



УДК 632.937.15

<https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.35.61>

Влияние состава питательной среды на рост и антифунгальную активность бактерий р. *Bacillus* – основы экспериментальных образцов биофунгицидов для экологизированной системы защиты растений

А. И. Хомяк, Н. А. Жевнова, А. М. Асатулова

Федеральный научный центр биологической защиты растений, г. Краснодар, Россия
E-mail: НотуакА187@mail.ru

Аннотация. Представлены результаты исследований влияния состава питательной среды для культивирования бактерий р. *Bacillus*. Проведены сравнения стандартных микробиологических сред и оптимизированной питательной среды по таким критериям, как количество колониеобразующих единиц в жидкой культуре и антифунгальная активность в отношении тест-культуры гриба *F. graminearum*. Установлено положительное влияние экспериментальных образцов биофунгицидов, полученных с применением оптимизированной питательной среды, на рост и развитие растений озимой пшеницы на фоне искусственного заражения в условиях климатической камеры.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, питательная среда, антифунгальная активность, ростостимулирующий эффект, *F. graminearum*.

Для цитирования: Хомяк А. И., Жевнова Н. А., Асатулова А. М. Влияние состава питательной среды на рост и антифунгальную активность бактерий р. *Bacillus* – основы экспериментальных образцов биофунгицидов для экологизированной системы защиты растений // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2021. Т. 35. С. 61–73. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.35.61>

Введение

Традиционная защита зерновых культур с использованием химического метода часто оказывается экологически небезопасной, а нередко и недостаточно эффективной [Донник, Воронин, 2016]. При использовании химических средств происходит загрязнение почвы остаточными количествами пестицидов и развитие устойчивых к пестицидам вредных организмов, отмечается опасность загрязнения продукции и водных источников агрохимикатами. Кроме того, ряд препаратов с широким спектром действия обладает побочным воздействием на группы почвенных микроорганизмов [Овсянников, 2017; Новикова, 2019]. При определённых экологических и физико-химических условиях развития микробиоты почвы средства химизации могут вызывать побочные негативные действия на популяции микроорганизмов в агроценозах, выражающиеся в снижении их общей численности, группового и видового разнообразия, распаде экологических ассоциаций [Горьков, 2019].

В связи с этим актуальным является развитие концепции экологизированной защиты растений, позволяющей приблизить условия существования почвы и растений в агроценозах к условиям, характерным для естественных сообществ [Бакиров, 2019]. Концепция предполагает использование безопасных средств и методов защиты растений [Ямалиева, 2015; Strategies for feeding ..., 2017]. Одним из таких методов является применение биопрепаратов на основе бактерий-антагонистов [Plant growth-promoting ... , 2018].

Целью настоящего исследования является подбор состава оптимизированной питательной среды для культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 и оценка влияния состава питательной среды на количество колониеобразующих единиц (количество жизнеспособных клеток), антифунгальную и ростостимулирующую активность жидких культур на основе исследуемых штаммов.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили новые штаммы-продуценты экспериментальных образцов биофунгицидов для защиты озимой пшеницы от экономически значимых болезней *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 из биоресурсной коллекции «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» ВНИИБЗР и тест-культура фитопатогенного гриба *Fusarium graminearum* Schwabe.

В исследованиях использована материально-техническая база УНУ «Технологическая линия для получения микробиологических средств защиты растений нового поколения» ВНИИБЗР (№ 671367).

Жидкую культуру (ЖК) на основе экспериментальных образцов штаммов-продуцентов биофунгицидов получали в условиях периодического культивирования. Инкубацию осуществляли в термостатированных системах культивации клеток Excella E25 (New Brunswick Scientific, США) при 180 об./мин на оптимизированной питательной среде. Периодическое культивирование осуществляли в конических колбах (350 мл) с объёмом питательной среды 100 мл и предварительным внесением посевной (маточной) культуры (2,0 % от объёма питательной среды). Маточную культуру получали методом внесения агаризованных блоков с исследуемыми штаммами в конические колбы и последующим культивированием [Асатурова, 2008].

Пробы подвергали анализу по критериям антифунгальной активности и количества колониеобразующих единиц (КОЕ). Антифунгальную активность штаммов определяли методом двойных (встречных) культур [Ваксман, 1947; Егоров, 1957] на картофельно-глюкозной среде (КГА), агаризованной среде Кинга В (КВ) и агаризованной оптимизированной среде (ОС) (ориг.). Тесты проводили в чашках Петри (ЧП).

Определение числа клеток осуществляли методом Коха [Нетрусов, Егорова, Захарчук, 2005]. Подсчёт выросших колоний осуществляли с использованием системы автоматического подсчёта колоний Color QCount (Spiral Biotech, США).

Определение биологической эффективности и пределов влияния экспериментальных образцов биофунгицидов на биометрические показатели растений осуществляли на фоне искусственного заражения семян озимой пшеницы сорта Батько грибом *F. graminearum* в условиях камеры непрерывного роста растений KWWF 720 (Binder GmbH, Германия) при температуре 24 °С, влажности 65 % и освещённости 5000 люкс.

Для опыта использовали прокалённый и просеянный песок, смешанный с инфекционным порошком фузариума в соотношении 1:60.

Семена обрабатывали ЖК экспериментальных образцов биофунгицидов ручным способом, расход рабочего раствора из расчёта 10 л/т. ЖК экспериментальных образцов были получены на картофельно-глюкозной среде (КГС), среде КВ и ОС. В качестве химического эталона использовали фунгицид «Кинто Дуо, КС» (триконазол 20 г/л + прохлораз 60 г/л) (BASF SE, Германия) с нормой расхода 2,5 л/т, в качестве биологического эталона – биопрепарат «Фитоспорин-М, Ж» (*B. subtilis*, 26Д) (БашИнком, Россия) с нормой расхода 1 л/т. Тестовые нормы расхода экспериментальных образцов как элементы технологии применения новых биофунгицидов, относятся к объектам, охраняемым в режиме коммерческой тайны ФГБНУ ВНИИБЗР¹.

Для достоверной оценки защитного действия семена, обработанные ЖК экспериментальных образцов биофунгицидов, перед посевом предварительно проращивали в ЧП в течение трёх дней. Проклюнувшиеся семена высевали в стаканы по 30 шт. в каждый, повторность опыта трёхкратная. На 15-е сутки инкубирования в климатической камере корни проросших растений отмывали и проводили учёт поражения корневыми гнилями согласно шкале [Методические указания ..., 2009].

Статистическая обработка данных выполнена с использованием метода сравнения по критерию Дункана с помощью программы STATISTICA 10.

Результаты и обсуждение

Одной из основных трудностей при разработке биопрепаратов для защиты растений является подбор условий культивирования для штаммов бактерий-антагонистов. Разработка рентабельных и эффективных питательных сред для агентов биологического контроля имеет решающее значение на стадии производства биопрепаратов. Основная цель оптимизации процесса заключается в максимальном увеличении количества клеток микроорганизмов в сочетании с высоким уровнем синтеза метаболитов [Optimization of *Bacillus aerius* ..., 2017].

На основании результатов исследований по определению оптимальных условий культивирования штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 [Conditions for the cultivation ..., 2015] были подобраны первые образцы оригинальных оптимизированных питательных сред. В качестве контроля использованы питательные среды КВ, на которой выделенные из природных источников исследуемые биоагенты активно растут и проявляют высокую

¹ Об информации, составляющей коммерческую тайну института (ноу-хау) : приказ ГНУ ВНИИБЗР Россельхозакадемии № 21-п от 9 июня 2012 г.

антифунгальную активность, и КГС. В ходе исследований установлено, что количество колониеобразующих единиц ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g на ОС оказалось значительно выше, чем на средах КВ и КГС и составило $(8,7 \pm 0,66) \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл. Для штамма *B. subtilis* BZR 517 оптимизированная питательная среда также оказалась более предпочтительной по данному критерию по сравнению со стандартными: титр ЖК составил $(7,2 \pm 0,42) \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл (табл. 1). Такая закономерность вызвана тем, что в состав ОС входят компоненты, являющиеся вторичными продуктами производства, содержащими в своем составе не только доступные сахара, но и органические безазотистые вещества, а также макро- и микроэлементы.

Таблица 1

Показатели роста штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на различных питательных средах в условиях периодического культивирования

Питательная среда	Титр ЖК, КОЕ/мл	
	<i>B. subtilis</i> BZR 336g	<i>B. subtilis</i> BZR 517
КВ	$(5,7 \pm 0,06) \cdot 10^7$ ^a	$(3,7 \pm 0,14) \cdot 10^8$ ^a
КГС	$(1,3 \pm 0,14) \cdot 10^8$ ^a	$(1,8 \pm 0,07) \cdot 10^8$ ^a
ОС	$(8,7 \pm 0,66) \cdot 10^{10}$ ^b	$(7,2 \pm 0,42) \cdot 10^{10}$ ^b

Примечание: между вариантами, обозначенными одинаковыми индексами ^{a, b}, при сравнении в пределах столбцов отсутствуют статистически достоверные различия по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности.

Известно, что для разработки биотехнологий получения биофунгицидов комплексного действия необходимо получение ЖК с оптимальным количеством микробных клеток в сочетании с высокой концентрацией антифунгальных веществ. Поэтому на следующем этапе осуществлены исследования антифунгальной активности штаммов-продуцентов биофунгицидов на различных питательных средах.

Многими исследователями отмечена прямая зависимость между условиями культивирования штаммов бактерий рода *Bacillus* и уровнем антифунгальной активности в отношении возбудителей болезней сельскохозяйственных культур [Optimization of antifungal ... , 2014; Improvement of antifungal ... , 2016; Microbial metabolomics ... , 2019].

В наших исследованиях отмечено, что для штамма *B. subtilis* BZR 336g максимальная антифунгальная активность была зафиксирована на оптимизированной питательной среде и составляла 90,0 % на пятые сутки, 83,6 % на десятые сутки и 78,2 % на пятнадцатые сутки. На КГА и среде КВ степень ингибирования патогена увеличивалась до десятых суток инкубации, но оставалась значительно ниже, чем в варианте с оптимизированной средой. К пятнадцатым суткам антифунгальная активность на указанных средах начала снижаться (рис. 1, А). Эти результаты могут быть связаны с увеличением синтеза антифунгальных метаболитов при изменении компонентов питательной среды (предшественники и т. д.) [Enhanced production ... , 2020]. Так, низкие концентрации фунгицинов не оказывают какого-либо влияния на клеточные стенки, в то время как высокие концентрации вызы-

вают образование крупных пор, из-за чего теряется способность удерживать содержимое клеток [Соколова, Глинушкин, 2017].

При этом важно отметить, что только на оптимизированной среде данный штамм обладал высокой подвижностью – уже на пятые сутки совместной инкубации биоагент занял всю площадь питательной среды, блокируя рост патогена (рис. 2, 2с).

Степень ингибирования *F. graminearum* в варианте со штаммом *B. subtilis* BZR 517 к десятым суткам увеличивалась на всех питательных средах, однако существенной разницы по антифунгальной активности, как в варианте со штаммом *B. subtilis* BZR 336g, выявлено не было. Тем не менее, как и в случае со штаммом *B. subtilis* BZR 336g, *B. subtilis* BZR 517 на оптимизированной среде обладал более высокой подвижностью (рис. 1, Б).

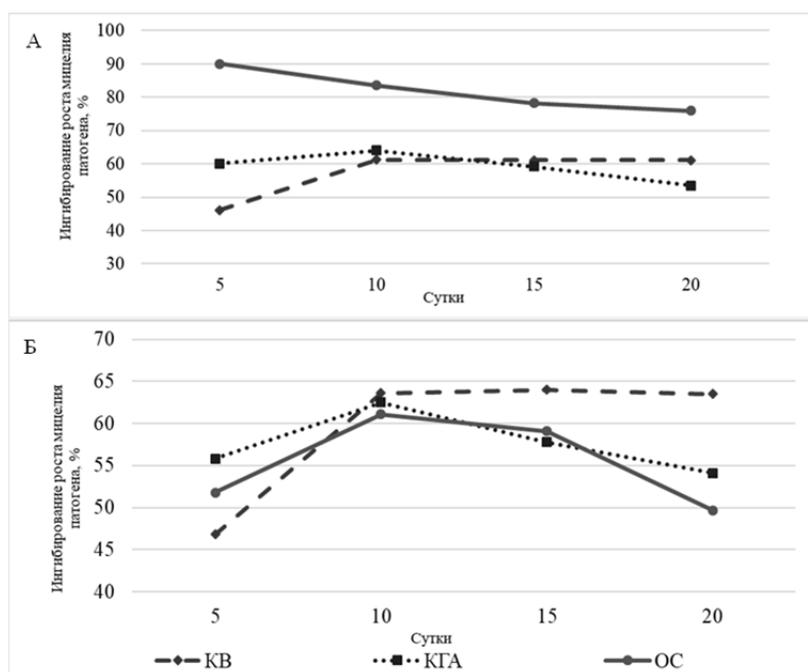


Рис. 1. Характеристика антифунгальной активности штаммов *B. subtilis* в отношении *F. graminearum*: А – BZR 336g; Б – BZR 517

Кроме того, среди особенностей воздействия метаболитов активных штаммов бактерий на *F. graminearum* необходимо отметить следующее: в зоне антагонистического действия бактерий в некоторых вариантах наблюдался лизис уже сформировавшегося мицелия, ингибирование роста и изменение окраски мицелия патогена (см. рис. 2, 2с). Подобные изменения вызваны активным синтезом антибиотических соединений и хитинолитических ферментов (хитиназы, протеазы), способных разрушать клеточные стенки и лизировать гифы грибов [Стимулирующие рост растений ... , 2015].

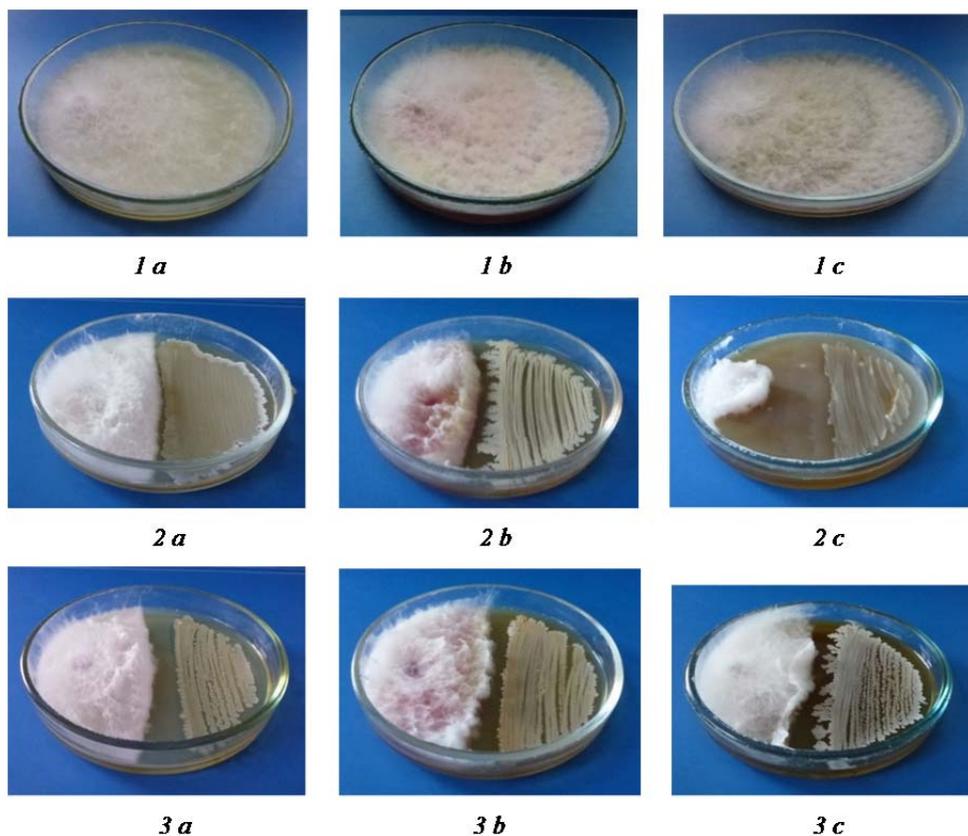


Рис. 2. Антифунгальное действие штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 в отношении *F. graminearum* на различных питательных средах. *a* – KB; *b* – KGA; *c* – OC; 1 – контроль (чистая культура *F. graminearum* без антагониста); 2 – двойная культура *F. graminearum* и *B. subtilis* BZR 336g; 3 – двойная культура *F. graminearum* и *B. subtilis* BZR 517

Многими авторами отмечено положительное влияние предпосевной обработки семян препаратами на основе бактерий рода *Bacillus* [Seed biopriming ... , 2016; Effect of seed ..., 2019]. Обработка семян озимой пшеницы экспериментальными образцами биофунгицидов на фоне искусственного заражения (развитие в контроле 64,8 %, распространение 100 %) обеспечивала высокую биологическую эффективность: от 35,4 до 60,8 %. При этом эффективность химического эталона Кинто Дуо, КС составила 38,9 %, а биологического эталона Фитоспорин-М – 28,9 % (табл. 2). Важно отметить, что в вариантах с тремя различными питательными средами экспериментальные образцы на основе штамма *B. subtilis* BZR 517 обеспечивали одинаково эффективную защиту семян и проростков озимой пшеницы: 35,0 % в варианте с KGS и 37,0 % в вариантах с KB и OC.

Таблица 2

Биологическая эффективность экспериментальных образцов биофунгицидов, полученных на различных питательных средах, на фоне искусственного заражения грибом *F. graminearum* в условиях климатической камеры

Опытный вариант	Всхожесть, %	Биологическая эффективность, %
Контроль без инфекции	98,9 ^c	
Контроль + инфекция	68,9 ^{abc}	100/68,4*
«Кинто Дуо, КС», химический эталон, 2,5 л/т	85,6 ^{abc}	38,9 ^a
«Фитоспорин-М, Ж», биологический эталон, 2 л/т	76,7 ^{abc}	28,9 ^{ab}
КВ		
<i>B. subtilis</i> BZR 336g	74,4 ^{abc}	26,9 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 517	94,4 ^c	37,1 ^{ab}
КГС		
<i>B. subtilis</i> BZR 336g	61,1 ^{ab}	31,3 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> BZR 517	87,8 ^{bc}	35,4 ^{ab}
ОС		
<i>B. subtilis</i> BZR 336g	92,2 ^{bc}	24,7 ^a
<i>B. subtilis</i> BZR 517	98,9 ^c	37,0 ^{ab}

Примечание: * – развитие (*R*, %) / распространение (*P*, %) заболевания; между вариантами, обозначенными одинаковыми индексами ^{a-c}, при сравнении в пределах столбцов отсутствуют статистически достоверные различия по критерию Дункана при 95%-м уровне вероятности.

В большинстве опытных вариантов отмечено также положительное влияние на всхожесть семян. В основном экспериментальные образцы биофунгицидов, обеспечивающие высокую биологическую эффективность, демонстрировали аналогичный результат в отношении всхожести семян. Важно отметить, что всхожесть семян в варианте с обработкой биофунгицидом на основе ОС была в среднем на 20–30 % выше, чем в вариантах со стандартными средами, что также свидетельствует об эффективности защиты семян от фузариоза.

На следующем этапе были проведены исследования влияния экспериментальных образцов биофунгицидов на рост и развитие проростков озимой пшеницы (табл. 3).

Обработка семян экспериментальными образцами биофунгицидов, полученных на различных питательных средах, показала статистически достоверное увеличение биометрических параметров проростков озимой пшеницы: увеличение длины побега от 17,0 до 25,4 % (КГС), от 15,2 до 22,3 % (КВ), от 15,9 до 30,2 % (ОС), длины корня от 23,8 до 37,3 % (КГС), от 28,3 до 39,6 % (КВ), от 19,5 до 22,6 % (ОС), массы побега до 16,9 % (КГС). Высокие показатели были получены при применении КГС и ОС. Такие результаты обусловлены способностью штаммов бактерий рода *Bacillus* как непосредственно стимулировать рост растений за счёт синтеза регуляторов роста (ауксины), так и опосредованно влиять на рост растений за счёт синтеза антибиотиков, биосурфактантов и сидерофоров, подавляющих рост и развитие фитопатогенов [Стимулирующие рост растений ... , 2015].

Таблица 3

Влияние экспериментальных образцов биофунгицидов, полученных на различных питательных средах, на рост и развитие растений озимой пшеницы на фоне искусственного заражения грибом *F. graminearum*

Опытный вариант	Прирост массы побега, %	Прирост массы корня, %	Прирост длины побега, %	Прирост длины корня, %
«Кинто Дуо, КС», химический эталон,	0	15,5	0	20,8
«Фитоспорин-М, Ж», биологический эталон	0,33	0	26,8	1,3
КВ				
<i>B. subtilis</i> BZR 336g	0	0	6,0	39,6
<i>B. subtilis</i> BZR 517	0	0	15,2	8,9
КГС				
<i>B. subtilis</i> BZR 336g	21,4	10,3	17,0	1,7
<i>B. subtilis</i> BZR 517	24,9	20,4	25,6	37,3
ОС				
<i>B. subtilis</i> BZR 336g	5,2	13,4	15,9	19,5
<i>B. subtilis</i> BZR 517	0,08	0	20,5	0

По результатам опыта на искусственном инфекционном фоне было отмечено положительное влияние на длину и массу побега растений (рис. 3).

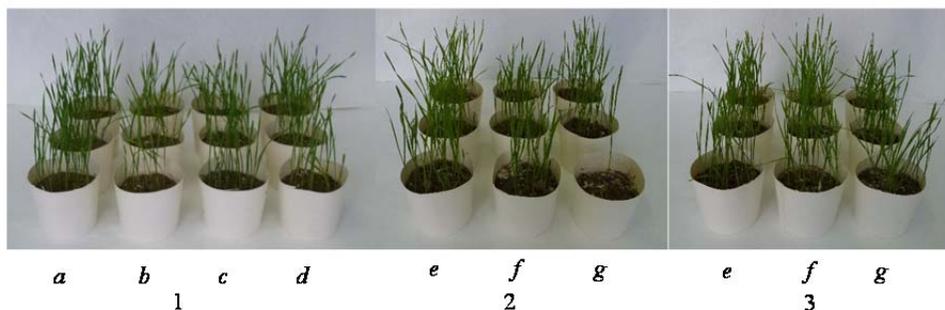


Рис. 3. Ростостимулирующее действие экспериментальных образцов биофунгицидов, полученных на различных питательных средах, на фоне искусственного заражения грибом *F. graminearum* в условиях климатической камеры. 1а – контроль без инфекции; 1б – контроль с инфекцией; 1с – «Кинто Дуо, КС», химический эталон; 1д – «Фитоспорин-М, Ж», биологический эталон; 2 – *B. subtilis* BZR 336g; 3 – *B. subtilis* BZR 517; е – варианты с применением ОС; ф – варианты с применением КВ; г – варианты с применением КГА

Отмечено, что для вариантов с использованием оптимизированной среды характерно более интенсивное увеличение роста и развития побега растений озимой пшеницы, более дружные и выровненные всходы.

Заключение

В результате исследований установлено, что количество КОЕ и антифунгальная активность в ЖК экспериментальных образцов биофунгицидов, полученных на оптимизированной среде, оказалась выше, чем на стандартных питательных средах. Отмечено, что предпосевная обработка семян ЖК экспериментальных образцов биофунгицидов, полученных на оптимизированной среде, обеспечивала достоверное увеличение всхожести семян, а также биологическую эффективность против фузариозной корневой гнили на уровне химического эталона в условиях климатической камеры на фоне искусственного заражения.

Исследования выполнены в рамках госзадания № 075-00376-19-00 Минобрнауки РФ в рамках НИР по теме № 0686-2019-0013.

Список литературы

- Асатурова А. М. Изучение кинетики роста штаммов бактерий-антагонистов возбудителей фузариоза при периодическом культивировании // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК. 2008. Вып. 1 (138). С. 79–82.
- Бакиров Ф. Г. Экологизация обработки почвы в Оренбуржье // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2019. № 6 (80). С. 77–80.
- Ваксман З. А. Антагонизм микробов и антибиотические вещества. М. : Гос. изд-во иностр. лит., 1947. 391 с.
- Горьков А. А. Агробиологическое обоснование применения биопрепаратов для озимой пшеницы // Вестник ОрелГАУ. 2019. № 5 (80). С. 133–139.
- Донник И. М., Воронин Б. А. Производство органической сельскохозяйственной продукции как одно из важнейших направлений развития АПК // Аграрный вестник Урала. 2016. № 1 (143). С. 77–81.
- Егоров Н. С. Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности. М. : Изд-во Моск. ун-та, 1957. 78 с.
- Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве / ред. В. И. Долженко. СПб. : ВИЗР, 2009. 379 с.
- Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. Практикум по микробиологии. М. : Академия, 2005. 608 с.
- Новикова И. И. Полифункциональные биопрепараты для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем в биологическом земледелии // Технологии и технические средства механизированного производства продукции растениеводства и животноводства. 2019. № 2 (99). С. 183–194. <https://doi.org/10.24411/0131-5226-2019-10162>
- Овсянников Ю. А. Производство полноценных продуктов питания на основе эколого-биосферного земледелия // Аграрный вестник Урала. 2017. № 12-2 (167). С. 8–11.
- Соколова Г. Д., Глинушкин А. П. Антагонисты фитопатогенного гриба *Fusarium graminearum* // Микология и фитопатология. 2017. Т. 51, № 4. С. 191–201.
- Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам / И. В. Максимов, С. В. Веселова, Т. В. Нужная, Е. Р. Сарварова, Р. М. Хайруллин // Физиология растений. 2015. Т. 62, № 6. С. 763–775.
- Ямалиева А. М. Экологически безопасные технологии защиты зерновых культур // Вестник Марийского государственного университета. Серия: Сельскохозяйственные науки. Экономические науки. 2015. № 1. С. 37–39.
- Conditions for the cultivation of new *Bacillus* bacteria being micro bioproduct producers / A. M. Asaturova, A. I. Homyak, N. S. Tomashevich, M. D. Pavlova, N. A. Zhevnova, V. M. Dubyaga, A. Ye. Kozitsin, T. M. Sidorova, V. D. Nadykta, V. Ya. Ismailov // J. Pure and Appl. Microbiol. 2015. Vol. 9, N 4. P. 2797–2804.

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

Enhanced production of iturin A in *Bacillus amyloliquefaciens* by genetic engineering and medium optimization / Y. Xu, D. Cai, H. Zhang, L. Gao, Y. Yang, J. Gao, Y. Yang, J. Gao, Y. Li, C. Yang, Z. Ji, J. Yu, S. Chen // *Proc. Biochem.* 2020. N 90. P. 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.017>

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

Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides / I. Horak, G. Engelbrecht, P. J. Jansen van Rensburg, S. Claassens // *J. Appl. Microbiol.* 2019. Vol. 127, N 2. P. 326–343. <https://doi.org/10.1111/jam.14218>

Optimization of antifungal lipopeptide production from *Bacillus* sp. BH072 by response surface methodology / X. Zhao, Y. Han, X. Q. Tan, J. Wang, Z. J. Zhou // *J. Microbiol.* 2014. Vol. 52, N 4. P. 324–332. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3354-3>

Optimization of *Bacillus aerius* strain JS-786 cell dry mass and its antifungal activity against *Botrytis cinerea* using response surface methodology / J. Shafi, J. Mingshan, Q. Zhiqiu, L. Xiuwei, G. Zumin, L. Xinghai, Z. Yang, Q. Peiwen, T. Hongzhe, C. Wunan, W. Kai // *Arc. Biol. Sci.* 2017. Vol. 69, N 3. P. 469–480. <https://doi.org/10.2298/ABS160421122S>

Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture / R. Backer, J. S. Rokem, G. Ilangumaran, J. Lamont, D. Praslickova, E. Ricci, S. Subramanian, D. L. Smith // *Front. Plant Sci.* 2018. Vol. 9. P. 1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>

Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review / A. Mahmood, O. C. Turgay, M. Farooq, R. Hayat // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2016. Vol. 92, N 8, fiw112. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw112>

Strategies for feeding the world more sustainably with organic agriculture / A. Muller, Ch. Schade, N. El-Hage Scialabba, J. Brüggemann, A. Isensee, K.-H. Erb, P. Smith, P. Klocke, F. Leiber, M. Stolze, U. Niggli // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8, N 1. P. 1–13. <http://doi.org/10.1038/s41467-017-01410-w>

Effect of the Nutrient Medium Composition on the Growth and Antifungal Activity of *Bacillus* Bacteria Used as the Basis of Experimental Biofungicides for the Green Plant Protection System

A. I. Homyak, N. A. Zhevnova, A. M. Asaturova

All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. The article presents the results of the studies of the influence of the nutrient medium composition for the cultivation of *Bacillus* bacteria. We compared standard microbiological media and optimized nutrient medium according to criteria such as the number of colony forming units in liquid culture and antifungal activity against the test culture of *F. graminearum* fungus. It was noted that the number of colony forming units of LC based on the *B. subtilis* BZR 336g strain on the optimized medium turned out to be significantly higher than on King B

media and potato-glucose medium and amounted to $(8.7 \pm 0.66) \times 10^{10}$ CFU/ml, for *B. subtilis* BZR 517 strain titer on an optimized medium was $(7.2 \pm 0.42) \times 10^{10}$ CFU/ml. Antifungal activity on an optimized nutrient medium for *B. subtilis* BZR 336g was strain 83.5%, for *B. subtilis* BZR 517 strain – 61.1%. We found the positive effect of experimental samples of biofungicides obtained with the help of an optimized nutrient medium on the growth and development of winter wheat plants against the background of artificial infection in a climatic chamber. The treatment of winter wheat seeds with experimental samples of biofungicides ensured biological efficiency from 35.4% to 60.8% with the efficiency of the Kinto Duo chemical standard, KS 38.9%, Fitosporin-M biological standard – 28.9%. It was noted that seed germination in the variant with biofungicide treatment based on the optimized medium was 20-30% higher than in the variants with standard media. Seed treatment with experimental samples of biofungicides obtained on various nutrient media showed a statistically significant increase in the biometric parameters of winter wheat seedlings.

Keywords: *Bacillus subtilis*, nutrient medium, antifungal activity, growth-stimulating effect, *F. graminearum*.

For citation: Homyak A.I., Zhevnova N.A., Asaturova A.M. Effect of the Nutrient Medium Composition on the Growth and Antifungal Activity of *Bacillus* Bacteria Used as the Basis of Experimental Biofungicides for the Green Plant Protection System. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2021, vol. 35, pp. 61-73. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.35.61> (in Russian)

References

- Asaturova A.M. Izucheniye kinetiki rosta shtammov bakterii- antagonistov vzbuditelei fuzarioza pri periodicheskom kultivirovanii [The study of the kinetics of the growth of strains of bacteria-antagonists of the causative agents of fusarium during periodic cultivation]. *Maslichnye kultury. Nauchno-tehnicheskii byulleten VNIIMK* [Oil Crops. Sci. Bul. Inst. Oil Crops], 2008, no. 1 (138), pp. 79-82. (in Russian)
- Bakirov F.G. Ekologizatsiya obrabotki pochvy v Orenburzhie [Greening soil treatment in the Orenburg region]. *Bull. Oryol St. Agr. Univ.*, 2019, no. 80, pp. 77-80. (in Russian)
- Vaksman Z.A. *Antagonizm mikrobov i antibioticheskie veshchestva* [Microbial antagonism and antibiotic substances]. Moscow, State Publ. house of Foreign Literature, 1947, 391 p. (in Russian)
- Gor'kov A.A. Agrobiologicheskoe obosnovanie primeneniya biopreparatov dlya ozimoi pshenitsy [Agrobiological substantiation of the use of biological products for winter wheat]. *Bull. Oryol St. Agr. Univ.*, 2019, no. 5 (80), pp. 133-139. (in Russian)
- Donnik I.M., Voronin B.A. Proizvodstvo organicheskoi sel'skokhozyaistvennoi produktsii kak odno iz vazh-neishikh napravlenii razvitiya APK [Organic agricultural production as one of the most important areas of agricultural development]. *Agrarnyi vestnik Urala* [Ural Agr. Bul.], 2016, no. 1 (143), pp. 77-81. (in Russian)
- Egorov N.S. *Vydelenie mikrobov-antagonistov i biologicheskie metody ucheta ikh antibioticheskoi aktivnosti* [Isolation of antagonist microbes and biological methods for accounting for their antibiotic activity]. Moscow, Moscow St. Univ. Publ., 1957, 78 p. (in Russian)
- Metodicheskie ukazaniya po registratsionnym ispytaniyam fungitsidov v sel'skom khozyaistve* [Guidelines for registration testing of fungicides in agriculture]. Ed. by Dolzhenko V.I. St-Petersburg, Inst. Plant Prot. Publ., 2009, 280 p. (in Russian)
- Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. *Praktikum po mikrobiologii* [Workshop on Microbiology]. Moscow, Akademiya Publ., 2005, 608 p. (in Russian)
- Novikova I.I. Polifunktsional'nye biopreparaty dlya fitosanitarnoi optimizatsii agroekosistem v biologicheskom zemledelii [Multifunctional biological products for phytosanitary optimization of agroecosystems in biological farming]. *Tekhnologii i tekhnicheskie sredstva mekhanizirovannogo proizvodstva produktsii rastenievodstva i zhivotnovodstva* [Technologies and technical means for mechanized crop and livestock production]. 2019, no. 2 (99), pp. 183-194. (in Russian)

Ovsyannikov Yu.A. Proizvodstvo polnotsennykh produktov pitaniya na osnove ekologo-biosfernogo zemledeliya [Production of high-grade food products based on ecological-biosphere farming]. *Agrarnyi vestnik Urala* [Ural Agr. Bul.], 2017, no. 12-2 (167), pp. 8-11. (in Russian)

Sokolova G.D., Glinyshkin A.P. Antagonisty fitopatogenного гриба *Fusarium graminearum* [Antagonists of the phytopathogenic fungus *Fusarium graminearum*]. *Mycol. Phytopathol.*, 2017, vol. 51, no. 4, pp. 191-201. (in Russian)

Maksimov I.V., Veselova S.V., Nyzhnaia T.V., Sarvarova E.R., Khairyllin R.M. Stimuliruyushchiye rost rasteniy bakterii v regulyatsii ustoychivosti rasteniy k stresso-vym faktoram [Bacteria stimulating plant growth in the regulation of plant resistance to stress factors]. *Plant Physiol.*, 2015, vol. 62, no. 6, pp. 763-775. (in Russian)

Yamalieva A.M. Ekologicheski bezopasnye tekhnologii zashchity zernovykh kultur [Environmentally friendly crop protection technology]. *Bul. Mary St. Univ. Ser. Agric. Sci. Econ. Sci.*, 2015, no. 1, pp. 37-39. (in Russian)

Asaturova A.M., Homyak A.I., Tomashevich N.S., Pavlova M.D., Zhevnova N.A., Dubyaga V.M., Kozitsin A.Ye., Sidorova T.M., Nadykta V.D., Ismailov V.Ya. Conditions for the cultivation of new *Bacillus* bacteria being micro bioproduct producers. *J. Pure and Appl. Microbiol.*, 2015, vol. 9, no. 4, pp. 2797-2804.

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

Xu Y., Cai D., Zhang H., Gao L., Yang Y., Gao J., Yang Y., Gao J., Li Y., Yang C., Ji Z., Yu J., Chen S. Enhanced production of iturin A in *Bacillus amyloliquefaciens* by genetic engineering and medium optimization. *Proc. Biochem.*, 2020, no. 90, pp. 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.017>

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

Horak I., Engelbrecht G., van Rensburg P.J. J., Claassens S. Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides. *J. Appl. Microbiol.*, 2019, vol. 127, no. 2, pp. 326-343. <https://doi.org/10.1111/jam.14218>

Zhao X., Han Y., Tan X. Q., Wang J., Zhou Z. J. Optimization of antifungal lipopeptide production from *Bacillus* sp. BH072 by response surface methodology. *J. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 4, pp. 324-332. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3354-3>

Shafi J., Mingshan J., Zhiqiu Q., Xiuwei L., Zumin G., Xinghai L., Yang Z., Peiwen Q., Hongzhe T., Wunan C., Kai W. Optimization of *Bacillus aerius* strain JS-786 cell dry mass and its antifungal activity against *Botrytis cinerea* using response surface methodology. *Arch. Biol. Sci.*, 2017, vol. 69, no. 3, pp. 469-480. <https://doi.org/10.2298/ABS160421122S>

Backer R., Rokem J.S., Ilangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., Subramanian S., Smith D.L. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Front. Plant Sci.*, 2018, vol. 9, pp. 1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>

Mahmood A., Turgay O.C., Farooq M., Hayat R. Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2016, vol. 92, no. 8, pp. 1-12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw112>

Muller A., Schade C., El-Hage Scialabba N., Brüggemann J., Isensee A., Erb K.-H., Smith P., Klocke P., Leiber F., Stolze M., Niggli U. Strategies for feeding the world more sustainably with organic agriculture. *Nat. Commun.*, 2017, vol. 8, pp. 1-13. <http://doi.org/10.1038/s41467-017-01410-w>

Хомяк Анна Игоревна
научный сотрудник
Федеральный научный центр
биологической защиты растений
Россия, 350039, г. Краснодар, п/о-39
e-mail: HomyakA187@mail.ru

Homyak Anna Igorevna
Research Scientist
Federal Research Center of Biological Plant
Protection
p/o-39, Krasnodar, 350039,
Russian Federation
e-mail: HomyakA187@mail.ru

Жевнова Наталья Андреевна
научный сотрудник
Федеральный научный центр
биологической защиты растений
Россия, 350039, г. Краснодар, п/о-39
e-mail: tiamat-7@mail.ru

Zhevnova Natalya Andreevna
Research Scientist
Federal Research Center of Biological Plant
Protection
p/o-39, Krasnodar, 350039,
Russian Federation
e-mail: tiamat-7@mail.ru

Асатурова Анжела Михайловна
кандидат биологических наук,
директор
Федеральный научный центр
биологической защиты растений
Россия, 350039, г. Краснодар, п/о-39
e-mail: biocontrol-vniibzr@yandex.ru

Asaturova Anzhela Mikhailovna
Candidate of Sciences (Biology),
Director
Federal Research Center of Biological Plant
Protection
p/o-39, Krasnodar, 350039,
Russian Federation
e-mail: biocontrol-vniibzr@yandex.ru