На Европу приходится наибольшая доля мирового сельскохозяйственного рынка биопрепаратов: 31,1 % в 2015 г. [11, 15]. Рынок биопрепаратов в ЕС расширяется за счёт растущего спроса на органические продукты питания, тренд на снижение химизации, а также высокой доходности и увеличение производительности при внедрении этих агрохимикатов [14]. В странах с развивающейся экономикой, таких как Индия, Китай и Россия имеются все возможности для роста рынка сельскохозяйственных биопрепаратов. Рынок Азиатско-Тихоокеанского региона, по оценкам, станет вторым по скорости роста, и ежегодно будет прирастать на 15 %. Здесь главную роль сыграют такие факторы, как большая численность населения и увеличение усилий государственных и частных организаций по его информированности о преимуществах органического земледелия [15].

Особое внимание уделяется изучению микробиологических процессов, протекающих в почве, в ризосфере растений, и использованию ризосферных бактерий в качестве агентов контроля различных заболеваний сельскохозяйственных культур [7, 10, 12, 14]. Таким образом, пестицидный рынок РФ уже имеет целый перечень биопрепаратов и постоянно расширяется. Штаммы бактерий *Pseudomonas* являются одними из наиболее распространенных ризобактерий, улучшающих рост и развитие растений и способствующих биоконтролю патогенов [7, 12, 16]. Данная группа микроорганизмов обладает набором свойств, способствующих ускорению

роста растений, увеличивающих урожайность сельскохозяйственных культур и защите растений от ряда грибных заболеваний посредством производства антифунгальных метаболитов или путем формирования у растений системной резистентности [7, 9, 12, 16]. Однако они не получили широкой коммерциализации из-за быстрой потери жизнеспособности агента при хранении [17], составляя лишь 6 % коммерческих продуктов биоконтроля, по сравнению со штаммами *Bacillus*, которые составляют 15 %, и видами грибов *Trichoderma*, составляющими 43 % биопрепаратов. Более широкое применение бактерий рода *Pseudomonas* в качестве действующего агента биопрепаратов для защиты растений зависит от препаративных форм и их компонентов, увеличивающие сроки хранения биопрепаратов на их основе.

Одним из главных технических требований для биопрепарата является стабильность биологической активности в течение полевого сезона, показателями которой служит титр агента и антагонистическая активность по отношению к возбудителям болезней растений [18, 19]. Особое влияние на стабильность и активность агента в результате хранения имеет вид препаративной формы. Таким образом, в состав биологических препаратов, кроме активного начала (биологического агента) входят различные компоненты (наполнители), предназначенные не только для увеличения сроков годности препарата путем поддержания микробной культуры в активном состоянии в период хранения, но и для увеличения биологической активности агента (проявления его полезных свойств). Рецепттура биопрепарата разрабатывается с учетом препаративной формы, вида штамма-продуцента, абиотических условий в период хранения и применения препарата. Для улучшения товарных качеств биопрепаратов на основе термочувствительных клеток на сегодняшний день доступными и эффективными компонентами биопрепаратов могут выступать природные глины, торф, алюмосиликаты и другие компоненты [20, 21].

Основная цель исследований, проводимых в рамках данного Госконтракта: изучение возможности применения ряда компонентов

препаративной формы для увеличения биологической активности и сохранности биологического агента.

В задачи исследования входило:

1. Стабилизировать препаративные формы агента биопрепарата на основе бактерий рода *Pseudomonas*.
2. В лабораторных условиях провести оценку изменения численности агента в разных препаративных формах в процессе хранения.
3. Изучить динамику изменения биологической активности биопрепарата в разных препаративных формах в процессе хранения в лабораторных условиях.
4. Провести статистический анализ полученных данных.
5. Сделать заключение о целесообразности применения разных компонентов в составе биопрепарата на основании полученных результатов проведенного исследования.

1 Объекты и методы исследований

1.1 Объекты исследования

- Бактерии *Pseudomonas extremorientalis* PhS1

Класс: Eubacteriaceae

Порядок: Eubacteriales

Семейство: Pseudomonaceae

Род: *Pseudomonas*

Вид: *Pseudomonas extremorientalis*

Штамм *Pseudomonas extremorientalis* PhS1

Бактерии изолированы из копролитов дождевых червей (*Eisenia fetida*) после одного месяца их культивирования на торфо-навозном субстрате в соотношении 1:2 соответственно, путем прямого посева на МПА. Штамм отобран в предварительном скрининге на наличие фунгистатической и ростостимулирующей активностей в лабораторных тестах [21, 22].

Бактерии *Pseudomonas extremorientalis* – прямые, грамотрицательные палочки диаметром от 0,5 до 1,0 и длиной от 3,5 до 5,0 мкм. Спор и выростов не образуют, подвижны, имеют полярно расположенные жгутики. Хорошо развиваются на органических и синтетических средах. Колонии бесцветные, слегка выпуклые (на конус), гладкие, блестящие, полупрозрачные. При росте на плотных средах образуют небольшие колонии с ровными краями [23]. Биосинтетические процессы псевдомонады осуществляют за счет обмена по окислительному типу. Источником азота для различных видов рода *Pseudomonas* являются молекулярный азот, аммонийные соли, нитраты, амины, амиды, аминокислоты и белки питательных сред. Широко распространены в природе, могут усваивать природные газы, соединения растительного происхождения, высокомолекулярные спирты, кислоты, фенолы, терпены [24, 25].

Псевдомонады, синтезирующие желто-зелёный флуоресцирующий пигмент, широко распространены в природе, легко выделяются на

стандартных средах. Температурные границы для большинства видов рода *Pseudomonas* широки (от плюс 4 °С до плюс 43 °С). Многие виды – мезофиллы и развиваются при температуре от плюс 26 °С до плюс 30 °С, но встречаются также термофильные и психрофильные штаммы. Оптимальная температура роста около плюс 25 °С. Не обладая особенностью образовывать покоящиеся формы типа эндоспор, цист, псевдомонады выдерживают длительное обезвоживание без потери жизнеспособности и могут находиться в состоянии анабиоза более года [26].

Видовое определение исследуемого штамма сделано на основании морфологических и физиолого-биохимических признаков, а также анализом нуклеотидных последовательностей 16S рРНК в ВКПМ.

- Препаративные формы биопрепарата

В эксперименте были использованы следующие препаративные формы:

- жидкая;
- с использованием бентонита в качестве носителя;
- паста.

В качестве жидкой препаративной формы использована культура бактерий *Pseudomonas extremorientalis* PhS1, полученная методом аэробного глубинного периодического культивирования. Титр микробной культуры составлял от 3×10^{11} до 5×10^{11} клеток/мл.

Препаративную форму с бентонитовыми глинами в качестве носителя получали путем разбавления (1:1) предварительно простерилизованного мелкодисперсного раствора бентонитовых глин (2 %) с жидкой формой препарата (численность уменьшена в 2 раза и составляет от $1,5 \times 10^{11}$ до $2,5 \times 10^{11}$ клеток/мл).

Для получения пасты жидкую культуру бактерий (титр от 3×10^{11} до 5×10^{11} клеток/мл) центрифугировали (Awel MF 48-R, Франция) в стерильных центрифужных пробирках при 5 000 оборотах/мин в течение 15 мин.

После стабилизации полученных препаративных форм, их закладывали на хранение в стерильных флаконах на 90 суток при температуре от плюс 4 °С до плюс 6 °С.

- Компоненты биопрепарата, использованные для увеличения их стабильности при хранении и применении:

1. Бентонит

В качестве основы одной из препаративных форм биопрепарата использован бентонит марки ПБМБ (ООО «Бентонит Хакасии») – мелкодисперсный порошок светло-серого цвета. Бентонит – природный глинистый минерал, гидроалюмосиликат, обладает свойством разбухать при гидратации (от 14 до 16 раз). В ограниченном пространстве при свободном разбухании в присутствии воды образуется плотный гель, препятствующий дальнейшему проникновению влаги. Природные залегающие бентониты имеют рН от 6 до 9,5 (для 5 % водной суспензии после её отстаивания в течение 1 ч) и содержат менее 2 % карбоната натрия; общее содержание взаимозаменяемых натрия и кальция не превышает 80 мэкв / 100 г.

Химический состав (основных элементов), мг / 100 г: фосфор – 31, калий – 2000, натрий – 1710, кальций – 5500, магний – 1670, железо – 3880, марганец – 27, кобальт – 1,5, медь – 2,1, цинк – 6,9, молибден – 0,074, хром – 7,6.

Известно, что применение бентонитовой глины значительно усиливает микробиологическую активность почвы, способствует устойчивому повышению водоудерживающей способности почвы, увеличению обеспеченности почвы доступными для растений формами элементов питания, усилению роста и увеличению вегетативной массы растений [27].

2. Глицерин

Для стабилизации препаративной формы в виде пасты добавляли химически чистый дистиллированный глицерин по ГОСТ 6259-75.

Глицерин (химическая формула $C_3H_8O_3$), или глицерол, представляет собой органическое соединение из группы спиртов [28]. По консистенции это

сиропообразное вещество, прозрачное, жирное на ощупь и имеет сладковатый вкус. Хорошо соединяется с водой и растворяет жиры. Глицерин создается как побочный продукт в процессе производства мыла, также его можно получить синтетическим путем. Температура плавления: плюс 17,9 °С. Температура кипения: плюс 290 °С. Растворимость в воде: более 500 г/л.

Глицерин используется в глюконеогенезе (процессе образования глюкозы в печени). Под действием ферментов печени глицерин последовательно превращается в глицеральдегид-3-фосфат, дигидроксиацетонфосфат, глицеральдегидтрифосфат, который далее участвует в цепи гликолиза.

Глицерин синтезируется дрожжами, при этом его количество зависит от условий их культивирования [29]. В небольших количествах глицерин образуется при ферментации виноматериалов и придаёт им сладковатый оттенок. Наибольшая концентрация глицерина, около 10 г/л, присутствует в сладких винах, в частности, ботритизированных.

Глицерин относится к группе стабилизаторов, обладающих свойствами сохранять и увеличивать степень вязкости и консистенции продуктов [30]. Зарегистрирован как пищевая добавка E422, и используется в качестве эмульгатора, при помощи которого смешиваются различные несмешиваемые смеси. Глицерин является компонентом многих пищевых продуктов, кремов и косметических средств. В косметической промышленности глицерин применяется как влагоудерживающий, смягчающий и увлажняющий компонент; может выступать в роли растворителя, регулятора вязкости и эмульгатора.

3. Карбонат кальция

Для стабилизации препаративной формы в виде пасты вносили химически чистый кальций углекислый по ГОСТ 4530-76. Карбонат кальция (CaCO_3) – неорганическое химическое соединение, соль угольной кислоты и кальция, нерастворим в воде и этаноле [31].

В природе встречается в виде многочисленных минералов, например, кальцита, арагонита и ватерита, является главной составной частью известняка, мрамора, мела, входит в состав скорлупы яиц птиц и пресмыкающихся, а также в состав раковин моллюсков и некоторых других беспозвоночных.

Карбонат кальция зарегистрирован как белый пищевой краситель (E170). Применяется при производстве предметов гигиены, в медицине. В пищевой промышленности часто используется в качестве препарата, препятствующего слеживанию, и для предотвращения слипания в комки сухих молочных продуктах.

- Тест-объект

В качестве тест-объекта по оценке биологической активности биопрепаратов с разными компонентами использованы семена пшеницы сорта Ирень с сопутствующей фитопатогенной микрофлорой.

Мягкая яровая пшеница сорта Ирень

Домен: Eukaryota

Царство: Plantae

Отдел: Angiosperms

Класс: Monocotyledones

Порядок: Poales

Семейство: Poaceae

Род: *Triticum*

Вид: *Triticum aestivum* L., 1753

Пшеница мягкая яровая (*Triticum aestivum* L.) сорта Ирень согласно данным Государственного реестра селекционных достижений [32] получена методом индивидуального отбора из скрещивания Иргина × Красноуфимская 90. Сорт включен в Госреестр по Волго-Вятскому и Западно-Сибирскому регионам. Разновидность мильтурум. Куст прямостоячий. Соломина полая, с сильным восковым налетом на верхнем междоузлии. Флаговый лист имеет сильный восковой налет на листовой пластинке и очень сильную

антоциановую окраску ушек. Колос пирамидальный, рыхлый, со средним восковым налетом. На верхушке колоса короткие остевидные отростки. Плечо нижней колосковой чешуи среднее, прямое, зубец очень короткий, прямой. Зерно удлиненное, со средним хохолком, окрашенное. Масса 1000 зерен в среднем составляет от 35 до 42 г. Средняя урожайность в Волго-Вятском и Западно-Сибирском регионах находится на уровне среднего стандарта соответственно 38,4 и 23,6 ц/га. Сорт устойчив к полеганию. Хлебопекарные качества хорошие. Пшеницы данного сорта среднеустойчива к мучнистой росе, восприимчива к септориозу, корневым гнилям, стеблевой ржавчине, сильновосприимчива к пыльной и твердой головне, бурой ржавчине. В технологии возделывания требуются протравливание семян, фунгицидные обработки в период вегетации.

Яровая пшеница требовательна к почвенной влаге; критическими периодами по отношению к влаге являются выход в трубку – колошение. Растения требовательны к гранулометрическому составу и плодородию почв из-за пониженной усвояющей способности корневой системы. Лучшими считаются структурные черноземные, каштановые и дерново-подзолистые почвы. На формирование 1 т зерна и соответствующего количества побочной продукции яровая пшеница выносит из почвы, кг: N_2 – от 35 до 45 кг, P_2O_5 – от 9 до 12 кг, K_2O – от 18 до 24 кг. Потребляет азот в течение всего вегетационного периода: по сравнению с начальными этапами развития растений потребление резко увеличивается ко времени выхода в трубку и колошения, а затем снижается и продолжается до молочной спелости семян. На урожайность яровой пшеницы хорошо влияют органические удобрения, особенно на почвах с низким содержанием гумуса [33]. Одним из значимых резервов повышения урожайности и качества зерна яровой пшеницы в Сибири является фитосанитарная оптимизация технологии ее возделывания по комплексу вредных для культуры организмов, число которых достигает более 150 видов, особенно вредоносных – около 50 [34].

1.2 Методы исследования

1.2.1 Питательная среда

Для культивирования бактерий-агентов биопрепаратов разных препаративных форм использована общеупотребительная натуральная питательная среда приготовленная из стандартного ГРМ-бульона следующего состава (г/л): гидролизат рыбной муки (ГРМ) – 8; пептон ферментативный – 8; натрия хлорид – 4. По необходимости в среду добавляли агар-агар в количестве 2 % от объема среды. Среду стерилизовали при 1 атм (плюс 121 °С) в течение 15 мин согласно прописи на этикетке.

1.2.2 Культивирование и хранение бактерий *Pseudomonas extremorientalis*

Жидкую культуру бактерий *P. extremorientalis* получали методом аэробного глубинного периодического культивирования. Культивирование бактерий проводили в колбах Эрленмейера емкостью 500 мл с 250 мл среды. В качестве посевного материала использовали трехсуточную культуру бактерий, полученную на той же питательной среде с титром не менее 1×10^9 КОЕ/мл, который вносили в количестве до 10 % от рабочего объема. Штамм-продуцент биопрепарата хранили в музейной культуре на скошенной питательной среде типа МПА указанного состава в пробирках при температуре от плюс 4 °С до 5 °С.

1.2.3 Учет численности бактерий в биопрепаратах путем разведения с последующим высевом на плотную питательную среду (метод Коха)

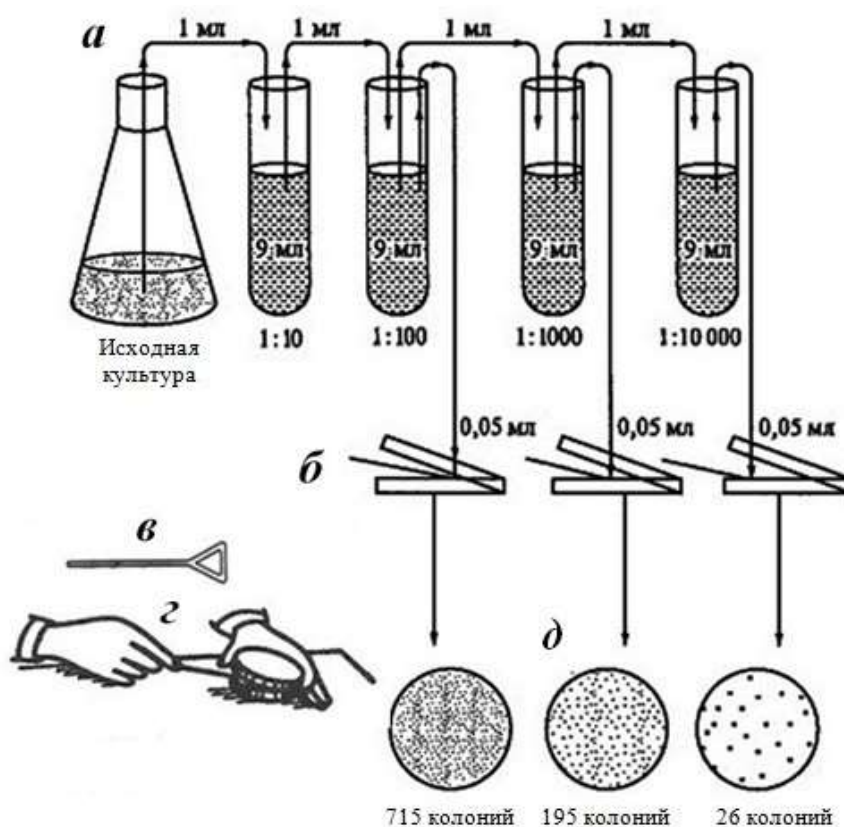
Для определения количества жизнеспособных микроорганизмов в препаратах при их приготовлении и на протяжении периода их хранения использовали чашечный метод Коха, с помощью которого учитывалась не только численность агента биопрепарата, но и морфологическое разнообразие колоний. Учет отличных по культуральным признакам организмов от бактерий, являющихся основой биопрепарата, позволил сделать вывод о наличии или отсутствии контаминации и дать заключение о сохранности агента и качестве биопрепаратов на протяжении длительного хранения.

Учет численности бактерий проводили стандартным методом разведения и высева на плотные питательные среды в чашках Петри [35, 36]. Данный метод широко применяют для определения численности жизнеспособных клеток в различных естественных субстратах и в лабораторных культурах. В его основе лежит принцип Коха, согласно которому: каждая колония представляет собой потомство одной клетки, находящейся в исходном субстрате. Это позволяет, на основании числа колоний, выросших после посева на плотную питательную среду определенного объема исследуемой суспензии, судить об исходном содержании в ней клеток микроорганизмов. Результаты количественного определения микроорганизмов, проведенного по методу Коха, часто выражают не в числе клеток, а в условных, так называемых колониобразующих единицах (КОЕ).

При поверхностном посеве простерилизованную при соответствующем режиме автоклавирования (плюс 121 °С в течение 15 мин) питательную среду разливали в стерильные чашки Петри и оставляли застывать на ровной горизонтальной поверхности микробиологического бокса (БАВнп-01-«Ламинар-С.» (LORICA), Россия). Поверхность питательной среды подсушивалась для формирования отдельных, изолированных друг от друга, колоний микроорганизмов, не расплывающихся и не сливающихся в один сплошной «газон».

Для получения изолированных колоний готовили ряд последовательных разведений в стерильном физиологическом растворе (0,85 % NaCl) для уменьшения осмотического стресса бактериальных клеток. Для получения исходного разведения образца 1 мл исследуемой суспензии помещали в пробирку с 9 мл стерильного раствора для разведений, получая разведение $1:1^{-1}$, или первое. Так как численность микроорганизмов в суспензии может колебаться в диапазоне от сотен до нескольких десятков миллиардов клеток в 1 мл, существует потребность в дополнительном разбавлении исходного разведения и приготовлении серии рабочих

разведений, из которых и проведен микробиологический посев (рисунок 1). Разведения готовили используя постоянный коэффициент разведения (10) в ряде стерильных пробирок, содержащих по 9 мл стерильной воды. После приготовления первого разведения 1 мл суспензии из первой пробирки переносили во вторую с 9 мл стерильной воды ($1:10^{-2}$), то есть второе. Таким образом, получали всю серию необходимых разведений исследуемой культуры. Содержимое пробирок перед перенесением предварительно перемешивали с помощью пипетки. Каждое новое разведение готовили новой стерильной пипеткой. Всего для каждой точки и каждого варианта сделаны линейки из от 10 до 12 разведений и, соответственно, посевы из каждого разведения на три чашки Петри с питательной средой.



- а – приготовление серии рабочих разведений;
- б – высев суспензии на поверхность твердой питательной среды;
- в – шпатель Дригальского; г – техника рассева;
- д – рост микроорганизмов после рассева на различных разведениях

Рисунок 1 – Схема микробиологического посева) [35]

Тщательно перемешав суспензию в пробирке, стерильной пипеткой последовательно забирали точно измеренный объем (100 мкл) соответствующего разведения и раскапывали на поверхность предварительно разлитой и подсушенной в чашки Петри агаризованной питательной среды. Стерильным стеклянным шпателем Дригальского каплю равномерно быстро и тщательно распределяли по поверхности среды, постепенно втирая ее в агаровую пластинку (рисунок 1).

Инкубирование чашек Петри с посевами проводили в термостате при температуре плюс $28,0 \pm 0,5$ °C (ТСО-1/80 СПУ, Россия). Подсчет бактерий проводили через трое суток. Результаты учета количества колоний параллельных высевок суммировали, вычисляли среднее число колоний на одну чашку Петри, выросших при высеве из этого разведения.

1.2.4 Фитопатологическая экспертиза семян в рулонах фильтровальной бумаги

Для проведения фитопатологической экспертизы семян пшеницы использовали биологический метод (проращивание семян с использованием фильтровальной бумаги или метод проращивания в рулонах). Для проведения экспертизы подготавливали в соответствии с ГОСТ 12044-93 [38] ленты из фильтровальной бумаги размером 10×100 см (± 2 см), ленты из кальки 3×100 см (± 2 см). Материал стерилизовали в сушильном шкафу (ШС-80-01 СПУ, Россия) при плюс 160 °C не менее 120 мин. Пинцеты, препаровальные иглы стерилизовали над пламенем спиртовой горелки в процессе работы. Дополнительные предметы (лабораторный стол, полиэтиленовые пакеты, руки) дезинфицировали этиловым спиртом (70 %).

Семена раскладывали на двухслойную полоску мокрой фильтровальной бумаги с помощью пинцета в одну линию с интервалом от 1 до 2 см на расстоянии от 2 до 3 см от верхнего и боковых краев бумаги зародышами вниз (рисунок 2). Разложенные семена накрывали мокрой полоской кальки (шириной 3 см) и аккуратно сворачивали в рулон без уплотнения. Рулоны вертикально помещали в стерильный полиэтиленовый

пакет, для предотвращения высыхания и внешней контаминации, и инкубировали в термостате при температуре плюс $24,0 \pm 0,5$ °C [38].



Рисунок 2 – Раскладывание семян пшеницы на поверхность фильтровальной бумаги [40]

Просмотр рулонов проводили через 7 суток. Для чего рулон аккуратно вынимали из пакета и выкладывали на чистый лабораторный стол, разворачивали с использованием пинцетов и препаровальных игл. После разворачивания рулонов удаляли верхний слой бумаги (кальку), покрывающей семена, учитывали количество нормально проросших семян и семян с признаками заболевания (рисунок 3). Видовой состав заболеваний определяли по ГОСТ 12044-93 [38, 39]. Для контроля правильности идентификации патогенов также применяют микроскопирование с увеличением от 20 до 40 раз (ЛОМО, МСП-2, Россия).



Рисунок 3 – Внешний вид проростков растений ячменя на момент проведения анализа [41]

Признаки поражения тем или иным фитопатогеном отмечали в порядке убывания его вредоносности, таким образом, чтобы общий процент семян с признаками заболевания не превышал 100. Например, если при проведении фитоэкспертизы на одном и том же семени отмечается наличие конидиеносцев и конидий возбудителей гельминтоспориоза и пенициллеза, то отмечают наличие гельминтоспориоза, как более вредоносного заболевания. Результаты фитоэкспертизы заносили в таблицу [37].

Одновременно с фитоэкспертизой семян (оценка фунгистатической активности бактерий), проводили анализ длины проростков и количества корней для оценки ростостимулирующего влияния бактерий в разных препаративных форм.

Признаки фузариоза (*Fusarium* sp.):

На поверхности пораженного семени развивается тонкий, нежный, пушистый, быстро разрастающийся мицелий снежно-белого или ярко-малинового цвета. Нередко семена и бумага окрашиваются в розовый или малиновый цвет с дальнейшим проявлением коростинков из спороношения гриба. Грибы могут образовывать микро- и макроконидии. Микроконидии одноклеточные, редко с 1 или 2 перегородками, овальные, яйцевидные.

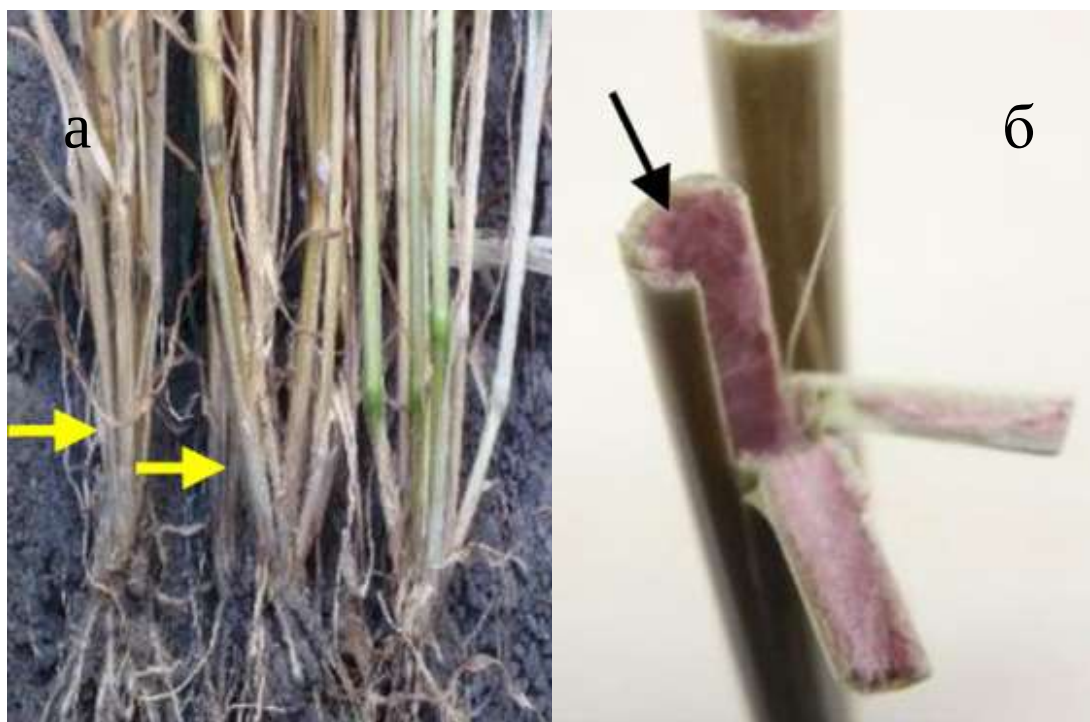
Макроконидии с от 3 до 9 перегородками, разной формы, изогнутости и размеров (рисунки 4, 5, 6).



Рисунок 4 – *Fusarium oxysporum* Schlecht. Хламидоспоры и конидиеносцы с микро- и макроконидиями [42]



Рисунок 5 – *Fusarium pseudograminearum* O'Donnell & Aoki. Внешний вид мицелия, макроконидии и поражения растений [43]



а – побурение стеблей зараженных растений (слева) в сравнении с незараженным растением (справа);
б – межузловые срезы стеблей зараженных растений пшеницы, демонстрирующие розоватый рост мицелия (стрелка)

Рисунок 6 – *Fusarium pseudograminearum* O'Donnell & Aoki. Симптомы фузариозной кроновой гнили пшеницы [44]

Признаки гельминтоспориоза (*Bipolaris sorokiniana* Shoem = *Helminthosporium sativum* Pamm.):

Зараженные семена характеризуются бурой пигментацией различных оттенков, до коричневого цвета. Семена покрываются густым черным налетом, состоящим из спороншения гриба. Конидиеносцы одиночные или в пучках от 2 до 3, бурые, длиной от 110 до 150 мкм и шириной от 6 до 8 мкм, обычно с 5 или 6 перегородками. Конидии веретенообразные, слегка изогнутые, темно-оливковые с от 3 до 10 перегородками, на концах закругленные, длиной от 60 до 120 мкм и шириной от 15 до 20 мкм (рисунки 7 и 8).

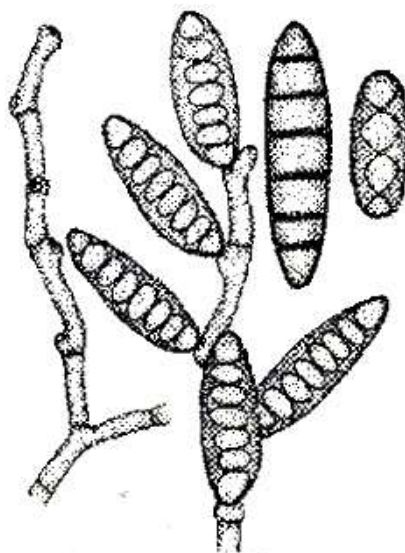


Рисунок 7 – *Bipolaris* sp. Конидиеносец с конидиями [45]



Рисунок 8 – *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker. Внешний вид мицелия, конидий и поражения растений [43]

Признаки альтернариоза (*Alternaria* sp.):

На семенах образуется паутинистый мицелий, темно-серого цвета. Часто на зародышевой части развивается темно-оливковый налет, состоящий из конидиеносцев и конидий. Конидии оливковые или черно-бурые, обратно булабовидные, в цепочках, с от 3 до 6 поперечными перегородками и с одной или несколькими продольными перегородками, длиной от 30 до 50 мкм и шириной от 14 до 18 мкм, неодинаковой формы, чаще цилиндрические или овальные (рисунки 9 и 10).

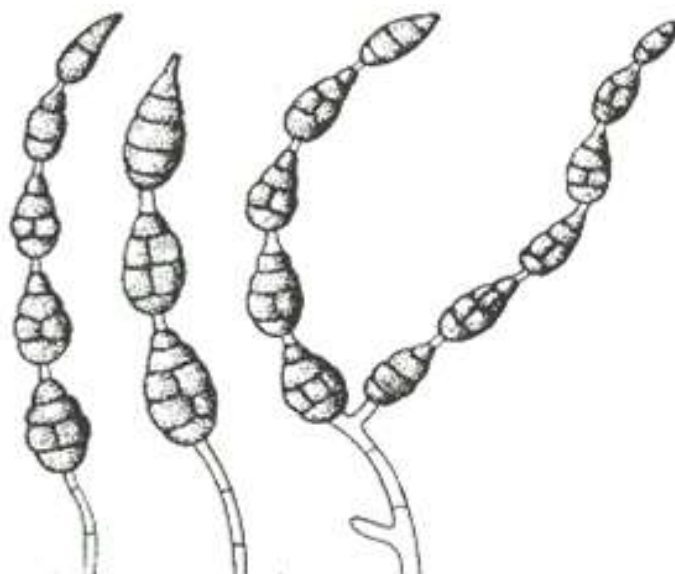


Рисунок 9 – *Alternaria* sp. Конидиеносец с конидиями [45]

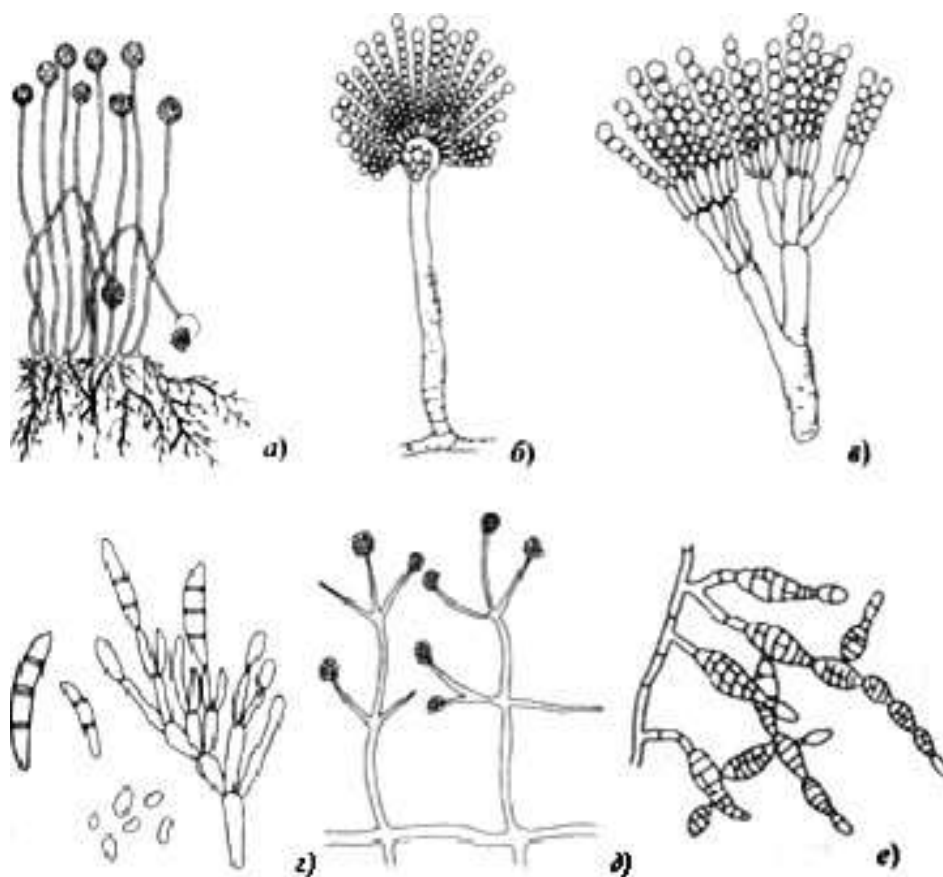


Рисунок 10 – *Alternaria tricina*. Внешний вид конидий и поражения растений [46]

Признаки плесневения семян (*Aspergillus* Link spp., *Penicillium* Link. spp., *Trichothecium roseum* Fr., *Mucor mucedo* Fres, *Rhizopus nigricans* Ehr. и др.):

Сапрофитные плесневые грибы (рисунок 11) составляют поверхностную микрофлору семян. Зерно может поражаться в период созревания урожая при повышенной влажности и низких температурах, а также при нарушении режимов хранения. *A. fumigatus* образует светлоокрашенный или буреющий мицелий. Стеригмы однорядные, расположены в верхней части грушевидного пузыря. Конидиеносцы (300 × от 2 до 8 мкм) с пузыревидным вздутием на вершине, от 20 до 30 мкм в диаметре. Конидии одноклеточные, эллипсоидальные или шаровидные,

гладкие или шиповатые, от 2,5 до 3 мкм. *A. glaucum* образует рыхлый, желто-зеленый мицелий; конидиеносцы неветвящиеся, вздутые на вершине и несут стеригмы, расходящиеся радиально и отшнуровывающиеся на концах в виде цепочки. Конидии шаровидные, щетинистые, зеленые, диаметром от 7 до 15 мкм. *P. cyclopium* образует мицелий от светло-голубых, зеленых до темных тонов. Конидиеносцы одиночные, от 200 до 400 мкм × от 3 до 3,5 мкм, шероховатые, иногда более или менее гладкие, с одной или большим количеством веточек. Стеригмы от 7 до 10 мкм × от 2,2 до 2,8 мкм по от 4 до 8 в пучке, с усеченной верхушкой. Конидии шаровидные от 3,3 до 4 мкм в диаметре или эллиптические от 3,3 до 4 мкм × 2,5 мкм. *P. glaucum* образует зелено-сизый мицелий; конидиеносцы с кистевидными разветвленными верхушечными ветвями, несущие цепочки мелких округлых, бесцветных спор диаметром от 2 до 4 мкм. *T. roseum* образует густой войлочный налет; конидиеносцы неразветвленные, несущие на конце головки грушевидные двуклеточные споры размером от 12 до 18 мкм × от 8 до 10 мкм. *M. mucedo* образует темно-красный налет с черными точками (спорангиями), спорангиеносцы коричневые, собраны в пучки (от 3 до 5) высотой до 4 мм. Спорангии шаровидные, диаметром от 100 до 200 мкм, споры одноклеточные, округлые или эллиптические, размером от 8 до 14 мкм × от 6 до 11 мкм, с серой складчатой оболочкой.



а – *Mucor*; б – *Aspergillus*; в – *Penicillium*;
 г – *Fusarium* (конидиеносец с макро- и микроконидиями);
 д – *Trichoderma* (конидиеносцы с головками конидий);
 е – *Alternaria* (конидиеносцы с цепочками конидий)

Рисунок 11 – Микроскопические грибы [47]

Признаки бактериоза (*Pseudomonas syringae* VanHall, *P. ramonicum* Schn. et Iluchina, *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson и др.):

Бактериоз – это болезнь семян, вызываемая различными бактериями. На проростках, пораженных бактериозом, образуются буроватые пятна, ткани ослизняются, буреют и загнивают. На непроросших семенах образуется слизь различных оттенков, возникает гниение и размягчение семян. При сильной степени заражения семена загнивают, ослизняются и издают неприятный запах.

1.2.5 Приготовление препаративных форм биопрепаратов с разными компонентами

В эксперименте приготовлены и изучены следующие препаративные формы:

- жидкая;
- с использованием бентонита в качестве носителя;
- текучая паста (ТПС) с добавлением глицерина и карбоната кальция.

В качестве жидкой препаративной формы использована культура бактерий *P. extremorientalis*, полученная методом аэробного глубинного периодического культивирования. Препаративную форму с бентонитовыми глинами в качестве носителя получали путем разбавления предварительно простерилизованного мелкодисперсного раствора бентонитовых глин (2 %) пополам с жидкой формой препарата (численность уменьшена в 2 раза).

Текучую пасту получали путем многократного центрифугирования жидкой бактериальной культуры при $g=7000$ (9500 оборотов / мин). Во время осаждения добавляли предварительно простерилизованный мел (CaCO_3), разбавляя с бактериальной массой в соотношении 1:1 по массе. После чего надосадочную жидкость сливали, а осадок разбавляли пополам с супернатантом для увеличения текучести. Решение об увеличении текучести пасты принято после экспериментально установленного факта об уменьшении выживаемости клеток псевдомонад при высушивании. Для уменьшения испарения жидкости с поверхности пасты и увеличения сохранности бактерий вносили химически чистый глицерин (99,8 %), который служил и в качестве запасного питательного субстрата для агента биопрепарата из расчета 0,3 мл/г бактериально-меловой массы.

Таким образом, созданные препаративные формы с разными наполнителями способствовали стабилизации агента биопрепарата на основе бактерий рода *Pseudomonas* в разных препаративных формах на протяжении хранения при низких положительных температурах.

1.2.6 Хранение препаративных форм биопрепаратов с разными компонентами

Хранение биопрепаратов в жидкой препаративной форме, на бентоните и в форме пасты с разными компонентами проведено в предварительно простерилизованных пластиковых центрифужных пробирках объемом 50 мл при низких положительных температурах (от плюс 4 °С до плюс 5 °С) в холодильнике.

Жидкая форма биопрепарата и форма на бентоните хранилась в количестве 30 мл, пасты в количестве 15 мл.

1.2.7 Схема эксперимента по оценке эффективности использования компонентов препаративной формы биопрепарата для защиты картофеля от фитопатогенов для увеличения биологической активности агента при долговременном хранении

Для оценки эффективности использования разных компонентов препаративной формы биопрепарата для защиты картофеля от фитопатогенов для увеличения биологической активности агента при долговременном хранении в разных препаративных формах поставлен ряд экспериментов, в ходе которого выращивали жидкую культуру бактерий *P. extremorientalis* методом аэробного глубинного периодического культивирования в необходимом объеме (8 л). В данной культуре подсчитан титр бактерий (начальная точка) и наличие контаминантов стандартным методом Коха на средах типа МПА. Также проведена оценка биологической активности бактерий путем фитопатологической экспертизы семян пшеницы в рулонах фильтровальной бумаги: антифунгальная активность оценивалась по изменению пораженности семян пшеницы возбудителями семенных инфекций после бактеризации по отношению к пораженности контрольных семян; ростостимулирующая активность по изменению длины проростка, количества корней, всхожести семян.

Бактеризацию проводили путем замачивания в суспензиях бактерий, приготовленных из расчета 1×10^6 клеток/мл на 20 мин. Контролем служили семена, замоченные на то же время в том же объеме физраствора.

После оценки численности и биологической активности жидкую культуру бактерий использовали для приготовления разных препаративных форм с разными компонентами: жидкой (исходной), формы с бентонитом в качестве носителя и текучей пасты. Бактериальные препараты закладывали на хранение при низких положительных температурах (от плюс 4 °С до плюс 5 °С) в холодильник в пяти повторностях для каждой препаративной формы.

Через 30, 60 и 90 суток в хранящихся препаратах указанными выше методами оценивали титр, наличие и количество контаминантов и биологическую активность препаратов.

1.2.8 Статистический анализ результатов экспериментов

Определение титра микроорганизмов в культуре проводили по формуле 1 [48]:

$$C = \frac{\bar{N}}{v} \times 10^n, \quad (1)$$

где C – концентрация КОЕ в 1 г почвы;

$\bar{N}$ – среднее число микроорганизмов или колоний,

v – объем капли для посева (мл),

n – разведение, из которого проводится учет.

В случае оценки титра микроорганизмов по результатам микробиологического посева из двух и более разведений, концентрацию исходной культуры рассчитывали по результатам среднего взвешенного количества микроорганизмов ($\bar{N}$) по формуле 2 [48]:

$$\bar{N} = \frac{\bar{N}_1 + \bar{N}_2 + \bar{N}_{m-1} + \bar{N}_m}{K_m \left(\frac{1}{K_1} + \frac{1}{K_2} + \frac{1}{K_{m-1}} + \frac{1}{K_m} \right)}, \quad (2)$$

где $\bar{N}$ – среднее взвешенное количество микроорганизмов;

$\bar{N}_1, \bar{N}_2, \bar{N}_{m-1}, \bar{N}_m$ – средние количества микроорганизмов в серии высевок 1-го, 2-го (m-1)-го и m-го разведений культуры, пронумерованных в порядке возрастания кратности разведения суспензии;

K_1, K_2, K_{m-1}, K_m – величины соответствующих кратностей разведения суспензии.

Таким образом, в данном случае при конечном расчете концентрации в исходной культуре формула 1 примет вид (формула 3) [48]:

$$C = \frac{K_m}{V} \times \bar{N}, \quad (3)$$

где K_m – кратность максимального использованного для расчетов разведения из серии высевок микробных суспензий;

V – объем единичной посевной дозы в мл;

$\bar{N}$ – среднее взвешенное количество микроорганизмов.

При оценке доверительного интервала для уровня значимости 95 % средней арифметической численности бактерий из ряда параллельных посевов одной кратности разбавления использовалась формула 4 [48]:

$$I_{95} = 2\sqrt{\frac{\bar{N}}{n}} = \frac{2\sqrt{T}}{n}, \quad (4)$$

где n – число определений;

T – общее число колоний;

$\bar{N}$ – среднее число колоний.

Для проверки существенности различий двух концентраций для уровня вероятности 95 % в разные сроки учёта использовался критерий, выраженный неравенством (формула 5) [48]:

$$|C_a - C_b| > 2\sqrt{\frac{C_a^2}{T_a} + \frac{C_b^2}{T_b}}, \quad (5)$$

где $|C_a - C_b|$ – абсолютная величина разности концентраций микроорганизмов в сравниваемых культурах;

T_a и T_b – общие количества микроорганизмов, подсчитанных в камере при определении соответствующей культуры.

Полученные в ходе эксперимента данные о всхожести и пораженности семян возбудителями семенных инфекций представлены в виде средней арифметической величины с доверительным интервалом ($p < 0,05$) с учетом t-критерия Стьюдента для вероятностей от 25 % до 75 % включительно и с учетом углового распределения Фишера (критерия Фишера) для других значений вероятностей. Оценку значимости различий проводили путем сравнения выборочных долей с учетом критерия Стьюдента для вероятностей от 25 % до 75 % соответственно и критерия Фишера для других значений вероятности [49].

Данные о длине проростков и количестве корней пшеницы в работе представлены в виде среднеарифметической величины с доверительным интервалом ($p < 0,05$) с учетом t-критерия Стьюдента. Сравнение значимости различий для данных величин проводили с учетом t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$). Данные, полученные в ходе эксперимента, обрабатывали с помощью пакета прикладных программ StatSoft STATISTICA 10.0.

2 Результаты исследований

2.1 Оценка изменения численности агента биопрепарата бактерий *Pseudomonas extremorientalis* в препаративных формах с добавлением разных дополнительных компонентов при его хранении в условиях низких положительных температур

Препаративная форма тесно связана с технологией применения биопрепаратов и со сроком хранения. От того, насколько она будет способствовать проявлению потенциала штамма-продуцента, зависит и эффективность применения биопрепарата. Отличие между химическим и микробным пестицидом состоит в том, что препаративная форма должна обеспечивать оптимальные условия для проявления подавляющего действия «живого организма» и защищать его от вредных воздействий внешней среды.

Для создания оптимальной препаративной формы микробиологических пестицидов необходимо: обеспечить стабильность препарата при хранении и применении, увеличить прилипаемость к поверхности растений и создать необходимую степень растекаемости, обеспечить защиту от УФ-излучения и др. Таким образом, помимо активного начала в состав биопрепаратов входят различные добавки.

В рамках проведенной работы рассмотрены следующие стабилизаторы и наполнители: тальк, мел, крахмал, глицерин, меласса, кукурузная мука.

Нами изучены три препаративные формы биопрепарата (жидкая, на основе бентонитовой глины и в виде текучей пасты), ранее проявившие себя наиболее эффективными в отношении возбудителей заболеваний картофеля после длительного хранения препарата. В данном исследовании учтены недостатки ранее разработанных и испытанных препаративных форм при стабилизации и для увеличения сохранности агента биоконтроля. Так, в состав текучей пасты добавлен супернатант (для увеличения текучести, увлажненности и снижения риска пересыхания препаративной формы) и глицерин (для уменьшения испарения с поверхности биопрепарата при

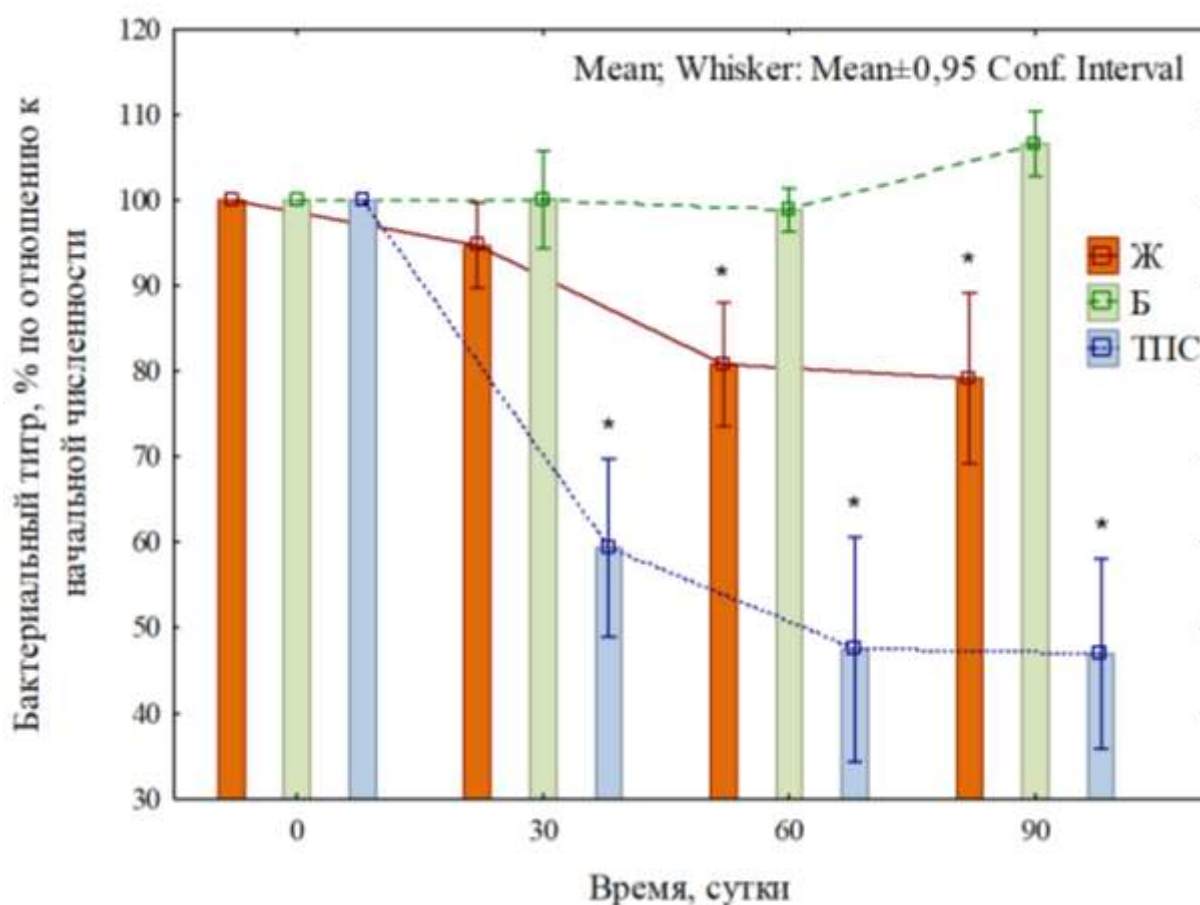
хранении и замедлении высыхания капель при применении, а также в качестве резервного источника углерода и энергии для поддержания высокой численности агента/мл препарата).

Для оценки сохранности агента биопрепарата в разных препаративных формах поставлен эксперимент, в ходе которого культура бактерий *P. extremorientalis*, полученная методом аэробного глубинного периодического культивирования, использована для приготовления трех препаративных форм: жидкой, с бентонитовыми глинами в качестве носителя и текучей пасты. В качестве жидкой препаративной формы выступала непосредственно полученная в ходе культивирования культура изучаемых бактерий с исходным титром $2,68 \times 10^9$ КОЕ/мл. Препаративную форму с бентонитовыми глинами получали путем разбавления (1:1) предварительно простерилизованного мелкодисперсного раствора бентонитовых глин (2 %) с накопительной культурой бактерий (таким образом, численность уменьшена в 2 раза). Текучую пасту получали путем многократного центрифугирования жидкой бактериальной культуры при $g=7000$ (9500 оборотов / мин). После чего надосадочную жидкость сливали, а в осадок добавляли предварительно простерилизованный мел (CaCO_3), разбавляя с осажденную бактериальную массу в соотношении 1:1 по массе. После чего, для увеличения текучести разбавляли (1:1) с надосадочной жидкостью (супернатант). Для уменьшения испарения жидкости с пастой и увеличения сохранности бактерий вносили химически чистый глицерин (99,8 %) из расчета 0,3 мл на 1 г приготовленного препарата.

Полученные препаративные формы были заложены на длительное хранение в условиях низких положительных температур в холодильник (плюс $5,0 \pm 1,0$ °C) в предварительно простерилизованных центрифужных пробирках объемом 50 мл с 30 мл (для жидкой формы и с бентонитом) или 15 мл препарата (для текучей пасты).

На протяжении хранения (30, 60, 90 суток) образцы биопрепаратов извлекали из флакона для проведения учета численности агента и наличия

посторонней микрофлоры. Перед закладкой на хранение был проведен анализ начальной численности бактерий. Изменения бактериальной численности в эксперименте с течением времени представлены на рисунке 12 в виде процента к начальному бактериальному титру в препаративных формах с разными компонентами с доверительным интервалом ($p < 0,05$).



* – статистически значимое ($p < 0,05$) отличие от начальной численности агента в данной препаративной форме, Ж – жидкая препаративная форма, Б – препаративная форма на бентоните, ТПС – текучая паста

Рисунок 12 – Динамика численности агента биопрепарата при хранении в препаративных формах с разными наполнителями

Паста является достаточно распространенной препаративной формой для современных биопрепаратов. Ее получают путем сгущения культуральной жидкости, содержащей бактериальные клетки, путем центрифугирования или сепарирования. Основным преимуществом данной препаративной формы является уменьшение объема и массы

транспортируемого препарата. Из-за уменьшения жизненного пространства и ускорения накопления продуктов обмена клеток до негативного уровня данная препаративная форма не всегда благоприятна для увеличения срока хранения.

Представленные данные также демонстрируют, что в препарате, приготовленном с форме текучей пасты произошло значительное уменьшение бактериального титра (численность уменьшилась почти на 60 % к начальной). Подобное снижение бактериального титра связано, по всей видимости, как с тем, что псевдомонады чувствительны к обезвоживанию клеток, так и с большой бактериальной плотностью клеток в одном грамме текучей пасты, а значит с накоплением в культуре значительного количества вторичных метаболитов, направленных в том числе и на контроль численности окружающих клеток, среди которых широко известны микробные токсины, антибиотики и другие антибиотические метаболиты. Данное снижение бактериального титра произошло, несмотря на предпринятые методы по уменьшению негативного влияния высушивания на клетки (добавление супернатанта и глицерина) и поддержания их жизнеспособного состояния при длительном хранении. Однако, учитывая большую численность микробного агента в препарате, значительно превышающую численность агента в остальных препаративных формах (почти в 300 раз), данное уменьшение все равно сохранило агента биопрепарата в достаточно высокой концентрации. Так, через три месяца хранения численность агента в 1 мл текучей пасты превышала численность агента в жидкой культуре более, чем в 30 раз.

В жидкой препаративной форме без использования дополнительных компонентов также произошло значительное уменьшение бактериального титра и на конец срока хранения численность достигла почти 75 % от начального числа. Подобное снижение можно объяснить исчерпыванием субстратов в культуре, особенно снижается содержание и доступность для клеток растворенного кислорода в толще жидкого биопрепарата.

В биопрепарате с использованием бентонита в качестве носителя снижения бактериального титра на протяжении хранения не наблюдалось. Напротив, к концу эксперимента численность агента возросла и составила почти 110 % от начальной. Подобное увеличение титра можно связать прежде всего с тем, что начальный титр клеток в данной препаративной форме был наиболее низким (жидкая культура разбавлена раствором бентонита в 2 раза), а значит количество накопившихся метаболитов было также меньше. Кроме того, растворы бентонитовых глин представляют собой квазипластичные системы, в которых клетки удерживаются во взвешенном состоянии, не опускаясь на дно сосуда, что для облигатных аэробов, к которым относятся псевдомонады, может иметь решающее значение в долгосрочном хранении, поскольку на глубине сосудов концентрация кислорода, попадающего в жидкости путем диффузии с поверхности, может быть недостаточной для поддержания жизнедеятельности организма. Кроме того, бентониты известны своей адсорбирующей способностью и могут удерживать газы, наподобие активированного угля, что также благоприятно сказывается на увеличении сроков хранения биопрепарата.

Титр агента в биопрепаратах для защиты растений может варьировать в зависимости от вида препарата, целевого объекта, условий применения и других факторов. Однако, согласно Государственному каталогу пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации [50], для большинства зарегистрированных биопрепаратов численность агентов находится на уровне не менее 1×10^9 КОЕ/мл препарата. Данные, полученные в результате эксперимента, показывают, что через три месяца хранения численность агента биопрепарата находится на допустимом уровне и не снизилась ниже установленной границы нормы.

Кроме оценки микробного титра оценено наличие, численность и доля контаминации препаратов посторонней микрофлорой на протяжении хранения биопрепаратов в условиях пониженных положительных температур (таблица 1).

Таблица 1 – Численность контаминантов и их доля от общего микробного числа в препаративных формах биопрепарата в начале эксперимента и после их хранения ($M \pm 95 \% CI$)

Время, сут.	Препаративная форма	Численность бактериальных контаминантов, КОЕ/мл	Численность грибных контаминантов (бактерии / грибы), КОЕ/мл	Доля контаминантов от общей численности (бактерии / грибы), %
0	Жидкая	0,0	0,0	0,0
	С бентонитом	0,0	0,0	0,0
	Паста	0,0	0,0	0,0
30	Жидкая	0,0	0,0	0,0
	С бентонитом	0,0	0,0	0,0
	Паста	0,0	0,0	0,0
60	Жидкая	$5,8 \times 10^6 \pm 1,09 \times 10^6$	0,0	0,2
	С бентонитом	0,0	0,0	0,0
	Паста	$2,23 \times 10^9 \pm 5,33 \times 10^8$	0,0	0,26
90	Жидкая	$3,11 \times 10^7 \pm 2,28 \times 10^7$	0,0	0,8
	С бентонитом	0,0	0,0	0,0
	Паста	$2,75 \times 10^{10} \pm 1,35 \times 10^{10}$	$1,66 \times 10^6 \pm 1,66 \times 10^6$	3,2/0,001

Согласно технологическому регламенту на биопрепарат «Ризоплан» (бактерии *P. fluorescens* AP-33), в составе микрофлоры биопрепарата допускается наличие посторонней микрофлоры на уровне не выше 10 % от общего микробного числа при полном отсутствии дрожжевых и плесневых грибов в препарате. Данный уровень контаминации взят нами за верхний порог, превышение которого свидетельствовало о непригодности биопрепарата к дальнейшему хранению и использованию.

Учитывая указанные сведения, можно заключить, что в жидком препарате, несмотря на появление бактериальной контаминации, уровень посторонней микрофлоры остался на допустимом уровне, а препарат пригоден к дальнейшему хранению и использованию по назначению.

В биопрепарате в форме текучей пасты через три месяца хранения установлено наличие грибной контаминации, что, согласно приведённому технологическому регламенту, считается недопустимым при учете качества биопрепарата. В данной форме биопрепарата также отмечена наибольшая доля бактериальной контаминации.

В биопрепарате на основе бентонитовых глин на протяжении трех месяцев хранения наличие контаминирующей микрофлоры не выявлено.

Таким образом, применение биопрепаратов на основе *P. extremorientalis* в изучаемых препаративных формах может быть рекомендовано в течение 90 суток для жидкой формы и формы на основе бентонитовых глин; в текучей пасте наблюдалась контаминация грибной микрофлорой.

По результатам проведенного эксперимента наилучшей препаративной формой для хранения биопрепарата в течение трех месяцев является форма с бентонитом в качестве носителя, которая обеспечивает наибольшую сохранность агента, при этом являясь наиболее устойчивой к контаминации.

2.2 Оценка антифунгальных свойств препаративных форм биопрепаратов с разными компонентами на основе бактерий *Pseudomonas extremorientalis* при его длительном хранении

Наряду со значением титра агента в биопрепарате, важнейшей характеристикой биологических средств защиты растений является биологическая активность. Биологическая активность является главным показателем качества биопестицидов. Она определяется как способность препаратов проявлять свои положительные свойства при применении. Биологическую активность измеряют реакцией на тест-объектах: насекомых для инсектицидов и фитопатогенах для фунгицидов и т.д. [37]. Биологическая активность для экспериментальным биопрепаратов с разными компонентами складывается из антагонистической активности по отношению к фитопатогенам и ростостимулирующей активности по отношению к растениям.

Лидирующую позицию среди агентов биопрепаратов для защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов занимают бактерии рода *Pseudomonas* [7, 12]. Многие представители рода являются типичными ризосферными бактериями-стимуляторами роста растений: под их влиянием происходит образование фитогормонов (ИУК), улучшается фосфорное питание растений из-за способности растворять минеральные фосфаты [7, 9, 12, 16, 17, 23, 25]. Высокая эффективность их использования показана в отношении контроля наиболее хозяйственно важных патогенных микромицетов – *Fusarium*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, а также оомицетов – *Phytophthora*, *Peronospora* и т.д. На основе штаммов бактерий рода *Pseudomonas* разработаны различные биофунгициды: «Ризоплан», «Псевдобактерин-2», «Агат-25-К», «Бинорам», «БиоВайс» и др. [7, 12, 37]. Антибиоз по отношению к фитопатогенам выражается в действии продуцируемых псевдомонадами антибиотиков (флороглюцины, феназины, пирролнитрины и др.) на возбудителей болезней растений [7, 16, 25, 26]. Феназиновые антибиотики могут быть индукторами синтеза фитоалексинов у растений. Сидерофоры, связывая ионы трехвалентного железа в почве, лишают многие виды фитопатогенных грибов необходимого элемента питания, что приводит к остановке развития последних. К сидерофорам относится пиовердин, полученный из разных видов *Pseudomonas*. При действии пиовердина происходит торможение роста грибов *Rh. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora megasperme* и др. Наряду с фитопатогенными грибами угнетается рост некоторых бактерий, например, *Erwinia carotovora*.

Влияние бактерий рода *Pseudomonas* на растения весьма разнообразно: от стимулирующего до фитопатогенного и агрессивного [7, 9, 10, 11, 12, 51]. Однако многие из них находятся в комменсальных отношениях с растениями, питаясь их выделениями и оказывая положительное влияние на ряд процессов в растительном организме. Биопрепараты на основе *P. fluorescens* и *P. synxantha* с добавлением торфа в качестве носителя проявили высокую ростостимулирующую активность растений [52].

Биологический препарат на основе двух штаммов *P. fluorescens* PF1 и FP7 продемонстрировал высокую фунгистатическую и инсектицидную активность, подавив развитие возбудителей фитофтороза, а также изменив численность популяции листовых минирующих насекомых [53].

В наших экспериментах оценивали антагонистическую активность биопрепаратов с разными наполнителями по отношению к целевым возбудителям заболеваний растений на протяжении длительного хранения в условиях низких положительных температур.

В ходе эксперимента при отборе проб для учета численности (0, 30, 60, 90 сутки) одновременно проведена оценка антифунгальной активности стандартным биологическим методом [37, 38], путем сравнения зараженности семян пшеницы, обработанных рабочими суспензиями биопрепаратов на основе бактерий *P. extremorientalis* с разными наполнителями с зараженностью семян пшеницы, обработанных физиологическим раствором (0,85 % NaCl) без добавления бактерий.

Рабочая суспензия приготавливалась из начального расчета нагрузки с титром не менее 1×10^6 клеток/мл, что соответствовало разведению препарата в 1000 раз. В дальнейшем на протяжении хранения применялось такое же разведение.

На основании полученных данных об изменении зараженности семян возбудителями семенных инфекций при обработке биопрепаратами по сравнению с контролем вычислена антифунгальная активность разных препаративных форм, выражающаяся в эффективности подавления фитопатогенных микроорганизмов (таблица 2). Среди всех возбудителей семенных инфекций наиболее вредоносными в Западной Сибири считается комплекс возбудителей корневых гнилей злаковых, представленный грибами, вызывающими фузариоз и гельминтоспориоз семян, поэтому для данной группы возбудителей нами проводились отдельные расчеты активности, представленные в таблице.

Таблица 2 – Антифунгальная активность препаративных форм биопрепаратов с разными компонентами на основе бактерий *Pseudomonas extremorientalis* по отношению к общей пораженности и к возбудителям корневых гнилей (%)

Время, сут.	Вариант	Общая пораженность	Комплекс гельминтоспориозно-фузариозных инфекций
0	Жидкая	45,9 *	33,9 *
30	Жидкая	31,4 *	38,1 *
	С бентонитом	35,5 *	28,1 *
	Паста	40,0 *	15,4 *
60	Жидкая	30,9 *	10,8 *
	С бентонитом	48,1 *	18,0 *
	Паста	37,3 *	19,4 *
90	Жидкая	29,6 *	28,2 *
	С бентонитом	41,3 *	29,0 *
	Паста	39,3 *	28,1 *
Примечание – * – статистически значимое отличие ($p < 0,05$) от контрольного варианта			

Представленные в таблице данные показывают, что к 90 суткам происходило уменьшение антифунгальной эффективности всех препаративных форм биопрепарата по отношению к начальной активности бактерий в культуральной жидкости, послужившей основой для изготовления всех препаративных форм. Наибольшее снижение антифунгальной активности наблюдалось в жидкой форме биопрепарата, активность по отношению к начальной уменьшилась более чем на 50 %. Уменьшение антифунгальной активности в биопрепарате, изготовленном в форме пасты, было не таким значительным и достигло 17 %. Наибольшая биологическая активность отмечена для биопрепаратов на основе бентонитовых глин (снижение на 10 %).

Таким образом, препаративная форма на основе бентонитовых глин в качестве носителя проявила максимальную антифунгальную активность по сравнению с жидкой формой препарата и текучей пастой в период хранения биопрепаратов в течение трех месяцев при низких положительных температурах.

2.3 Оценка ростостимулирующей активности препаративных форм биопрепаратов с разными наполнителями на основе *Pseudomonas extremorientalis* при его длительном хранении

Наряду с антифунгальной активностью важнейшей характеристикой биологических препаратов для защиты растений является ростостимулирующая активность агента, непосредственно влияющая на величину урожая сельскохозяйственной культуры. Для оценки ростостимулирующей активности также выбирают тест-объекты, которыми являются растения. Среди наиболее распространенным тест-объектов на территории РФ следует отметить семена овса, пшеницы, редиса, кресс-салата и многих других культур. Прописанного и ограниченного при этом перечня тест-объектов не существует. Объекты, в основном, выбирают, исходя из целей и задач планируемого исследования. Выбор тест-объектов при этом базируется на некоторых рекомендациях: широко распространенная и хорошо изученная культура, легко поддерживается в лабораторных условиях (неприхотлива по отношению к условиям произрастания), имеет широкую или узкую норму реакции (в зависимости от задач) и многие другие.

Для оценки ростостимулирующей активности в качестве тест-объекта выбраны семена пшеницы, являющейся широко распространённой культурой на территории Западной Сибири, при проведении тестирования быстро набирает массу (данные можно получить быстро), неприхотлива к условиям выращивания, не занимает много места и т.д.

В ходе проведения фитопатологического анализа семян пшеницы одновременно с учетом пораженности возбудителями семенных инфекций проведена оценка ростостимулирующей активности биопрепарата, которая

заклучалась в сравнении данных по всхожести семян, длине проростков и количеству корней у растений пшеницы, обработанных разными биопрепаратами с разными компонентами, по сравнению с контрольным вариантом, где семена обрабатывали физиологическим раствором (0,85 % NaCl).

Результаты проведенных учетов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Всхожесть, длина и количество корней у проростков пшеницы при обработке семян препаративными формами биопрепаратов с разными наполнителями на основе бактерий *Pseudomonas extremorientalis* ($M \pm 95\% \text{ CI}$)

Время, сут.	Препаративная форма	Всхожесть, %	Длина проростков, см	Количество корней, шт.
0	Контроль	85 $\pm$ 3,0	10,1 $\pm$ 1,1	3,49 $\pm$ 0,23
	Жидкая	90 $\pm$ 3,0	11,3 $\pm$ 1,1	3,99 $\pm$ 0,25 *
30	Контроль	80 $\pm$ 2,7	10,8 $\pm$ 0,9	3,74 $\pm$ 0,30
	Жидкая	78,0 $\pm$ 5,6	12,8 $\pm$ 1,5	3,97 $\pm$ 0,25
	С бентонитом	82,6 $\pm$ 5,1	11,8 $\pm$ 0,6	4,21 $\pm$ 0,16 *
	Паста	77,8 $\pm$ 4,9	9,2 $\pm$ 0,5	4,11 $\pm$ 0,15 *
60	Контроль	65,0 $\pm$ 6,7	8,8 $\pm$ 1,4	3,74 $\pm$ 0,30
	Жидкая	78,0 $\pm$ 4,5 *	9,4 $\pm$ 0,5	3,87 $\pm$ 0,15
	С бентонитом	72,6 $\pm$ 5,1	11,8 $\pm$ 0,6 *	4,27 $\pm$ 0,16 *
	Паста	77,5 $\pm$ 5,9 *	9,2 $\pm$ 0,5	4,12 $\pm$ 0,15 *
90	Контроль	58,0 $\pm$ 5,6	2,6 $\pm$ 0,4	2,89 $\pm$ 0,39
	Жидкая	77,3 $\pm$ 4,0 *	5,9 $\pm$ 0,4 *	3,66 $\pm$ 0,13 *
	С бентонитом	70,0 $\pm$ 5,1 *	6,2 $\pm$ 0,4 *	3,70 $\pm$ 0,13 *
	Паста	54,7 $\pm$ 5,6	4,2 $\pm$ 0,6 *	3,09 $\pm$ 0,21
Примечание – * – статистически значимое отличие ($p < 0,05$) от контроля				

На основании данных, представленных в таблице 3, рассчитаны показатели ростостимулирующей активности разных препаративных форм по отношению к контрольному варианту (таблица 4).

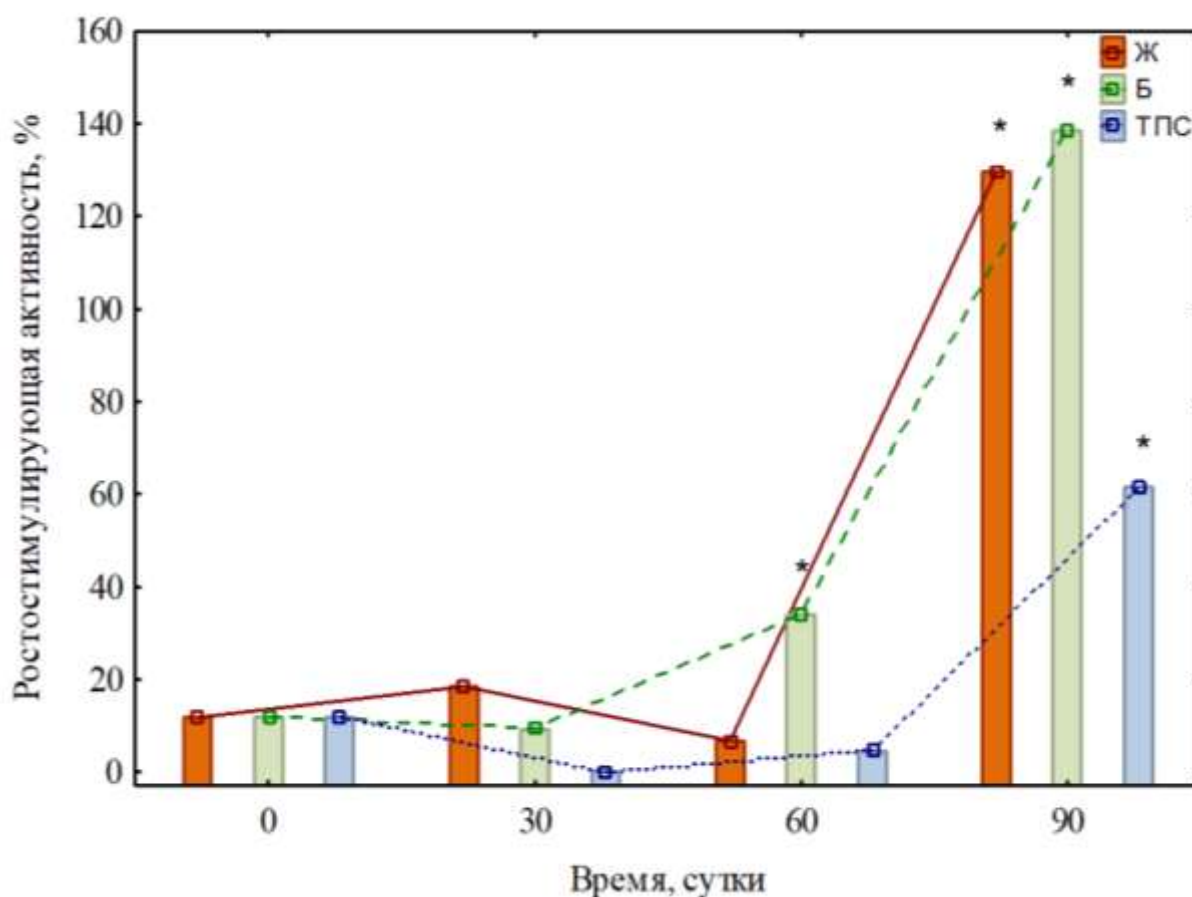
Таблица 4 – Ростостимулирующая активность препаративных форм биопрепарата на основе *Pseudomonas extremorientalis* по отношению к контрольным значениям, %

Время, сут.	Препаративная форма	Всхожесть	Длина проростков	Количество корней
0	Жидкая	5,9	11,8	14,3 *
30	Жидкая	0,0	18,5	6,1
	С бентонитом	3,3	9,3	12,6 *
	Паста	0,0	0,0	9,9 *
60	Жидкая	20,0 *	6,8	3,5
	С бентонитом	11,7	34,1 *	14,2 *
	Паста	19,2	4,5	10,2 *
90	Жидкая	33,3 *	126,9 *	26,6 *
	С бентонитом	20,7 *	138,5 *	28,1 *
	Паста	0,0	61,5 *	6,9
Примечание – * – статистически значимое ($p < 0,05$) отличие от контроля				

Представленные в таблице данные демонстрируют, что наибольший ростостимулирующий эффект на протяжении всего периода хранения биопрепаратов в разных препаративных формах с разными компонентами диагностируется для длины проростка и количества корней пшеницы. Всхожесть при этом является слабо изменяемым параметром, на котором проследить ростостимулирующую активность препаратов достаточно сложно.

Полученные экспериментальные данные показывают, что ростостимулирующая активность биопрепаратов разных препаративных форм при хранении увеличивается. Известно, что стимуляция роста растений бактериями вызвана, в том числе, и выделениями последними целого ряда метаболитов, среди которых отмечены гормоны, витамины, органические кислоты и другие соединения [7]. Данные вещества относят к бактериальным

идиолитам, концентрация которых в период хранения бактериальных суспензий на некотором промежутке времени может существенно увеличиваться. Этим можно объяснить факт значительного увеличения биологической активности препаратов по отношению к длине проростка пшеницы (рисунок 13).



* – статистически значимое ($p < 0,05$) отличие от начальной ростостимулирующей активности данной препаративной формы;
 Ж – жидкая препаративная форма; Б – препаративная форма на бентоните;
 ТПС – текучая паста

Рисунок 13 – Динамика ростостимулирующей активности биопрепаратов при хранении в препаративных формах с разными наполнителями по отношению к длине проростка пшеницы

При анализе динамики ростостимулирующей активности биопрепаратов с разными наполнителями следует отметить, что наиболее стабильный положительный эффект по отношению к проросткам пшеницы

наблюдался для препаративной формы на основе бентонитовой глины. По окончании периода хранения (через три месяца) ростостимулирующая активность данной препаративной формы составляет от 20,0 % до 138,5 % в зависимости от параметра, по которому проводится ее оценка.

2.4 Заключение о целесообразности применения разных компонентов в составе биопрепарата на основании полученных результатов проведенного исследования

На основании полученных экспериментальных данных можно заключить, что в жидкой препаративной форме в целом неплохо сохраняется биологический агент на протяжении полутора месяцев хранения препарата. Титр агента находился на уровне 75 % от начального, при этом и наличие контаминирующей микрофлоры и численность агента на 1 мл биопрепарата соответствовали принятому нормативу. Однако наблюдалось значительное снижение антифунгальной активности (более чем на 50 % от начальной). Ростостимулирующая активность жидкого препарата на протяжении хранения возрастала и на окончание периода хранения значительно превышают показатели исходной (маточной) культуры.

Численность агента в текучей пасте, стабилизированной глицерином и карбонатом кальция, подверглась значительному снижению на протяжении хранения, однако на момент окончания находилась на уровне, превышающем минимальное содержание более чем в тридцать раз. Однако, наличие грибной контаминации не позволяют рекомендовать ее для дальнейшего применения. Антифунгальная и ростостимулирующая биологическая активность была на достаточно невысоком уровне.

Наиболее эффективно проявило применение бентонитовых глин в качестве компонента биопрепарата. Титр агента на протяжении хранения сохранялся на начальном уровне, не было отмечено контаминирующей микрофлоры. Антифунгальная активность также на протяжении хранения осталась на уровне исходной культуры. Ростостимулирующая активность значительно возросла по сравнению с начальной.

Таким образом, в качестве препаративной формы, способствующей лучшему проявлению положительных свойств биопрепарата на основе бактерий *P. extremorientalis* можно рекомендовать использование раствора бентонитовых глин, способствующих образованию квазипластичных систем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Для проведения эксперимента наработана культура бактерий рода *Pseudomonas* и на ее основе созданы препаративные формы с разными наполнителями, способствующие стабилизации агента биопрепарата на протяжении хранения при низких положительных температурах.

2. Применение биопрепаратов в жидкой форме и на основе бентонитовых глин может быть рекомендовано в течение 90 суток их хранения при температуре от плюс 4 °С до плюс 5 °С; в текучей пасте после данного периода хранения наблюдалась контаминация грибной микрофлорой. По результатам проведенного эксперимента наилучшей препаративной формой для сохранности бактериального титра в течение трех месяцев является форма с бентонитом в качестве носителя, которая при этом является наиболее устойчивой к контаминации.

3. При проведении оценки изменения биологической активности биопрепаратов с разными наполнителями отмечено, что на протяжении периода хранения снижается антифунгальная и увеличивается ростостимулирующая активность биопрепаратов. Наибольшее снижение антифунгальной активности при хранении установлено для жидкой препаративной формы (более чем на 50 % по отношению к начальной), в форме текучей пасты до 17 %, с добавлением бентонитовой глины до 10 %.

4. При анализе динамики ростостимулирующей активности биопрепаратов с разными наполнителями следует отметить, что наиболее стабильный ростостимулирующий эффект на проростках пшеницы наблюдался для препаративной формы на основе бентонитовой глины. По окончании периода хранения (три месяца) ростостимулирующая активность данной препаративной формы составляет от 20,0 % до 138,5 %.

5. Наиболее эффективным оказалось введение бентонитовой глины в качестве компонента биопрепарата: титр агента на протяжении хранения сохранялся на начальном уровне, не отмечено контаминирующей

микрофлоры, антифунгальная активность осталась, в целом, на уровне близком к исходной культуре, а ростостимулирующая активность значительно возросла по сравнению с начальной.

6. В качестве препаративной формы, способствующей лучшему проявлению положительных свойств биопрепарата на основе бактерий *Pseudomonas extremorientalis*, можно рекомендовать использование раствора бентонитовых глин в концентрациях, способствующих образованию квазипластичных систем.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Population Dynamics. Department of Economic and Social Affairs Population Dynamics. – 2019. – [Электронный ресурс]. – URL: <https://population.un.org/wpp/> (дата обращения 01.11.2023).
2. Nagorska K., Bikowski M., Obuchowski M. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent // Acta Biochim Pol. - 2007. - № 54. - PP. 495-508.
3. Savary S., Willocquet L., Pethybridge S.J., Esker P., McRoberts N., Nelson A. The global burden of pathogens and pests on major food crops // Nature Ecology & Evolution. - 2019. - Vol. 3, № 3. - PP. 430-439.
4. Петенко А.И., Плутахин Г.А. Основы сельскохозяйственной биотехнологии: учеб. пособие. - Краснодар: КГАУ, 1999. - 172 с.
5. Гагкаева Т.Ю., Дмитриев А.П., Павлюшин В.А. Микробиота зерна – показатель его качества и безопасности // Защита и карантин растений. - 2012. - № 9. - С. 14-18.
6. Тепляков Б.И., Теплякова О.И. Болезни яровой пшеницы в Западной Сибири: научное издание // Защита и карантин растений. - 2003. - № 1. - С. 17-19.
7. Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соросовский образовательный журнал. - 1998. - № 10. - С. 25-31.
8. Штерншис М.В. Тенденции развития биотехнологии микробных средств защиты растений в России // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. - 2012. - № 2(18). - С. 92-100.
9. Артамонова М.Н., Алексеева А.С., Потатуркина-Нестерова Н.И. Ризосферные бактерии как антагонисты патогенных и условно-патогенных микроорганизмов // Ульяновский медико-биологический журнал. - 2013. - № 3. - С. 116-118.

10. Сидорова Т.М., Аллахвердян В.В., Асатунова А.М. Роль бактерий рода *Pseudomonas* и их метаболитов в биоконтроле фитопатогенных микроорганизмов // Агрохимия. - 2023. - № 5. - С. 83-93.
11. Захаренко В.А. Научное обеспечение производства, рынка и реализации пестицидов в аграрном секторе Российской Федерации // Агрохимия. - 2014. - № 4. - С. 3-19.
12. Захаренко В.А. Биопестициды и средства защиты растений с небактериальной активностью в интегрированном управлении фитосанитарным состоянием зерновых агроэкосистем // Агрохимия. - 2015. - № 6. - С. 64-76.
13. Шулико Н.Н., Хамова О.Ф., Воронкова Н.А., Тукмачева Е.В., Дороненко В.Д. Влияние комплексного применения удобрений и биопрепаратов на эффективное плодородие чернозема выщелоченного и продуктивность ячменя // Агрохимия. - 2019. - № 2. - С. 13-20.
14. Монастырский О.А. Биопрепараты: типы, рынки в России и в других странах // Агрохимия. - 2019. - № 11. - С. 86-90.
15. Логвинова Т.С., Булгакова В.П. Производство и применение биологических средств защиты в России и в мире // Инновации природообустройства и защиты окружающей среды: материалы I Национальной научно-практической конференции с международным участием, Саратов, 23-24 января 2019 г. - Саратов: Общество с ограниченной ответственностью Издательство «КУБиК», 2019. - С. 546-551.
16. Сидоренко О.Д. Действие ризосферных псевдомонад на урожайность сельскохозяйственных культур // Агрохимия. - 2001. - № 8. - С. 56-62.
17. Corrêa E.B., Sutton J.C., Bettiol W. Formulation of *Pseudomonas chlororaphis* strains for improved shelf life // Biological Control. - 2015. - Vol. 80. - P. 50-55.
18. Томашевич Н.С., Асатунова А.М. Хранение биопрепаратов на основе штаммов бактерий-антагонистов *Bacillus subtilis* в препаративной форме жидкая культура // Инновационные экологически безопасные технологии защиты растений. Материалы международной научной конференции. Алматы,

24–25 сентября 2015 г. - Алматы: Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений, 2015. - С. 770-772.

19. Саламатова Ю.А., Минаева О.М., Акимова Е.Е. Эффективность хранения ряда бактериальных препаратов в жидкой форме // Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2010. - №1(9). - С. 20-28.

20. Лактионов Ю.В., Попова Т.А., Андреев О.А., Ибатуллина Р.П., Кожемяков А.П. Создание стабильной формы ростстимулирующих микробиологических препаратов и их эффективность // Сельскохозяйственная биология. - 2011. - № 3. - С. 116-118.

21. Бельчинская Л.И., Козлов К.А., Читечан С.С. Адсорбционные характеристики нанопористого монтмориллонита, активированного фосфорной кислотой // Физикохимия поверхности и защита металлов. - 2008. - Т. 44, № 3. - С. 295-299.

22. Акимова Е.Е., Блинова П.А., Минаева О.М., Терещенко Н.Н., Кравец А.В. Оценка эффективности бактериальных штаммов в модельных экспериментах // Защита растений в современных технологиях возделывания сельскохозяйственных культур : материалы международной научно-практической конференции. п. Краснообск, 24–26 июля 2013 г. - Краснообск : Сибирский научно-исследовательский институт земледелия и химизации сельского хозяйства, 2013. - С. 11-14.

23. Минаева О.М., Акимова Е.Е., Терещенко Н.Н., Кравец А.В., Зюбанова Т.И., Апёнышева М.В. Перспективы использования псевдомонад, ассоциированных с почвенными люмбрицидами, против возбудителей корневых гнилей яровых зерновых // Сельскохозяйственная биология. - 2019. - Т. 54, № 1. - С. 91-100.

24. Беркли Р., Бок Э., Бум Д., Бреннер Д., Васильева Л.В. Определитель бактерий Берджи: пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина: в 2 т. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. - 9-е изд. - М.: Мир, 1997. - Т. 1. - 432 с.

25. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. - Киев: Наукова думка, 1987. - 148 с.
26. Рубан Е.Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*. - М.: Наука, 1986. - 200 с.
27. Хованский М.В. Применение бентонитовой глины и минеральных удобрений под зерновое сорго на черноземе обыкновенном: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. - Дон. гос. аграр. ун-т, п. Персиановский, 2009. - 181 с.
28. Дьяконов И.А. Глицерин // Химическая энциклопедия: в 5 т. / Гл. ред. И.Л. Кнунянц. - М.: Советская энциклопедия, 1988. - Т. 1. - С. 585.
29. Вустин М.М. Биологическая роль глицерина в клетках дрожжей. Дрожжи как продуценты глицерина // Биотехнология. - 2020. - Т. 36, № 6. - С. 6-16.
30. Артеменко А.И. Органическая химия: Учеб. для строит, спец. вузов. - 4-е изд., перераб. и доп. - М.: Высш. шк., 2000. - 429 с.
31. Дроздов А.А., Зломанов В.П., Мазо Г.Н., Спиридонов Ф.М. Неорганическая химия: В 3 т. / Под ред. Ю.Д. Третьякова. Т. 2: Химия непереходных элементов: учебник для студ. высш. учеб. заведений. - М.: Издательский центр «Академия», 2004. - 368 с.
32. Государственный реестр селекционных достижений: офиц. сайт ФГБУ «Госсортокомиссия». - Электрон. дан. - М.: ФГБУ «Госсортокомиссия», 1924–2022. - URL: <https://reestr.gossortrf.ru> (дата обращения: 01.11.2023).
33. Посыпанов Г.С., Долгодворов В.Е., Жеруков Б.Х., Гатаулина Г.Г., Горбачев И.В. Растениеводство: учебник / под ред. Г.С. Посыпанова. - М.: КолосС, 2007. - 612 с.
34. Торопова Е.Ю., Сухомлинов В.Ю., Кириченко А.А., Пискарев В.В. Паразитирование *Bipolaris sorokiniana* Sacc. Shoem. в системе органов сортов яровой пшеницы в северной лесостепи Приобья // Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). - 2022. - № 1(62). - С. 76-87.

35. Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н., Козлов Е.И. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов биологических специальностей вузов / под ред. Н.С. Егорова. - М.: Изд-во Московского университета, 1976. - 307 с.
36. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Колотилова Н.Н., Котова И.Б. Практикум по микробиологии: учебное пособие / под ред. А.И. Нетрусова. - М.: Издательский центр «Академия», 2005. - 608 с.
37. Минаева О.М., Акимова Е.Е., Зюбанова Т.И., Терещенко Н.Н. Биопрепараты для защиты растений: оценка их качества и эффективности. Учебное пособие. - Томск: Издательский дом ТГУ, 2018. - 132 с.
38. ГОСТ 12044-93 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями. - М.: ИПК Издательство стандартов, 2004. - 55 с.
39. ГОСТ 21507-2013 Защита растений. Термины и определения. - М.: Стандартинформ, 2014. - 23 с.
40. Фитоэкспертиза семян [Электронный ресурс]. - URL: <https://www.syngenta.ru/seedcare/services/seeds-phytoexpertise> (дата обращения 01.11.2023).
41. Фитоэкспертиза семян – залог здорового урожая [Электронный ресурс]. - URL: <https://krchet.cap.ru/news/2020/04/08/fitoekspertiza-semyan-zalog-zdorovogo-urozhaya> (дата обращения 01.11.2023).
42. Пидопличко Н.М. Грибы-паразиты культурных растений. Определитель. Т. 2. - Киев: Наукова думка, 1977. - 299 с.
43. Su J., Zhao J., Zhao S., Li M., Pang S., Kang Z., Zhen W., Chen S., Chen F., Wang X. Genetics of resistance to common root rot (spot blotch), fusarium crown rot, and sharp eyespot in wheat // Front. Genet. - 2021. - № 12. Article number 699342. - 15 p. - URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.699342/full> (access data: 01.11.2023).

44. Kazan K., Gardiner D.M. Fusarium crown rot caused by *Fusarium pseudograminearum* in cereal crops: recent progress and future prospects // Molecular plant pathology. - 2018. - Vol. 19, Iss. 7. - PP. 1547-1562.
45. Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н. Основы микологии. Морфология и систематика грибов и грибоподобных микроорганизмов. - М.: Т-во научных изданий КМК, 2005. - 220 с.
46. Khudhair M.W., Aboud H.M., Dheyab N., Shbar A.K., Hiatham S. Khalaf H.S. The first record of *Alternaria triticina* the causative agent of alternaria leaf blight in wheat and barley in Iraq // International Journal of Phytopathology. - 2014. - Vol. 3(3). - PP. 133-138.
47. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для вузов. - М.: Дрофа, 2004. - 256 с.
48. Терещенко Н.Н., Акимова Е.Е., Минаева О.М. Практикум по микробиологии для оценки плодородия почвы и качества грунтов: учеб.-метод. пособие. - Томск: Изд-во ТГУ, 2011. - 96 с.
49. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. - М.: Высшая школа, 1990. - 352 с.
50. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Часть I. Пестициды / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. - М., 2023. - 941 с.
51. Preston G.M. Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas* // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. - 2004. - Vol. 359, № 1446. - PP. 907-918.
52. Novinscak A., Filion M. Long term comparison of talc-and peat-based phytobeneficial *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas synxantha* bioformulations for promoting plant growth // Frontiers in Sustainable Food Systems. - 2020. - Vol. 4. - Article number 602911. - 10 p. - URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2020.602911/full> (access data: 01.11.2023).

53. Commare R.R., Nandakumar R., Kandan A., Suresh S., Bharathi M., Raguchander T., Samiyappan R. *Pseudomonas fluorescens* based bioformulation for the management of sheath blight disease and leaffolder insect in rice // Crop Protection. - 2002. - Vol. 21, N° 8. - PP. 671-677.