

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

Объект авторского права

УДК 579.64; 579.2; 579.83; 632.937

**ШМЫГА
ЕКАТЕРИНА ЮРЬЕВНА**

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ КОМПЛЕКСНОГО
МИКРОБНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ФИТОСАНИТАРНОГО
СОСТОЯНИЯ ПОСЕВОВ И ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ
ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

Минск 2025

Научная работа выполнена в государственном научном учреждении
«Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»
и в государственном научно-производственном объединении
«Химический синтез и биотехнологии»

Научный руководитель: **Коломиец Эмилия Ивановна**, доктор биологических наук, профессор, академик Национальной академии наук Беларуси, заслуженный деятель науки Республики Беларусь, генеральный директор государственного научно-производственного объединения «Химический синтез и биотехнологии»

Официальные оппоненты: **Решетников Владимир Николаевич**, доктор биологических наук, профессор, академик Национальной академии наук Беларуси, заслуженный деятель науки Республики Беларусь

Феклистова Ирина Николаевна, кандидат биологических наук, доцент, заведующий научно-исследовательской лабораторией молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета Белорусского государственного университета

Оппонирующая организация: Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет»

Защита состоится «26» апреля 2025 г. в 9:30 ч на заседании совета по защите диссертаций Д 01.34.01 при государственном научном учреждении «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220084, г. Минск, ул. акад. В. Ф. Купревича, 2, тел.: (+375-17) 317-42-09, факс: (+375-17) 395-47-66, e-mail: microbio@mbio.bas-net.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»

Автореферат разослан «24» марта 2025 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
кандидат биологических наук, доцент



Т.В. Семашко

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертации. Среднемировой уровень потерь урожая сельскохозяйственных культур от болезней различной этиологии оценивается в 12–28%, причем потери урожая зерновых в отдельные годы могут достигать 30–50%, а пораженность болезнями – 44% и выше (Сорока, 2014; Танский, 2004; Санин, 2015). В условиях Беларуси особый ущерб злаковым наносят корневые гнили. Видовой состав патогенов, вызывающих корневые гнили злаков, достаточно разнообразен. По степени доминирования возбудителей болезни в патогенном комплексе различают фузариозную, офиоболезную, гельминтоспориозную, ризоктониозную, а также церкоспореллезную корневые гнили. В агробиоценозах Республики Беларусь поражение зерновых культур проявляется чаще всего в виде одного из перечисленных заболеваний или их последовательной смены на протяжении процесса онтогенеза. Болезнь вызывает гибель всходов, отставание в росте, щуплость колоса у пораженных растений или полное отмирание продуктивных стеблей (Сидоров, 2003; Пригте, 2004; Попов, 2011; Нещадим, 2014;).

К настоящему времени накоплен значительный арсенал приемов и средств для борьбы с болезнями растений, среди которых агротехнические, химические, селекционно-генетические и биологические. Химический метод защиты растений пока продолжает занимать ведущее место, особенно в системах интенсивных технологий возделывания зерновых культур. Однако длительное применение пестицидов отрицательно влияет на экологическую ситуацию из-за их способности накапливаться в почве и растениях.

В качестве альтернативы химическим веществам могут быть использованы биологические средства защиты, основу которых составляют микроорганизмы с комплексом полезных для растений свойств. Биопрепараты обладают высокой эффективностью действия в отношении патогенов зерновых культур, не загрязняют окружающую среду, безопасны для теплокровных животных, рыб и полезных насекомых (Надыкта, 2010; Бизюкова, 2012; Монастырский, 2009; Штерншис, 2016; Chen, 2009; Sabae, 2018; Гвоздева, 2020; Еремин, 2022). Одними из перспективных агентов биологического контроля являются бактерии рода *Bacillus*, которые, наряду с высокой антимикробной активностью в отношении широкого спектра возбудителей болезней зерновых культур (Штерншис, 2016; Азизбекян, 2018), характеризуются способностью к спорообразованию, что обеспечивает длительную сохранность биопрепаратов на их основе и возможность применения в широком диапазоне температур. Так, экспериментально доказана высокая эффективность бациллярных биопрепаратов российского производства Фитоспорин-М, Бактофит, Алирин-Б, Гамаир, Фитотонус в качестве средств защиты зерновых от корневых гнилей.

В Республике Беларусь для зерновых культур зарегистрировано пять биологических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* – микробные удобрения Жыцень, Фертилайф Био, Полибакт, а также микробные препараты фитозащитного действия Бактавен для борьбы с корневыми гнилями овса и Агроревитол для деструкции остаточных количеств гербицидов класса сульфонилмочевины в почве и повышения урожайности пшеницы яровой.

В задачи настоящего исследования входило создание полифункционального биопрепарата фитозащитного действия на основе спорообразующих бактерий с комплексом взаимодополняющих свойств (высокой антимикробной, целлюлолитической, азотфиксирующей, фосфатмобилизующей и ростстимулирующей активностями), способных эффективно подавлять развитие корневых гнилей, регулировать биологическую активность почвы и повышать продуктивность озимой тритикале, что представляет большую значимость для сельского хозяйства Республики Беларусь.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами) и темами.

Диссертационная работа выполнена в Отделе биотехнологии средств биологического контроля государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси» и в Отделе регуляции микробоценозов техногенных экосистем государственного научно-производственного объединения «Химический синтез и биотехнологии» в рамках проектов: «Получение и направленное культивирование штаммов микроорганизмов с высоким адаптогенным и биосинтетическим потенциалом как основа новых биотехнологий для сельского хозяйства и промышленности» (задание 3.14 ГПНИ «Биотехнологии», подпрограмма «Микробные биотехнологии», 2016–2018 гг., № госрегистрации 20160081), «Разработать и внедрить технологию комплексного микробного препарата Биопродуктин для повышения биологической активности почвы, улучшения фитосанитарного состояния посевов и повышения продуктивности зерновых культур» (мероприятие 70 ГП «Научоемкие технологии и техника», подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии», 2016-2020 гг., № госрегистрации 20171964).

Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы, утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 07.05.2020 № 156 п. 2. «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии производства: биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные)» и п. 5. «Агропромышленные и продовольственные технологии: продовольственная безопасность и качество сельскохозяйственной продукции».

Цель и задачи исследования. Цель исследования – выделение, отбор и характеристика штаммов спорообразующих бактерий с комплексом агрономически ценных свойств и разработка на их основе технологии получения препарата микробного «Биопродуктин» для контроля возбудителей болезней и повышения продуктивности зерновых культур.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

– среди выделенных природных микроорганизмов отобрать высокоактивные штаммы спорообразующих бактерий с антагонистической, целлюлолитической, азотфиксирующей и фосфатмобилизующей активностями, изучить их морфолого-культуральные, физиолого-биохимические, молекулярно-генетические свойства и определить таксономическую принадлежность;

– с использованием отобранных штаммов разработать технологию получения препарата микробного «Биопродуктин» в жидкой форме и оптимизировать условия его хранения;

– провести испытания эффективности фитозащитного и ростстимулирующего действия препарата в лабораторных и модельных опытах.

Объект исследования – высокоактивные штаммы спорообразующих бактерий с комплексом агрономически ценных свойств.

Предмет исследования – морфолого-культуральные, физиолого-биохимические и молекулярно-генетические свойства штаммов бактерий – основы препарата микробного «Биопродуктин».

Научная новизна. Создан уникальный бактериальный консорциум с комплексной антимикробной, азотфиксирующей, целлюлолитической и фосфатмобилизующей активностями (штаммы *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *Bacillus mojavensis* БИМ В-1268 Д, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д и *Priestia megaterium* БИМ В-1269 Д) и научно аргументирована перспективность его использования в качестве основы микробного препарата «Биопродуктин» для улучшения фитосанитарного состояния посевов и повышения продуктивности зерновых культур.

Высокий фитозащитный потенциал бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д подтвержден наличием в их геномах генов, ответственных за синтез биологически активных соединений с антимикробным действием (*baeB* (бациллин), *dhbACE* (бациллибактин), *bmyD* (бацилломицин), *dfnA* (диффицидин), *fenA* (фенгицин), *mlnA* (макролактин), *srfAA* (сурфактин), *ituABD* (итурин)).

Доказано, что максимальные показатели титра $(3,1 \pm 0,52) \cdot 10^9$ КОЕ/мл и биологической активности бактерий, основы препарата микробного «Биопродуктин» (антимикробная – диаметр зоны задержки роста фитопатогенов $30,1 \pm 0,31$ мм, фосфатмобилизующая – диаметр зон гидролиза ортофосфата кальция $15,1 \pm 0,35$ мм, азотфиксирующая – $84,9 \pm 0,14$ нМ C_2H_4), достигаются при их

выращивании в опытно-промышленном ферментере BIOFLO 5000 120L на модифицированной питательной среде Мейнелла с добавлением микроэлементов $MnCl_2 \times 4H_2O$ и $ZnSO_4 \times 7H_2O$ в концентрации 0,2 мг/л при норме внесения посевного материала – 2,0 об.%, интенсивности аэрации – 1,0 л воздуха/л среды·мин и скорости перемешивания – 120 об./мин.

Разработанная технология обеспечивает получение отечественного микробного препарата «Биопродуктин» комплексного действия с биологической эффективностью в отношении корневых гнилей озимой тритикале (21,6–56,0%), не уступающего известным отечественным и мировым аналогам «Бактавен» (Беларусь), «Алирин-Б», «Гамаир» (Россия) (Власов, 2017; Шешегова, 2012), а также обладающего способностью ускорять процессы минерализации растительных остатков, фиксировать атмосферный азот и растворять труднорастворимые фосфаты, переводя их в доступную для растений форму.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Полученные и идентифицированные на основе масс-спектрометрии MALDI-TOF MS и сиквенс-анализа генов 16S рРНК штаммы спорообразующих бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *P. megaterium* БИМ В-1269 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д не патогенны и не токсигенны, обладают комплексом взаимодополняющих свойств (антимикробной, целлюлолитической, азотфиксирующей, фосфатмобилизующей активностями), что обуславливает перспективность их использования в качестве основы микробного препарата «Биопродуктин» для улучшения фитосанитарного состояния посевов и повышения продуктивности зерновых культур.

2. Генетическая основа антимикробной активности против бактериальных (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Pectobacterium*, *Pantoea*) и грибных (*Alternaria*, *Arthrinium*, *Epicoccum*, *Fusarium*) патогенов у отобранных штаммов бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д обусловлена наличием в их геномах целого ряда генетических детерминант (в частности, *baeB*, *dhbACE*, *bmyD*, *dfnA*, *fenA*, *mlnA*, *srfAA* и *ituABD*), кодирующих антимикробные соединения широкого спектра действия (бациллин, бациллибактин, бацилломицин, диффицидин, фенгицин, макролактин, сурфактин, итурин соответственно). Кроме того, геномы всех исследуемых бактерий содержат гены триптофана (*trpAB*), кодирующие предшественник индолилуксусной кислоты. Антимикробная и ростстимулирующая активность исследуемых культур подтверждена не только генетическими, но и биохимическими методами.

3. Технология получения препарата микробного «Биопродуктин», основанная на отдельном глубинном культивировании бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *P. megaterium* БИМ В-1269 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д в оптимизированных условиях в ферментерах АНКУМ–10М и BIOFLO 5000 120L (температура 30°C, pH 7,0–7,5, норма

внесения 20-часового посевного материала 2,0 об.%, интенсивность аэрации – 1,0 л воздуха/л среды·мин, скорость вращения мешалки – 180 об./мин и 120 об./мин, продолжительность ферментации 32 ч) и последующем смешивании КЖ монокультур бактерий в соотношении 1:1:1:1, обеспечивает высокий титр и фитозащитные свойства препарата, применение которого позволяет снизить распространенность и развитие корневых гнилей на 21,6–56,0%, а также повысить урожайность тритикале озимой на 4,6–6,1 ц/га. Внесение в состав жидкого препарата микробного «Биопродуктин» гумата калия в концентрации 2,0 об.% способствует сохранности основных показателей в течение 1 года.

Личный вклад соискателя. Автором проанализирована научная литература по теме диссертации, получены и систематизированы экспериментальные данные, составляющие основу работы, осуществлен их анализ, обобщение и статистическая обработка, подготовлены публикации. Соавторами опубликованных работ являются сотрудники отраслевой лаборатории молекулярной диагностики и регуляции почвенных и водных микробоценозов государственного научно-производственного объединения «Химический синтез и биотехнологии», государственное научное учреждение «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси» и учреждения образования «Гродненский государственный аграрный университет».

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, доктору биологических наук, профессору, академику Э.И. Коломиец за ценные консультации, поддержку на всех этапах выполнения и подготовки диссертационной работы.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов.

Материалы работы представлены на научно-практических конференциях: XV Международная научная конференция «Молодежь в науке – 2018» (29 октября–1 ноября 2018 г., г. Минск), XI Международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (3–6 июня 2019 г., г. Минск), XII Международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (7–11 июня 2021 г., г. Минск), XX Международная научная конференция «Молодёжь в науке – 2023» (20–22 сентября 2023 г., г. Минск), Ярмарка инновационных разработок «Агропромышленные и продовольственные технологии» (23 мая 2024 г., г. Минск).

Отобранные высокоактивные штаммы бактерий могут служить объектом коммерциализации. Разработанная технология получения препарата микробного «Биопродуктин» в жидкой форме внедрена в опытно-промышленное производство Института микробиологии НАН Беларуси, ГНПО «Химический синтез и биотехнологии» и государственного предприятия «Бобруйский завод биотехнологий», за период 2021–2024 гг. произведено и реализовано свыше 6 000 л препарата.

Опубликованность результатов диссертации. Основные научные результаты опубликованы в 14 работах, из них 7 статей – в рецензируемых научных изданиях,

1 статья – в сборнике научных трудов, 3 статьи и тезисы 3 докладов – в материалах конференций. Объем публикаций, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, составляет 3,0 авторских листа.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа включает введение, общую характеристику работы, обзор литературы, описание объектов и методов исследования, 4 главы экспериментальной части, заключение, список использованных источников (189 наименований на 22 страницах), перечень публикаций соискателя (14 наименований на 3 страницах), 23 приложения (на 47 страницах). Работа изложена на 179 страницах машинописного текста, содержит 29 таблиц на 39 страницах, 23 рисунка на 20 страницах.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Аналитический обзор литературы

На основе анализа научно-технической литературы охарактеризованы антропогенные факторы, оказывающие негативное влияние на фитосанитарное состояние агробиоценозов и продуктивность зерновых культур, показана важность включения микробных препаратов комплексного действия на основе бактерий рода *Bacillus* в систему современных агротехнических приемов, применяемых при выращивании злаковых. Представлен ассортимент современных бациллярных биопрепаратов, приведены результаты их практического применения в системе возделывания зерновых культур.

Материалы и методы исследования

Основными объектами исследований являлись штаммы спорообразующих бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д, *P. megaterium* БИМ В-1269 Д (выделенные из различных образцов почвы с растительными остатками, отобранных на территории Минской и Гродненской областей).

Для глубинного выращивания исследуемых бактериальных культур использовали оптимизированную питательную среду состава (г/л): меласса – 30,0; $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 7,0; KH_2PO_4 – 3,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,5; Na-цитрат – 0,5; $MnCl_2 \times 4H_2O$ – 0,2 мг/л; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2 мг/л; pH 6,8–7,2. Культивирование осуществляли при температуре $30,0 \pm 2,0^\circ C$ в колбах на качалке ($180,0 \pm 10,0$ об./мин; 44 ч), лабораторных ферментерах АНКУМ–10М (1,0 л воздуха/л среды·мин; $180,0 \pm 10,0$ об./мин; 32 ч) и в опытно-промышленном ферментере BIOFLO 5000 120L (1,0 л воздуха/л среды·мин; $120,0 \pm 10,0$ об./мин; 32 ч). Норма внесения посевного материала (20-часового) – 2,0 или 5,0 об.%.

Тест-объектами для определения антагонистической активности отобранных культур служили штаммы фитопатогенных грибов родов *Alternaria*, *Arthrrium*, *Epicoccum*, *Fusarium* и фитопатогенных бактерий родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, полученные из рабочей коллекции лаборатории биологического контроля фитопатогенных микроорганизмов ГНПО «Химический синтез и биотехнологии» и Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

Культуры фитопатогенных бактерий выращивали в мясо-пептонном бульоне в колбах Эрленмейера на качалке ($180,0 \pm 10,0$ об./мин) при температуре $30,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч, фитопатогенных грибов – в картофельно-глюкозном бульоне или бульоне Хоттингера в колбах Эрленмейера на качалке ($140,0 \pm 10,0$ об./мин) при температуре $24,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ в течение 44 ± 2 ч.

Выделение и отбор бактерий, обладающих антимикробной, целлюлолитической, фосфатмобилизующей и азотфиксирующей активностями проводили с использованием методов, описанных в работах Возняковской (1987), Нетрусова (2005), Megazyme (2012), Jayadi (2013), Умарова (1976). Видовую идентификацию бактерий проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии MALDI-TOF MS и анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК.

Геномную ДНК бактерий выделяли с помощью набора реактивов Bacteria DNA Preparation Kit («Jena Bioscience GmbH», Германия), концентрацию и степень очистки нуклеиновых кислот определяли с помощью спектрофотометра NanoPhotometer P-Class P 330 (Implen, Германия). Компьютерную обработку результатов секвенирования выполняли с помощью программы eSeq Version 3.1 (Li-COR Biosciences). Используя базу данных Национального центра биотехнологической информации США (НЦБИ), с помощью программы BLASTN 2.16.0 осуществляли анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК.

Для выявления в хромосомах изучаемых штаммов генов, ответственных за антимикробную и ростостимулирующую активности, были использованы специфические праймеры (*dhbC* – 1034 п.н., *dhbE* – 759 п.н., *phyC* – 697 п.н., *trpA* – 509 п.н. и *trpB* – 862 п.н.), описанные в работах (Бережная, 2019; Qinlan, 2023; Deng, 2021; Gond, 2015). Амплификацию осуществляли в термоциклере Bio-Rad T100 (США). Для извлечения антимикробных метаболитов липопептидной природы использовали бесклеточную КЖ бактерий и метод осаждения (Liu, 2016) с последующей экстракцией (хлороформ:метанол:вода в соотношении 8:1:1). Для количественного анализа липопептидов использовали метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим и УФ-детекторами.

Морфологические и физиолого-биохимические признаки бактерий изучали по общепринятым методам (Нетрусов, 2005).

Протеиназную активность бактерий определяли по ГОСТ Р 53974–2010, α -амилазную – ГОСТ Р 54330–2011, фитазную – ГОСТ 31487–2012,

эндо-1,4-β-ксиланазную и эндо-1,4-β-глюканазную – фотометрически (Mangan, 2018), содержание индолилуксусной кислоты (ИУК) и продукцию сидерофоров по методам, описанным (Рамезанпур, 2009) и (Sujatha, 2013) соответственно.

Оптимизацию режима хранения жидкой формы препарата проводили при температуре 4,0°C, 15°C и 22,0°C. Стабильность основных характеристик и свойств препарата микробного «Биопродуктин» исследовали через каждые 3 месяца в процессе 12-месячного хранения с применением стабилизирующих добавок (бензоата натрия, сорбата калия, хлорида натрия, аскорбиновой и молочной кислот, гумата калия). В качестве контроля использовали нативную культуральную жидкость (КЖ) без добавок.

Исследование биологической и хозяйственной эффективности препарата микробного «Биопродуктин» проводили совместно с сотрудниками УО «Гродненский государственный аграрный университет» в условиях опытного поля, а регистрационные испытания эффективности препарата – совместно с сотрудниками РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» на базе СПК им. Деньщикова Гродненского района, Гродненской области. Препарат вносили сразу после уборки ярового ячменя с последующей заделкой луцильником, а также по вегетирующим растениям озимой тритикале в фазу кущения в норме расхода 3 л/га.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Excel 2016 (Тюрин, 2003) и Statistica for Windows, v. 10.0. Расчеты проводили на основании данных, полученных в результате трех независимых повторов с учетом стандартного отклонения. С помощью t-критерия устанавливали достоверность различия средних величин с уровнем статистической значимости $p < 0,05$.

Отбор и характеристика высокоактивных штаммов бактерий с комплексом агрономически ценных свойств

Из различных образцов почвы с растительными остатками выделено более 300 бактериальных изолятов, из которых отобраны четыре (А-145, 1, 61 и 7), обладающие взаимодополняющими свойствами – антагонистической, ферментативной (эндо-1,4-β-глюканаза, эндо-1,4-β-ксиланаза, протеиназа, α-амилаза), азотфиксирующей или фосфатмобилизующей активностями. Установлено, что исследуемые изоляты представляют собой грамположительные спорообразующие палочки, продуцируют оксидазу, каталазу, активно разжижают желатин, утилизируют цитрат, малонат, гидролизуют крахмал и казеин, редуцируют нитраты до нитритов, растут на МПА в присутствии хлорида натрия от 2,0 до 7,0%, продуцируют индолилуксусную кислоту и сидерофоры [2–А, 8–А, 12–А].

По совокупности морфологических, культуральных и физиолого-биохимических характеристик выделенные бактерии отнесены к роду *Bacillus*.

При проведении идентификации выделенных культур методами времяпролетной масс-спектрометрии MALDI-TOF MS и анализа нуклеотидных последовательностей 16S рРНК установлено, что штаммы бактерий относятся к видам *B. amyloliquefaciens* (1 и А-145), *B. mojavensis* (61) и *B. megaterium* (7). Исследуемые бактерии не являются патогенными, токсичными, токсигенными и депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов как *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д и *B. megaterium* БИМ В-1269 Д соответственно. В связи с изменениями в таксономии бактерий рода *Bacillus* родовое название *Bacillus megaterium* изменено на *Priestia megaterium*.

С помощью ПЦР-анализа в геномах штаммов бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д выявлены гены, ответственные за синтез антимикробных метаболитов: *baeB* (бациллен) – размер ПЦР-продукта 860 п.н., *dhbACE* (бациллибактин) – 846, 1034 и 759 п.н. соответственно, *bmyD* (бацилломицин) – 723 п.н., *dfnA* (диффицидин) – 887 п.н., *fenA* (фенгицин) – 903 п.н., *mlnA* (макролактин) – 1077 п.н., *srfAA* (сурфактин) – 1131 п.н., *ituABD* (итурин) – 885, 874 и 647 п.н. соответственно [7–А]. Проведенные лабораторные исследования подтвердили высокую антимикробную активность указанных культур к широкому спектру фитопатогенных микроорганизмов, в том числе к грибам родов *Episcoccum*, *Arthrimum*, *Alternaria* и *Fusarium*, вызывающим корневые гнили зерновых культур, поражение листового аппарата, альтернариоз и фузариоз колоса и зерна [1-А, 14–А].

В геномах всех отобранных бактерий выявлены гены *trpAB*, кодирующие предшественник индолилуксусной кислоты (ИУК) [7–А, 9–А]. Продукция ИУК штаммами в количественном выражении составила 10,7; 22,0; 10,2 и 68,0 мкг/мл КЖ *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д и *P. megaterium* БИМ В-1269 Д соответственно. В модельных опытах показано, что стимулирующий эффект исследуемых культур на развитие корневой системы редиса (сорт *Рудольф*) составил, в зависимости от штамма, от 14,8 до 82,7%, овса (сорт *Запавет*) – от 11,4 до 51,4%.

Азотфиксирующую активность проявляли только штаммы бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д и *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д ($52,1 \pm 0,36$ и $84,9 \pm 0,14$ нМ C_2H_4 соответственно) [7–А].

Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования отобранных штаммов бактерий в качестве основы микробного препарата комплексного действия с фитозащитным и ростстимулирующим эффектом.

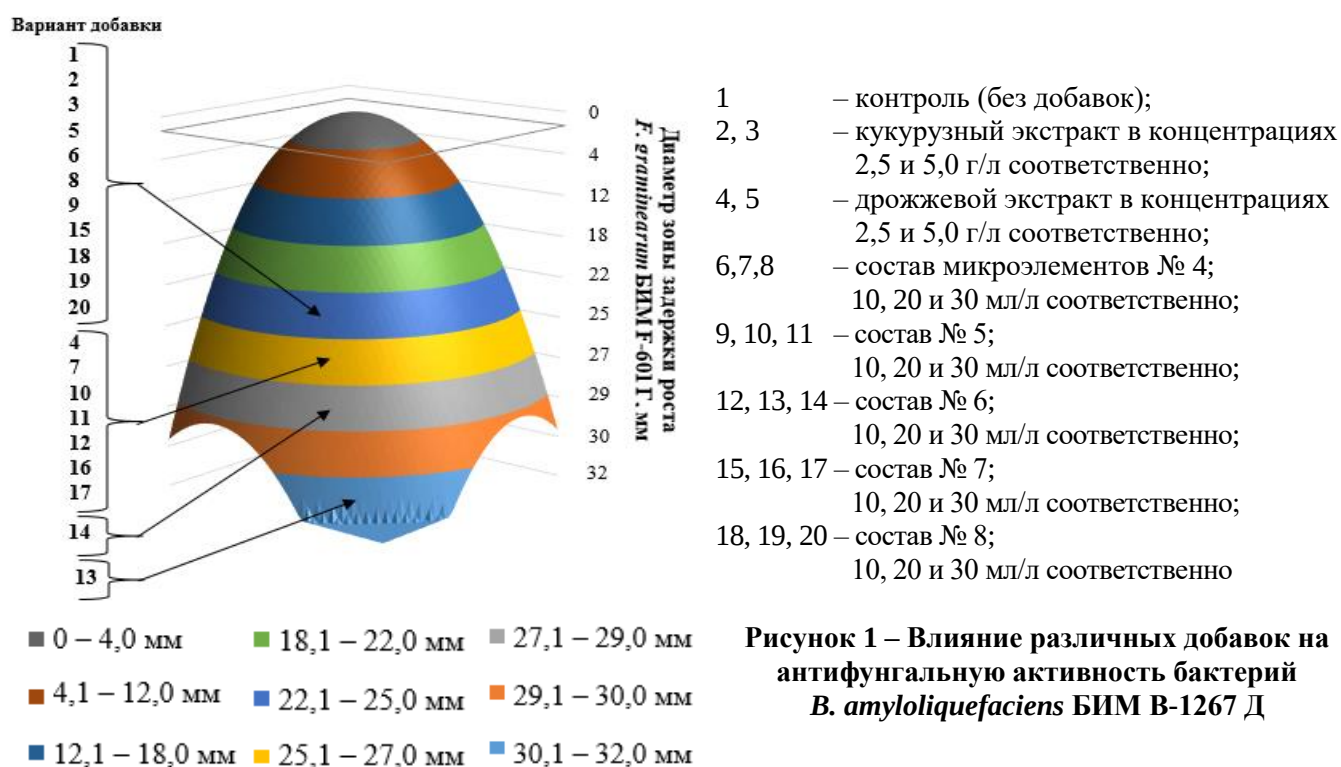
Оптимизация условий культивирования отобранных штаммов бактерий

Разработка технологии получения микробного препарата «Биопродуктин» в жидкой форме включала оптимизацию состава питательной среды и параметров

культивирования отобранных штаммов бактерий.

В качестве базовой питательной среды использовали модифицированную среду Мейнелла (г/л): меласса – 30,0; $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 7,0; KH_2PO_4 – 3,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,5; Na-цитрат – 0,5; pH 6,8–7,2. В качестве добавок использованы кукурузный и дрожжевой экстракты (в концентрациях 2,5 и 5,0 г/л), а также разные по составу растворы микроэлементов (мг/л дистиллированной воды): $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 10,0; $CuSO_4 \times 7H_2O$ – 100,0; $MnSO_4 \times 2H_2O$ – 10,0 (раствор № 4); $CoCl_2$ – 2,0; $MnCl_2 \times 4H_2O$ – 1,6 (раствор № 5); $MnCl_2 \times 4H_2O$ – 10,0; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 5,0; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 10,0 (раствор № 6); $CoCl_2$ – 46,0; $MnSO_4 \times 2H_2O$ – 30,0 (раствор № 7); $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ – 200,0; $MnSO_4 \times 2H_2O$ – 235,0; H_3BO_3 – 280,0; $CuSO_4 \times 5H_2O$ – 8,0; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 24,0 (раствор № 8). Растворы микроэлементов вносили в концентрации 10, 20 и 30 г/л.

Согласно результатам проведенных экспериментов, добавление в питательную среду микроэлементов состава № 6 в концентрации 20 мл/л, что в пересчете соответствует содержанию в среде $MnCl_2 \times 4H_2O$ – 0,2 мг/л; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1 мг/л; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2 мг/л, обеспечивает наиболее высокие показатели антифунгальной активности (диаметр зоны задержки роста гриба *F. graminearum* БИМ F-601 Г бактериями *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д составляет 30,4 мм, рисунок 1). На показатели ферментативной и азотфиксирующей активностей вносимые добавки существенного влияния не оказывали.



При изучении влияния отдельного и совместного внесения различных микроэлементов состава № 6 на антифунгальную активность бактерий-антагонистов установлено, что добавление $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ не оказывало стимулирующего эффекта, а внесение $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ и $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ приводило к повышению антагонистической активности в среднем на 12,0–17,3% и 4,1–10,0% соответственно. Наибольший эффект оказывает смесь микроэлементов $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ и $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, обеспечивающая увеличение антифунгальной активности бактерий-антагонистов на 21,0–23,8% [6–А].

На основании полученных данных подобрана питательная среда для культивирования бактерий следующего состава (г/л): меласса – 30,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 7,0; KH_2PO_4 – 3,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,5; Na-цитрат – 0,5; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 мг/л; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 мг/л; pH 6,8–7,2.

На примере бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д установлено, что использование оптимизированной питательной среды способствует повышению содержания липопептидов семейств сурфактина и фенгицина в культуральной жидкости – сурфактина В (С14) на 53,2%, сурфактина С (С15) на 15,6%, фенгицина А (С16) на 18,9%, фенгицина А (С17) на 20,0%, по сравнению с контрольной средой.

Исследовано влияние стадии роста посевного материала, полученного в течение 12 ч (вегетативные клетки), 20 ч (вегетативные клетки и споры) и 44 ч культивирования (споры) на титр КОЕ и биологическую активность бактерий. Норма внесения инокулята составляла 2,0; 5,0 и 7,0 об.%. На примере штамма *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 показано, что наиболее высокие показатели титра клеток $(2,27 \pm 0,24) \cdot 10^9$ КОЕ/мл и антагонистической активности (зона задержки роста фитопатогенного гриба *F. graminearum* БИМ F-601 Г – 28,8 мм) достигались при внесении 20-часового посевного материала в концентрации 5,0 и 7,0 об.% (исходя из экономической целесообразности для дальнейших исследований отобрана концентрация 5,0 об.%). Аналогичные результаты были получены для всех отобранных культур. Вместе с тем, качество и количество вносимого посевного материала не оказывало существенного влияния на целлюлолитическую и азотфиксирующую активность КЖ исследуемых бактерий.

Оптимальными условиями роста бактерий при выращивании в колбах на качалке являются температура 30°C, pH-среды 7,0–7,5 и продолжительность ферментации 44 ч [5–А]. Исследование совместного и отдельного глубинного культивирования штаммов бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *P. megaterium* БИМ В-1269 Д, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д показало, что выращивание монокультур позволяет обеспечить более высокую продуктивность ферментационного процесса. Последующее смешивание КЖ монокультур в соотношении 1:1:1:1 позволяет получить препарат микробный «Биопродуктин» с высоким титром и биологической активностью [6–А].

Показано, что в результате хранения микробного препарата «Биопродуктин» при различных температурных режимах (от +4 до +15°C) титр клеток и антифунгальная активность сохраняются в течение 6 месяцев. Использование в составе биопрепарата в качестве стабилизатора гумата калия в концентрации 2,0 об.% обеспечило сохранность всех его биологических свойств в течение 1 года [1–А, 4–А, 6–А, 10–А, 11–А, 13–А].

Разработка технологии получения препарата микробного «Биопродуктин»

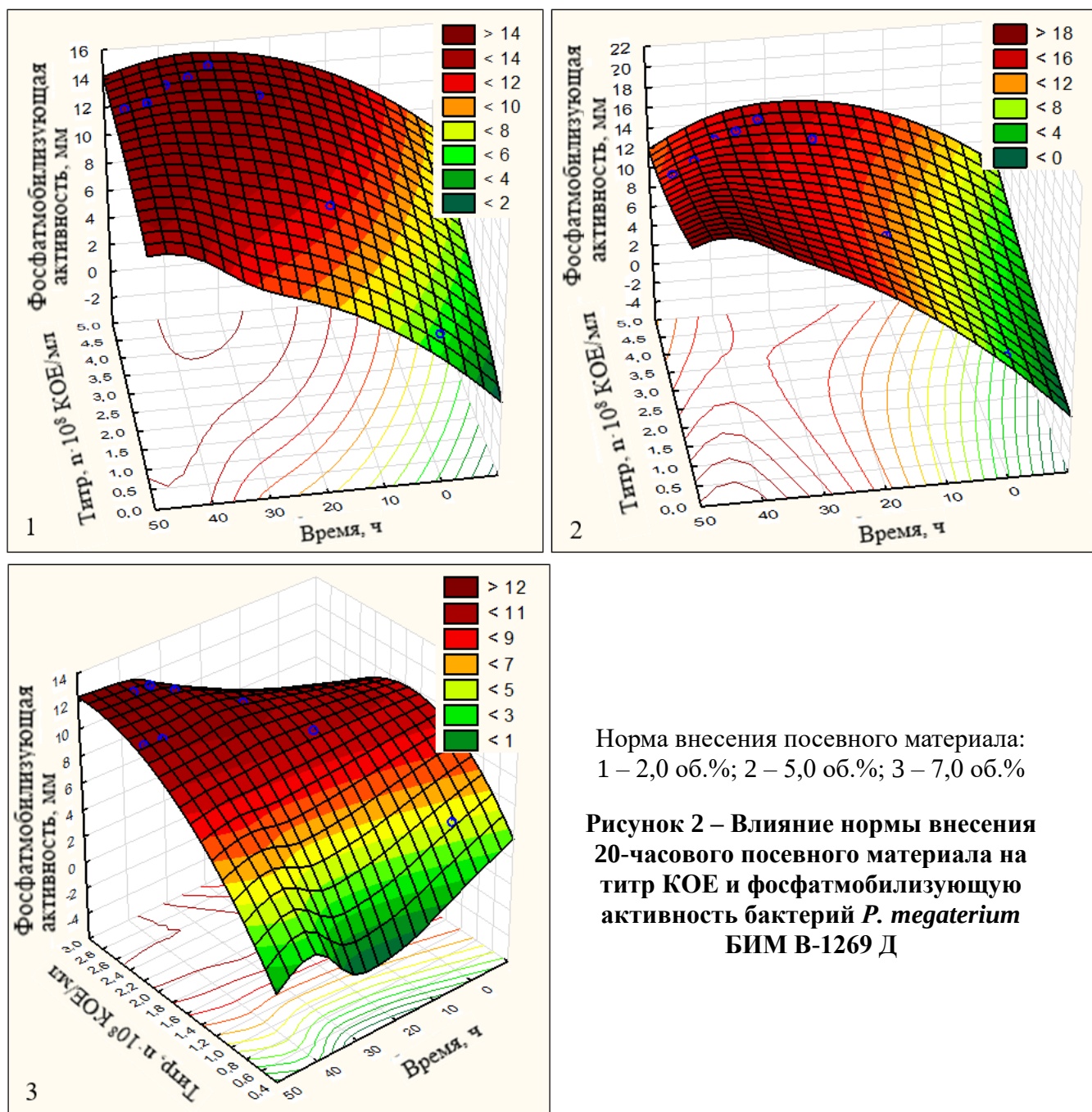
Разработка лабораторной технологии получения жидкой формы препарата микробного «Биопродуктин» предусматривала отдельное культивирование бактерий в ферментере АНКУМ–10М на оптимизированной питательной среде при норме внесения 20-часового посевного материала 2,0–7,0 об.%, интенсивности аэрации 0,5–1,5 л воздуха/л среды·мин, скорости перемешивания 50–240 об./мин, продолжительности выращивания 16–48 ч и температуре 30°C.

Установлено, что максимальный титр КОЕ и биологическая активность исследуемых культур достигались при скорости перемешивания среды 180,0 об./мин, интенсивности аэрации 1,0 л воздуха/л среды·мин и норме внесения 20-часового инокулята бактерий в концентрации 2,0 об.%. Оптимальная продолжительность выращивания составила 32 ч.

При масштабировании лабораторной технологии получения жидкого препарата микробного «Биопродуктин» в ферментере BIOFLO 5000 120L наиболее высокие показатели титра КОЕ исследуемых бактерий, антагонистической и фосфатмобилизующей активностей достигались при скорости перемешивания среды 120,0 об./мин, интенсивности аэрации 1,0 л воздуха/л среды·мин, норме внесения 20-часового инокулята 2,0 об.% и продолжительности выращивания 32 ч. Полученные результаты представлены на рисунке 2 на примере штамма *P. megaterium* БИМ В-1269 Д [5–А, 6–А].

Технология получения препарата в лабораторном и опытно-промышленном ферментере позволила при низкой норме внесения посевного материала (2,0 об.%) и более короткой продолжительности ферментации (32 ч) по сравнению с выращиванием в колбах на качалке (44 ч, норма посевного материала 5,0 об.%) получить продукт с высоким титром КОЕ и биологической активностью, стоимость которого составила 15,50 рублей (с НДС) за 1 л, что ниже стоимости известных отечественных и зарубежных аналогов («Profit® Защита почвы Aqua», «Profit® ПочвоУлучшитель Aqua», «Profit® АнтиСтерня Aqua» – ООО «ПрофитГарден», РБ; «Биокомпозит-Коррект», АО «Щелково Агрохим», РФ) в среднем в 1,3–1,8 раза.

По результатам исследований разработаны технические условия (ТУ ВУ 100289066.154-2018), лабораторный (ЛР–4/2018) и опытно-промышленный (ОПР–1/2020) регламенты на производство препарата микробного «Биопродуктин».



Норма внесения посевного материала:
1 – 2,0 об.%; 2 – 5,0 об.%; 3 – 7,0 об.%

Рисунок 2 – Влияние нормы внесения 20-часового посевного материала на титр КОЕ и фосфатмобилизующую активность бактерий *P. megaterium* БИМ В-1269 Д

Характеристика препарата микробного «Биопродуктин»

Согласно проведенным регистрационным испытаниям на озимой тритикале препарат микробный «Биопродуктин» характеризуется высокой биологической эффективностью против корневых гнилей, которая по данным 2019–2020 гг. составила 8,1–41,3% в опытах с отчуждением соломы, 19,8–36,4% – с измельчением соломы и 21,6–56,0% – с измельчением соломы и дополнительным внесением компенсационной дозы азота [1–А, 3–А, 6–А, 10–А].

Хозяйственная эффективность препарата обеспечивалась прибавкой урожайности зерна на 4,6–6,1 ц/га, улучшением его качества (повышенное до 20,4% содержание клейковины) и образованием дополнительных продуктивных стеблей

(в опытах с отчуждением соломы и с измельчением соломы с дополнительным внесением компенсационной дозы азота соответственно на 32–36 шт./м² и 18–19 шт./м² больше, чем в контрольном варианте) [6–А]. Установлено, что двукратное применение препарата микробного «Биопродуктин» (до посева и по вегетации) в условиях опытных и паровых деленок на фоне стандартных агротехнических приемов приводило к увеличению в почве численности аммонифицирующих микроорганизмов в 2,2–4,9 раза, азотфиксирующих – в 3,1–6,5 раза, фосфатмобилизующих – в 3,1–6,8 раза и целлюлолитических – в 2,8–10,1 раза по отношению к контролю (деленки без обработки препаратом).

Препарат микробный «Биопродуктин» не обладает фитотоксичностью, не токсичен для медоносных пчел и водных организмов, зарегистрирован и включен в «Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь» на тритикале озимой.

Технология получения препарата микробного «Биопродуктин» внедрена в опытно-промышленное производство Института микробиологии НАН Беларуси, ГНПО «Химический синтез и биотехнологии» и государственного предприятия «Бобруйский завод биотехнологий». Экономическая эффективность от применения препарата микробного «Биопродуктин», произведенного и реализованного в объеме 6 207 л, за период 2021–2024 гг. составила 1 139 140,21 руб./ 355 777,73 долл. США.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

При выполнении диссертационной работы проведены исследования по разработке технологии получения препарата микробного «Биопродуктин» для повышения биологической активности почвы, улучшения фитосанитарного состояния посевов и повышения продуктивности зерновых культур и получены следующие результаты:

1. При проведении скрининга из более 300 бактериальных изолятов отобраны и идентифицированы 3 штамма бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д, характеризующиеся высокой антимикробной, азотфиксирующей и целлюлолитической активностями, а также штамм бактерий *P. megaterium* БИМ В-1269 Д с фосфатмобилизующей активностью. Все отобранные штаммы не являются патогенными и токсигенными, способны оказывать регулирующее воздействие на состав микробоценозов, контролировать развитие фитопатогенных микроорганизмов, стимулировать рост и развитие растений, что в совокупности обуславливает перспективность их применения в растениеводстве для повышения продуктивности тритикале озимой [2–А, 7–А, 8–А, 9–А, 12–А, 14–А].

2. В геномах бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д выявлены гены, ответственные за синтез биологически активных соединений с антимикробным действием (*baeB* (бациллин), *dhbACE* (бациллибактин), *bmyD* (бацилломицин), *dfnA* (диффицидин), *fenA* (фенгицин), *mlnA* (макролактин), *srfAA* (сурфактин), *ituABD* (итурин). Кроме того, геномы всех исследуемых культур содержат гены триптофана (*trpAB*), кодирующие предшественник индолилуксусной кислоты. Ростстимулирующая активность исследуемых культур подтверждена биохимическими методами [7–А, 9–А].

3. Оптимизирован состав питательной среды для выращивания бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д и *P. megaterium* БИМ В-1269 Д – основы препарата микробного «Биопродуктин». Показано, что внесение смеси микроэлементов $MnCl_2 \times 4H_2O$ и $ZnSO_4 \times 7H_2O$ в концентрации 0,2 мг/л в модифицированную среду Мейнелла позволяет повысить антагонистическую активность бактерий-антагонистов на 21,0–23,8%. Подобраны оптимальные условия выращивания штаммов бактерий в колбах на качалке – температура 30°C, pH питательной среды 7,0–7,5, норма внесения 20-часового посевного материала 5,0 об.%, продолжительность ферментации 44 ч. Установлено, что раздельное глубинное культивирование бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *P. megaterium* БИМ В-1269 Д, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д с последующим смешиванием КЖ монокультур в соотношении 1:1:1:1 позволяет получить препарат микробный «Биопродуктин» с высоким титром $(3,1 \pm 0,11) \cdot 10^9$ КОЕ/мл и биологической активностью. Внесение гумата калия (2,0 об.%) в состав препарата обеспечивает повышение его ростстимулирующей активности и стабильность целевых показателей в течение 1 года [1–А, 4–А, 5–А, 6–А, 10–А, 11–А, 13–А].

4. Разработана лабораторная и опытно-промышленная технология получения препарата микробного «Биопродуктин». Оптимальные условия для развития бактерий и продукции целевых метаболитов в лабораторных ферментерах достигались при температуре 30,0°C, pH питательной среды 7,0–7,5, интенсивности аэрации 1,0 л воздуха/л среды·мин, скорости вращения мешалки 180,0 об./мин, норме внесения 20-часового посевного материала 2,0 об.% и продолжительности ферментационного процесса 32 ч. В опытно-промышленных условиях наиболее высокие показатели титра и биологической активности препарата достигались при тех же условиях, что и в лабораторном ферментере, за исключением скорости перемешивания (120 об./мин вместо 180 об./мин) [5–А, 6–А].

5. Показано, что препарат микробный «Биопродуктин» обладает способностью подавлять рост широкого спектра фитопатогенных микроорганизмов – возбудителей болезней тритикале. Полученные результаты подтверждены регистрационными испытаниями, согласно которым биологическая эффективность препарата

микробного «Биопродуктин» против корневых гнилей на посевах озимой тритикале по данным 2019–2020 гг. составила 8,1–41,3% в опытах с отчуждением соломы, 19,8–36,4% – с измельчением соломы и 21,6–56,0% – с измельчением соломы и дополнительным внесением компенсационной дозы азота. Хозяйственная эффективность препарата обеспечивалась прибавкой урожайности зерна на 4,6–6,1 ц/га, улучшением его качества (повышенное до 20,4% содержание клейковины) и образованием дополнительных продуктивных стеблей (в опытах с отчуждением соломы и с измельчением соломы с дополнительным внесением компенсационной дозы азота соответственно на 32–36 шт./м² и 18–19 шт./м² больше, чем в контрольном варианте) [1–А, 3–А, 6–А, 10–А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

К практическому использованию рекомендуются штаммы бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *P. megaterium* БИМ В-1269 Д, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д с взаимодополняющими свойствами (высокой антимикробной, целлюлолитической, азотфиксирующей, фосфатмобилизующей и фитостимулирующей активностями) и разработанный на их основе препарат микробный «Биопродуктин», предназначенный для улучшения фитосанитарного состояния посевов и повышения продуктивности зерновых культур.

Разработанные лабораторный и опытно-промышленный регламенты на производство препарата микробного «Биопродуктин» (ЛР–4/2018 от 10.09.2018 и ОПР-1/2020 от 09.06.2020, ведомость изменений № 1 к ОПР-1/2020 от 10.08.2023), технические условия на препарат микробный «Биопродуктин» ТУ ВУ 100289066.154-2018 от 26.11.2018 явились основой для освоения технологии получения препарата и организации его опытно-промышленного производства в Институте микробиологии НАН Беларуси, ГНПО «Химический синтез и биотехнологии» и государственном предприятии «Бобруйский завод биотехнологий».

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых изданиях:

1–А. Характеристика микробного консорциума – основы биопрепарата комплексного действия для повышения продуктивности зерновых культур / **Е. Ю. Шмыга**, М. Н. Мандрик-Литвинкович, В. Н. Купцов, А. В. Сидоренко, Э. И. Коломиец // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / НАН Беларуси [и др.] ; редкол.: Э. И. Коломиец (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2019. – Т. 11. – С. 333–342.

2–А. Функции бактерий *Bacillus megaterium* БИМ В-1269 в составе микробного препарата комплексного действия / **Е. Ю. Шмыга**, Н. И. Гирилович, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Э. И. Коломиец // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / НАН Беларуси [и др.] ; редкол.: Э. И. Коломиец (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2020. – Т. 12. – С. 281–290.

3–А. Влияние микробного препарата Биопродуктин на биологическую активность почвы, фитосанитарное состояние и продуктивность посевов тритикале озимого / А. В. Свиридов, Э. И. Коломиец, О. Ч. Коженевский, М. Н. Мандрик, А. А. Дудук, **Е. Ю. Шмыга** // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сб. науч. тр. / Гродн. гос. аграр. ун-т ; под ред. В. К. Пестиса. – Гродно, 2020. – Т. 51 : Агрономия. – С. 140–150.

4–А. **Шмыга, Е. Ю.** Влияние стабилизирующих добавок на биологическую активность микробного препарата «Биопродуктин» / **Е. Ю. Шмыга**, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Э. И. Коломиец // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / НАН Беларуси [и др.] ; редкол.: Э. И. Коломиец (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2021. – Т. 13. – С. 244–253.

5–А. **Шмыга, Е. Ю.** Оптимизация питательной среды и условий культивирования бактерий, составляющих основу микробного препарата «Биопродуктин» / **Е. Ю. Шмыга**, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Э. И. Коломиец // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / НАН Беларуси [и др.] ; редкол.: Э. И. Коломиец (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2022. – Т. 14. – С. 283–291.

6–А. Технология получения препарата микробного «Биопродуктин» в жидкой и сухой товарных формах / **Е. Ю. Шмыга**, Н. И. Гирилович, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Э. И. Коломиец // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / НАН Беларуси [и др.] ; редкол.: А. И. Зинченко (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2023. – Т. 15. – С. 354–369.

7–А. **Шмыга, Е. Ю.** Физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика бактерий, составляющих основу препарата микробного «Биопродуктин» / **Е. Ю. Шмыга**, А. А. Муратова, Э. И. Коломиец // Весці НАН Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2023. – Т. 68, № 3. – С. 213–223.

Статьи в сборниках научных трудов:

8–А. Шмыга, Е. Ю. Выделение и характеристика бактерий – основы комплексного микробного препарата для защиты от болезней и повышения продуктивности зерновых культур / Е. Ю. Шмыга // Магистерский вестник : сб. науч. работ магистрантов и аспирантов : в 3 ч. / Ин-т подгот. науч. кадров НАН Беларуси ; редкол.: М. Г. Жилинский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2018. – Ч. 2 : Естественные и технические науки. – С. 152–161.

Материалы конференций:

9–А. Белявцева, К. В. Характеристика бактерий рода *Bacillus* – перспективных агентов биологического контроля патогенов растений / К. В. Белявцева, Е. Ю. Шмыга, А. В. Сидоренко // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : материалы XI Междунар. науч. конф., Минск, 3–6 июня 2019 г. / НАН Беларуси [и др.] ; орг. ком. конф.: Э. И. Коломиец(пред.) [и др.]. – Минск, 2019. – С. 14–15.

10–А. Консорциум микроорганизмов – основа комплексного микробного препарата для защиты от болезней и повышения продуктивности зерновых культур / Е. Ю. Шмыга, М. Н. Мандрик-Литвинкович, В. Н. Купцов, А. В. Сидоренко, Э. И. Коломиец // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : материалы XI Междунар. науч. конф., Минск, 3–6 июня 2019 г. / НАН Беларуси [и др.] ; орг. ком. конф.: Э. И. Коломиец (пред.) [и др.]. – Минск, 2019. – С. 197–198.

11–А. Шмыга, Е. Ю. Влияние стабилизирующих добавок на жизнеспособность бактерий рода *Bacillus* – основы препарата микробного «Биопродуктин» / Е. Ю. Шмыга, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Э. И. Коломиец // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы XII Междунар. науч. конф., посвящ. 55-летию Ин-та микробиологии НАН Беларуси, Минск, 7–11 июня 2021 г. / НАН Беларуси [и др.] ; орг. ком. конф.: Э. И. Коломиец (пред.) [и др.]. – Минск, 2021. –С. 170–171.

Тезисы докладов:

12–А. Селекция и характеристика бактерий – основы комплексного микробного препарата для повышения продуктивности зерновых культур / Е. Ю. Шмыга, М. Н. Мандрик-Литвинкович, В. Н. Купцов, А. В. Сидоренко, Э. И. Коломиец // Молодежь в науке – 2018 : тез. докл. XV Междунар. науч. конф. молодых ученых, Минск, 29 окт. – 1 нояб. 2018 г. / НАН Беларуси. – Минск, 2018. – С. 69.

13–А. Биологическая эффективность комплексного микробного препарата против корневых гнилей злаков в модельных и полевых опытах / Е. Ю. Шмыга, А. В. Сидоренко, А. В. Свиридов, О. Ч. Корженевский, М. Н. Мандрик-

Литвинкович, В. Н. Купцов, Э. И. Коломиец // Сборник тезисов : Вторая Междунар. науч. конф. PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», Саратов, 5–9 окт. 2020 г. / Сарат. гос. аграр. ун-т [и др.] ; под ред.: И. А. Тихонович (отв. ред.) [и др.]. – [Саратов], 2020. – С. 224.

14–А. **Шмыга, Е. Ю.** Характеристика фитопатогенных грибов – возбудителей заболеваний зерновых культур / **Е. Ю. Шмыга**, В. Н. Купцов, М. Н. Мандрик-Литвинкович // Молодежь в науке – 2023 : тез. докл. XX Междунар. науч. конф. молодых ученых : аграрные, биологические, гуманитарные науки и искусства, медицинские, физико-математические, физико-технические, химия и науки о Земле, Минск, 20–22 сент. 2023 г. / НАН Беларуси, Совет молодых ученых ; редкол.: В. Г. Гусаков (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2023. – С. 253–254.

РЭЗЮМЭ

ШМЫГА КАЦЯРЫНА ЮР'ЕЎНА

БІЯТЭХНАЛАГІЧНЫЯ АСНОВЫ СТВАРЭННЯ КОМПЛЕКСНАГА МІКРОБНАГА ПРЕПАРАТА ДЛЯ ПАЛЯПШЭННЯ ФІТАСАЊІТАРНАГА СТАНУ ПАСЕВАЎ І ПАВЫШЭННЯ ПРАДУКТЫЙНАСЦІ ЗЕРНЕВЫХ КУЛЬТУР

Ключавыя словы: бактэрыі роду *Bacillus* і *Priestia*, комплексны мікробны прэпарат, антымікробная актыўнасць, біялагічная і гаспадарчая эфектыўнасць, зерневыя культуры.

Мэта даследавання: выдзяленне, селекцыя і характарыстыка штамаў спораўтваральных бактэрыяў з комплексам аграбіялагічна каштоўных уласцівасцяў і распрацоўка на іх аснове тэхналогіі атрымання прэпарата мікробнага «Біяпрадуктын» для кантролю ўзбуджальнікаў хвароб і павышэння прадуктыўнасці зерневых культур.

Метады даследаванняў: мікрабіялагічныя, малекулярна-генетычныя, біяхімічныя.

Выкарыстаная апаратура: светлавы мікраскоп XJS500 («Kozo Optic», Кітай), градыентны ДНК-ампліфікатар Bio-Rad T100 (ЗША), часпалётны MALDI TOF мас-спектрометр (Германія), ферментатар BIOFLO 5000 120L (ЗША) і інш.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Выдзелены, адабраны, вывучаны, ідэнтыфікаваны і дэпанаваны ў Беларускай калекцыі непатагенных мікраарганізмаў штамы бактэрыяў *Bacillus amyloliquefaciens* БІМ В-1267 Д, *Bacillus mojavensis* БІМ В-1268 Д, *Bacillus amyloliquefaciens* БІМ В-1270 Д і *Priestia megaterium* БІМ В-1269 Д, якія валодаюць узаемадапаўняльнымі ўласцівасцямі, на іх аснове створаны прэпарат мікробны «Біяпрадуктын» з комплекснай антымікробнай, азотфіксавальнай, цэлюлазітычнай і фасфатмобілізуючай актыўнасцямі. Устаноўлены высокі фітаахоўны патэнцыял доследных бактэрыяў, пацверджаны наяўнасцю ў іх геномах генаў, адказных за сінтэз біялагічна актыўных злучэнняў з антымікробным дзеяннем (*baeB*, *dhbACE*, *bmyD*, *dfnA*, *fenA*, *mfnA*, *srfAA*, *ituABD*). Аптымальныя ўмовы росту і назапашвання мэтавых метабалітаў бактэрыямі *B. amyloliquefaciens* БІМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БІМ В-1268 Д, *P. megaterium* БІМ В-1269 Д і *B. amyloliquefaciens* БІМ В-1270 Д дасягаюцца пры унясенні ў склад пажыўнага асяроддзя сумесі мікраэлементаў $MnCl_2 \times 4H_2O$ і $ZnSO_4 \times 7H_2O$ у канцэнтрацыі 0,2 мг/л, норме пасяўнога матэрыялу – 2,0 аб.%, інтэнсіўнасці аэрацыі – 1,0 л паветра/л асяроддзя·хвіл і хуткасці перамешвання – 120 аб./хвіл. Распрацаваны лабараторная і доследна-прамысловая тэхналогіі атрымання прэпарата мікробнага «Біяпрадуктын».

Рэкамендацыі па выкарыстанні: прэпарат мікробны «Біяпрадуктын» комплекснага дзеяння прызначаны для паляпшэння фітасанітарнага стану пасеваў і павышэння прадуктыўнасці зерневых культур.

Галіна прымянення: мікрабіялогія, біятэхналогія, раслінаводства, сельская гаспадарка.

РЕЗЮМЕ

ШМЫГА ЕКАТЕРИНА ЮРЬЕВНА

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ КОМПЛЕКСНОГО МИКРОБНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ФИТОСАНИТАРНОГО СОСТОЯНИЯ ПОСЕВОВ И ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus* и *Priestia*, комплексный микробный препарат, антимикробная активность, биологическая и хозяйственная эффективность, зерновые культуры.

Цель исследования: выделение, отбор и характеристика штаммов спорообразующих бактерий с комплексом агрономически ценных свойств и разработка на их основе технологии получения препарата микробного «Биопродуктин» для контроля возбудителей болезней и повышения продуктивности зерновых культур.

Методы исследований: микробиологические, молекулярно-генетические, биохимические.

Использованная аппаратура: световой микроскоп XJS500 («Kozo Optic», Китай), градиентный ДНК-амплификатор Bio-Rad T100 (США), времяпролетный MALDI TOF масс-спектрометр (Германия), ферментер BIOFLO 5000 120L (США) и др.

Полученные результаты и их новизна. Выделены, отобраны, изучены, идентифицированы и депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов штаммы бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *Bacillus mojavensis* БИМ В-1268 Д, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д и *Priestia megaterium* БИМ В-1269 Д, обладающие взаимодополняющими свойствами, на их основе создан препарат микробный «Биопродуктин» с комплексной антимикробной, азотфиксирующей, целлюлолитической и фосфатмобилизующей активностями. Установлен высокий фитозащитный потенциал исследуемых бактерий и подтвержден наличием в их геномах генов, ответственных за синтез биологически активных соединений с антимикробным действием (*baeB*, *dhbACE*, *bmyD*, *dfnA*, *fenA*, *mlnA*, *srfAA*, *ituABD*). Оптимальные условия роста и накопления целевых метаболитов бактериями *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *P. megaterium* БИМ В-1269 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д достигаются при внесении в состав питательной среды смеси микроэлементов $MnCl_2 \times 4H_2O$ и $ZnSO_4 \times 7H_2O$ в концентрации 0,2 мг/л, норме посевного материала – 2,0 об.%, интенсивности аэрации – 1,0 л воздуха/л среды·мин и скорости вращения мешалки – 120 об./мин. Разработаны лабораторная и опытно-промышленная технологии получения препарата микробного «Биопродуктин».

Рекомендации по использованию: препарат микробный «Биопродуктин» комплексного действия предназначен для улучшения фитосанитарного состояния посевов и повышения продуктивности зерновых культур.

Область применения: микробиология, биотехнология, растениеводство, сельское хозяйство.

SUMMARY

SHMYGA EKATERINA YURYEVNA

BIOTECHNOLOGICAL PRINCIPLES OF CREATING A COMPREHENSIVE MICROBIAL PREPARATION TO IMPROVE THE PHYTOSANITARY CONDITION OF CROPS AND INCREASE THE PRODUCTIVITY OF GRAIN CROPS

Keywords: bacteria of genus *Bacillus* and *Priestia*, complex microbial preparation, antimicrobial activity, biological and economic efficiency, grain crops.

Purpose of the research: isolation, selection and characterization of strains of spore-forming bacteria with a complex of agronomically valuable properties and the development on their basis of a technology for obtaining the microbial preparation «Bioproductin» for controlling pathogens and increasing the productivity of grain crops.

Research methods: microbiological, molecular-genetic, biochemical.

Equipment used: light microscope XJS500 («Kozo Optic», China), gradient DNA amplifier Bio-Rad T100 (USA), time-of-flight MALDI TOF mass spectrometer (Germany), fermenter BIOFLO 5000 120L (USA), etc.

The results obtained and their novelty. Bacterial strains *Bacillus amyloliquefaciens* BIM B-1267 D, *Bacillus mojavensis* BIM B-1268 D, *Bacillus amyloliquefaciens* BIM B-1270 D and *Priestia megaterium* BIM B-1269 D with complementary properties were isolated, isolated, identified, deposited in the Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms and studied, and a microbial preparation was created on their basis «Bioproductin» with complex antimicrobial, nitrogen-fixing, cellulolytic and phosphate-mobilizing activities. The high phytoprotective potential of the studied bacteria has been established and confirmed by the presence in their genomes of genes responsible for the synthesis of biologically active compounds with antimicrobial action (*baeB*, *dhbACE*, *bmyD*, *dfnA*, *fenA*, *mlnA*, *srfAA*, *ituABD*). Optimal conditions for the growth and accumulation of target metabolites by the bacteria *B. amyloliquefaciens* BIM B-1267 D, *B. mojavensis* BIM B-1268 D, *P. megaterium* BIM B-1269 D and *B. amyloliquefaciens* BIM B-1270 D are achieved when added to the nutrient medium a mixture of microelements $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ and $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ at a concentration of 0.2 mg/l, seed rate – 2.0 vol.%, aeration intensity – 1.0 l of air/l of medium·min and mixer rotation speed – 120 vol./min. A laboratory and pilot-industrial technology for obtaining the microbial preparation «Bioproductin» has been developed.

Recommendations for usage: microbial preparation «Bioproductin» of complex action is intended to improve the phytosanitary condition of crops and increase the productivity of grain crops.

Area of application: microbiology, biotechnology, plant production, agriculture.

Подписано в печать 21.03.2025 Формат 60х84_{1/16} Бумага офсетная
Печать цифровая Усл.печ.л. 1,3 Уч.изд.л. 1,4 Тираж 60 экз. Заказ 7356
ИООО «Право и экономика» 220072 Минск Сурганова 1, корп. 2 Тел. 8 029 684 18 66
Отпечатано на издательской системе Gestetner в ИООО «Право и экономика»
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий, выданное
Министерством информации Республики Беларусь 17 февраля 2014 г.
в качестве издателя печатных изданий за № 1/185