

Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Гжицького

Факультет харчових технологій та біотехнологій

Кафедра біотехнологій та радіології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня «Бакалавр»

на тему: «Технологія одержання біопрепарату для захисту рослин»

Виконала: студентка 4 курсу

Групи 1, спеціальності

162 «Біотехнології та біоінженерія»

 Медведєва К.Г.

Керівник: к. б. н.,

доцентка кафедри біотехнологій та радіології

 Шемедюк Н. П.

Рецензент: к. б. н.,

доцентка, завідувач кафедри фармації та біології

 Грицина М. Р.

Робота заслухана на засіданні кафедри біотехнологій та радіології і
рекомендована до захисту на засіданні ЕК, протокол № 25 від 01.06. 2023 р.

Завідувач кафедри біотехнологій та радіології, професор, доктор с.-г. наук

Буцяк В. І. 

Львів – 2023

Затверджено
Наказ Міністерства освіти і науки,
молоді та спорту України
29 березня 2012 року №384

Форма № Н – 9.01

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького
Інститут, факультет, відділення факультет харчових технологій та біотехнології
Кафедра, циклова комісія кафедра біотехнології та радіології
Освітньо – кваліфікаційний рівень бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри, голова циклової
комісії _____ **Буцяк В.І.**
«06» _____ 2023 року

ЗАВДАННЯ НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧУ

Медведєвій Крістині Геннадіївні

1. Тема кваліфікаційної роботи: «Технологія одержання біопрепарату для захисту рослин».

Керівник кваліфікаційної роботи: Шемедюк Наталя Петрівна к. б. н., доцентка
затверджені наказом вищого навчального закладу від 06.01.2023 р., №31– 4

2. Строк подання кваліфікаційної роботи 10.05.2023 року

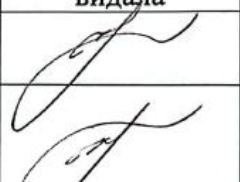


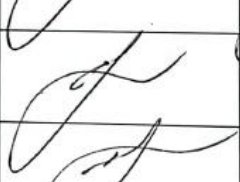

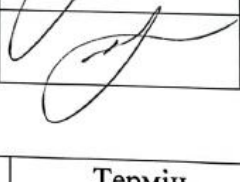
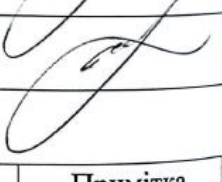
3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: Bacillus, Paenibacillus, фітопатогени, біотехнологія одержання біопрепаратів для захисту рослин на основі культур мікроорганізмів.

4. Зміст кваліфікаційної роботи (перелік питань, які потрібно розробити) вступ, огляд літератури, умови та методика проведення дослідження, результати дослідження, висновки.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним значенням креслень), технологічні схеми; рисунки: Розподіл біопрепаратів за напрямком дії, Найбільші виробники біопрепаратів для захисту рослин в Україні (травень 2022 р.), Імпортні біопрепарати для захисту рослин на ринку України (травень 2022 р.), Пропорції біопрепарату та води для приготування робочого розчину на кількість сировини, що обробляється, Спори бактерій, Види джгутиків, Комплексне біодобриво "Гуміфренд", Чашки Петрі з живильними середовищами SG-1 (коричневе) та LA (прозоре), Прилад для капілярного електрофорезу "КАПЕЛЬ - 105М", Підготовлені до стерилізації чашки Петрі, Підготовані до стерилізації колби, Методика приготування десятикратних розведень, Шпатель Дригальського, Бактеріологічні петлі різного діаметру, Приготування фіксованого мазка, Будова клітинних стінок грампозитивних та грамнегативних бактерій, Відмінності між грампозитивними та грамнегативними бактеріями, Кислотостійкі палички туберкульозу під мікроскопом зафарбовані за методом Ціля-Нільсена, Схема

посіву мікроорганізмів на чашку Петрі методом паралельних штрихів, Результат тестування на каталазні властивості виділеної чистої культури *Bacillus subtilis* – утворення піни свідчить про позитивну реакцію, Результати дослідження *Bacillus subtilis*, Чисті колонії *Bacillus subtilis* на живильному середовищі LA, Результати дослідження *Bacillus mucilaginosus*, Чисті колонії *Bacillus mucilaginosus* на живильному середовищі LA, Результати дослідження *Paenibacillus macerans*, Чисті колонії *Paenibacillus macerans* на живильному середовищі LA, Результати дослідження *Bacillus megaterium*, Чисті колонії *Bacillus megaterium* на живильному середовищі LA, Результати дослідження *Paenibacillus polymyxa*, Чисті колонії *Paenibacillus polymyxa* на живильному середовищі LA, Схема ферментера, Принципова технологічна схема глибинного культивування, Технологічна схема отримання біопрепарату для захисту рослин.

6. Консультанти розділів кваліфікаційної роботи

Розділ	Консультант ПБ, посада	Підпис, дата	Підпис, дата
		Завдання видала	Завдання прийняла
1. Огляд літератури	к.б.н., доцентка Шемедюк Н. П.		
2. Умови та методика проведення дослідження	к.б.н., доцентка Шемедюк Н. П.		
3. Результати дослідження	к.б.н., доцентка Шемедюк Н. П.		
4. Висновки	к.б.н., доцентка Шемедюк Н. П.		

7. Дата видачі завдання 06.02.2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів магістерської роботи	Термін виконання	Примітка
1.	Огляд літератури		30%
	I атестація:	<u>10.04.23</u>	30%
2.	Умови та методика проведення дослідження		20%
3.	Результати дослідження		35%
	II атестація:	<u>20.04.23</u>	55%
	Висновки		15%
	III атестація:	<u>02.05.23</u>	15%
	Допущено до захисту	<u>10.05.23</u>	100%

Здобувач

Керівник кваліфікаційної роботи



Медведєва К.Г.
Шемедюк Н.П.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	3
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1 Загальна характеристика біопрепаратів.....	8
1.2 Аналіз ринку біопрепаратів в Україні та світі.....	11
1.3 Характеристика біопрепарату “Гуміфренд”.....	15
1.4 Загальна характеристика мікроорганізмів, що входять до складу біопрепарату “Гуміфренд”.....	17
1.4.1. <i>Bacillus subtilis</i>	17
1.4.2. <i>Bacillus megaterium var. Phosphaticum</i>	19
1.4.3. <i>Bacillus mucilaginosus</i>	19
1.4.4. <i>Paenibacillus macerans</i>	19
1.4.5. <i>Paenibacillus polymyxa</i>	20
РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ...	21
2.1 Матеріали.....	21
2.1.1. Біопрепарат “Гуміфренд”.....	21
2.1.2. Живильні середовища та умови культивування.....	22
2.2 Методи.....	23
2.2.1. Хімічний аналіз.	23
2.2.2. Мікробіологічні методи.....	24
2.2.3. Ідентифікація мікроорганізмів.	28
2.2.3.1. Морфологічна оцінка колоній мікроорганізмів на чашках Петрі.	28
2.2.3.2. Фарбування за Грамом.	29
2.2.3.3. Фарбування за Цілем-Нільсеном.....	30
2.2.4. Морфологічна оцінка мікроорганізмів під мікроскопом.....	32
2.2.5. Виділення чистих колоній мікроорганізмів.	32

2.2.6. Статистична обробка даних.....	33
2.2.7. Виявлення каталазних властивостей культури.	33
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	35
3.1 Оцінка хімічного складу біодобрива “Гуміфренд”	35
3.2 Ідентифікація колоній мікроорганізмів	37
3.2.1. <i>Bacillus subtilis</i>	37
3.2.2. <i>Bacillus mucilaginosus</i>	39
3.2.3. <i>Paenibacillus macerans</i>	40
3.2.4. <i>Bacillus megaterium</i>	42
3.2.5. <i>Paenibacillus polymyxa</i>	44
3.3 Підбір оптимального середовища для ізолювання мікроорганізмів за розрахунком їх колонієутворюючих одиниць (КУО)	45
3.4 Технологічна схема отримання біопрепарату для захисту рослин з вмістом бактерій роду <i>Bacillus</i> та <i>Paenibacillus</i>	48
ВИСНОВКИ	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	55

АНОТАЦІЯ

В даній кваліфікаційній роботі описано дослідження біотехнологічного засобу захисту рослин, розроблено технологічну схему одержання біопрепаратів.

В наш час актуальним є питання екологізації сільського господарства. Для цього все більше і більше господарств переходять від хімічних засобів захисту рослин до тих, які не мають шкідливого впливу на здоров'я людини та навколишнє середовище.

Досліджуваний біопрепарат у своєму складі містить 5 штамів бактерій, які є корисними для рослин, оскільки покращують їх ріст та розвиток, а також підтримують живлення за рахунок перетворення органічних речовин в доступні для використання рослинами форми. Окрім того, до складу біопрепарату входить широкий спектр мікро- та макроелементів, необхідних для росту та розвитку рослин. Також мікроорганізми в складі біопрепарату володіють антагоністичними властивостями, завдяки яким здатні захищати рослини від паразитів та фітопатогенів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Кваліфікаційна робота є частиною наукових досліджень теми «Розробка технологій на основі нанотехнологій та біоінженерії з метою одержання відновлювальних джерел енергії і екологічно- безпечних продуктів біоконверсії» (номер державної реєстрації 0122U002494), виконуваних співробітниками кафедри біотехнології та радіології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького.

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи є дослідження біопрепарату для захисту рослин, його хімічного та мікробіологічного складу, розробка технологічної схеми виробництва біопрепаратів.

Завдання дослідження:

- Оцінка хімічного складу біопрепарату “Гуміфренд”;

- Ідентифікація колоній мікроорганізмів, які є основою біопрепарату “Гуміфренд”;
- Підбір оптимального середовища для ізолювання та культивування мікроорганізмів;
- Розробка технологічної схеми отримання біопрепарату для захисту рослин.

Об’єкт дослідження: біопрепарат “Гуміфренд” та мікроорганізми в його складі: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mucilaginosus*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus polymyxa*, технологічний процес одержання мікробіологічного препарату.

Предмет дослідження: хімічний склад біопрепарату “Гуміфренд”, ідентифікація колоній мікроорганізмів, які є основою біопрепарату “Гуміфренд”; підбір оптимального середовища для ізолювання мікроорганізмів.

Методи дослідження: метод капілярного електрофорезу, мікробіологічні методи (стерилізація, приготування десятикратних розведень, приготування живильних середовищ, посів мікроорганізмів на живильне середовище, відбір проб мікроорганізмів та приготування фіксованих мазків), ідентифікація мікроорганізмів (морфологічна оцінка колоній, фарбування за Грамом, фарбування за Цілем-Нільсеном для визначення кислотостійкості, мікроскопія); технологія одержання біологічного засобу захисту рослин.

Науковий внесок роботи. Аналіз біопрепарату «Гуміфренд» задля вдосконалення біобезпечних біотехнологічних засобів захисту рослин та технологічних схем їх одержання.

Практична цінність роботи. Досліджено біопрепарат «Гуміфренд», оцінено перспективу та вдосконалення сучасних біопрепаратів, обґрунтовано схему біотехнології одержання препаратів для захисту рослин.

Апробація результатів дослідження. Результати дослідження апробовано на конференціях, опубліковано у збірниках матеріалів конференцій, презентовано у вигляді доповідей:

- Контарева К.Г., Маковей Р., Демчук О., Павліш Р., Юськів Л.Л. Біологічна роль вітаміну D3 та його вплив на показники харчової цінності молока. “Дні студентської науки у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, присвячена 140-річчю відкриття навчального закладу “Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові””: Тези доповідей Студентської наукової конференції (Львів, 13-14 травня, 2021 р.). Ч. 9. Факультет харчових технологій та біотехнології. Львів, ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького, 2021. С. 76-78.
- Медведева К.Г., Шемедюк Н.П. Дослідження біопрепарату для захисту рослин. “Дні студентської науки у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького”: Тези доповідей Студентської наукової конференції (Львів, 2-4 травня, 2023 р.). Ч. . Факультет харчових технологій та біотехнології. Львів, ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького, 2023. С. .

ВСТУП

В наш час актуальним є питання екологізації усіх видів господарської діяльності людини, оскільки стан нашої біосфери щороку погіршується. Одним з вирішень питання про зменшення забруднення ґрунтів хімічними речовинами є використання їх аналогів, виготовлених з безпечних інгредієнтів, в тому числі біологічного походження.

Такими аналогами є біопрепарати. В своєму складі вони містять культури мікроорганізмів, які здатні захистити рослини від шкідників та фітопатогенів, при цьому не завдаючи шкоди корисному мікробіому, тваринам, людині та навколишньому середовищу.

Біопрепарати також виступають гарним аналогом хімічним засобам захисту рослин, оскільки не є причиною резистентності мікроорганізмів-шкідників. Саме тому їх можна застосовувати тривалий час, не збільшуючи дози діючої речовини.

Також до складу біопрепаратів часто входять мікро-, макроелементи, амінокислоти, вітаміни тощо, які позитивно впливають на ріст та розвиток рослин.

Ринок біопрепаратів активно розвивається, тому є можливість обрати той біопрепарат, який найкраще та найефективніше подіє на той чи інший сорт рослини та захистить від конкретних шкідників та фітопатогенів.

Біопрепарати мають перевагу над хімічними засобами захисту рослин, оскільки можуть застосовуватись для обробки в період росту ягід та їх дозрівання, при цьому готові продукти будуть безпечними до вживання.

Тому важливо розвивати ринок біопрепаратів, покращувати їх склад та характеристики для заохочення користувачів переходити від хімічних методів до екологічно безпечних – біологічних, вивчати та вдосконалювати технологію

виготовлення та склад біопрепаратів і поширювати ідею збереження екології навколишнього середовища шляхом переходу від хімічних методів до біологічних.

В даній кваліфікаційній роботі розглянуто такі питання, як характеристика біопрепаратів, ринку біопрепаратів, а також характеристика та дослідження складу біодобрива – “Гуміфренд” та на основі результатів дослідження розроблена технологічна схема виготовлення біопрепаратів для захисту рослин та сформульовані висновки.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика біопрепаратів

Біопрепарати – це засоби, які отримують з природних джерел: грибів, рослин, тварин, мікроорганізмів тощо або синтезують, використовуючи методи біотехнології.

Біопрепарати для захисту рослин — біологічні препарати, які застосовуються для боротьби з фітопатогенами рослин і комахами-шкідниками. До їх складу можуть входити мікроорганізми (бактерії, гриби, віруси), рослинні екстракти, ферменти та інші натуральні інгредієнти.

Ці біологічні препарати можуть бути використані як альтернатива хімічним засобам захисту рослин, оскільки не містять шкідливих хімічних речовин, які можуть негативно впливати на довкілля та здоров'я людини. Натомість вони використовують природні механізми для боротьби зі шкідниками та фітопатогенами, наприклад, конкуруючи зі шкідливими мікробами або стимулюючи імунну систему рослин.

Також особливістю біопрепаратів є те, що вони не є причиною біорезистентності у шкідників, що дозволяє ефективно використовувати один і той же препарат тривалий час, не збільшуючи дози діючої речовини.

Біопрепарати не накопичуються в клітинах рослин, відповідно, їх можна безпечно використовувати для обробки плодових культур без шкоди життю і здоров'ю людей, які будуть вживати в їжу дану продукцію.

Основою для виготовлення біопрепаратів є рістстимулюючі бактерії (англ. Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB) – це група мікроорганізмів, які, перебуваючи у зоні ризосфери, на поверхні кореня або будучи асоційованими з коренем, здатні захищати рослини від зовнішніх чинників та покращувати їх ріст. [25]

За типом взаємодії з рослинами PGPB бувають вільноживучі, асоціативні, симбіонти та ендofіти.

Механізми дії PGPB:

- *Прямі:*

- Забезпечення рослин дефіцитними або важкодоступними речовинами: Нітроген, Фосфор, Калій, Ферум;
- Модуляція рівня фітогормонів;

- *Непрямі:*

- Синтез антибіотичних речовин і літичних ферментів;
- Синтез сидерофорів - хімічних сполук, що хелатують іони заліза;
- Індукування системної стійкості;
- Зміна гормонального балансу рослини;
- Синтез трегалози та антифризових білків – захист від засухи, засолення та замерзання.

Біологічні засоби захисту рослин за напрямком дії поділяють на:

- Біофунгіциди – пригнічують життєдіяльність патогенних грибків;
- Біоінсектициди – пригнічують життєдіяльність комах-шкідників;
- Біоакарациди – пригнічують життєдіяльність патогенних кліщів;
- Біонематициди – пригнічують життєдіяльність рослиноїдних нематод;
- Біогербіциди – пригнічують життєдіяльність бур'янів;
- Біородентициди – пригнічують життєдіяльність гризунів;
- Біоінокулянти – зміцнюють здоров'я рослин;
- Біодеструктори рослинних решток – це препарати, які сприяють пришвидшенню розкладання рослинних решток у ґрунті, пригніченню патогенної мікрофлори та оздоровленню ґрунту;
- Біодобрива – забезпечують рослини Нітрогеном, Фосфором та Калієм, а також стимулюють їх ріст і розвиток, збільшують урожайність та покращують якість продукції. [4]

Біологічні препарати за походженням поділяють на:

- Бактеріальні – виготовлені з додаванням бактерій;

- Грибні – виготовлені з додаванням грибів-ентомопатогенів із широким спектром дії проти шкідників та мікробів-антагоністів і гіперпаразитів, специфіку яких використано у боротьбі проти фітопатогенів;
- Вірусні – виготовлені з додаванням ентмопатогенних вірусів, володіють високою специфічністю. [3]

Мікробіологічні добрива – це біопрепарати на основі живих мікроорганізмів, які, потрапляючи у ґрунт, сприяють швидкому постачанню живильних речовин рослинам. Залежно від типу мікроорганізмів такі добрива можуть володіти нітрогенфіксувальною, фосфат- і каліймобілізуючою дією, а також розкладають стерню – незрізані рештки нижньої частини рослин, які залишаються на полях після жнив.

Бактерії в складі нітрогенфіксувальних добрив можуть засвоювати вільний Нітроген з повітря і перетворювати його в амонійну форму, в якій він легко засвоюється рослинами.

Бактерії фосфат- і каліймобілізуючих добрив перетворюють сполуки Фосфору і Калію, що містяться в ґрунті, в форми, які легко засвоюються рослинами.

Мікроорганізми біопрепаратів-деструкторів сприяють розкладанню рослинних решток і утворенню органічних речовин для збагачення ґрунту, а також пригнічують патогенну мікробіоту. Такі препарати є комплексними і містять широкий спектр мікроорганізмів.

За напрямком дії найбільше використовуються біопрепарати (рис. 1.1.1):

1. Такі, що покращують живлення та підвищують урожайність;
2. Такі, що захищають культури від фітопатогенів;
3. Такі, що захищають культури від шкідників;
4. Такі, що захищають культури від гризунів.

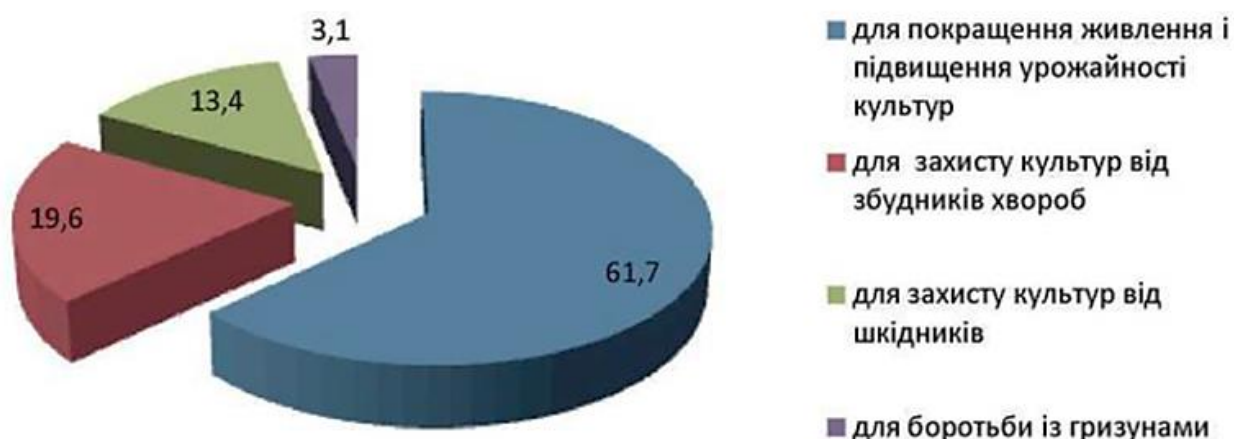


Рис. 1.1.1 Розподіл біопрепаратів за напрямком дії

1.2 Аналіз ринку біопрепаратів в Україні та світі

Екологізація землеробства і перехід від хімічних препаратів до біологічних пов'язаний з повноцінним функціонуванням ринку біологічних засобів захисту рослин із зрозумілими для учасників умовами участі.

У 2021 році світовий обсяг виробництва біологічних засобів захисту рослин оцінили в 4,5 млрд USD, а у 2022 році ця сума виросла до 5,3 млрд USD. Тобто можемо помітити тенденцію зростання щорічних обсягів виробництва біопрепаратів для захисту рослин на світовому ринку.

З 1995 року і до 2020 року в Україні обсяги обробки полів засобами захисту рослин зросли з 19824 тис. га до 50562 тис. га (табл. 1.2.1). Та, на жаль, частка застосування саме біологічних засобів щороку зменшується. І на даний момент подолати цю негативну тенденцію не вдається. Тому актуальним є питання виготовлення якісних біопрепаратів з високою захисною та живильною здатністю, розширення ринку біопрепаратів, а також їх розповсюдження “в маси”, роз'яснення агрономам актуальності, безпечності та ефективності застосування біопрепаратів захисту рослин.

Таблиця 1.2.1

**Обсяги застосування хімічних та біологічних препаратів для захисту
рослин в господарствах України**

Рік	Обсяги застосування методів захисту с/г культур, усього тис.га	у тому числі, тис. га		Частка біологічних методів у загальних обсягах захисту с/г культур, %
		хімічні методи	біологічні методи	
1995	19824	16801	3023	15,2
2000	12970	11916	1054	8Д
2010	38588	36533	2055	5,3
2011	45856	43527	2329	5,1
2012	45191	43057	2134	4,7
2013	47535	45527	2008	4,2
2014	45586	43304	2282	5,0
2015	43816	41630	2186	5,0
2016	45173	43117	2056	4,6
2017	46798,1	44730	2068,1	4,4
2018	49106,1	47139	1967,1	4,0
2019	49833,2	47991	1842,2	3,7
2020	50562	48734,8	1827,2	3,6

Причини такого різкого скорочення обсягів застосування біопрепаратів для захисту рослин наступні:

- Домінування хімічних засобів захисту рослин;
- Відсутність підтримки сільських господарств, що використовують препарати біологічного походження;
- Слабкість ринку біопрепаратів;
- Складність реєстрації біопрепаратів;
- Складність пошуку доступних препаратів захисту рослин.

Недостатній розвиток ринку біопрепаратів в Україні є значною перешкодою для повноцінного розвитку біометоду.

Станом на травень 2022 року у “Державному реєстрі пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні” налічується 126

біопрепаратів для захисту рослин від 38-ми українських виробників (рис. 1.2.1) та 117 препаратів зарубіжних виробників зі 28-ми країн світу (рис. 1.2.2).

Виробники	Найменування препаратів	Кількість препаратів
1	2	3
ПП «БТУ-Центр»	Органік-баланс; АКТОВЕРМ ФОРМУЛА; ФІТОХЕЛП; МусоHelp; Екостерн; «Актоверм»; РІЗОЛАЙН, р.; МІКОФРЕНД; МЕЛАНОРІЗ; СКЛЕРОЦИД; АНДЕРІЗ; МЕТАВАЙТ; Ecoster; Азотофіт, КП; Азотофіт, КС; Біокомплекс-БТУ, КС; Біоінокулянт-БТУ, КП; Біоінокулянт-БТУ, КС; Бітоксимацілін-БТУ, КС; Лепідоцид-БТУ, КС; Фітоцид, КС	21
ДП «Ензим»	«Ентоцид (Метаризін)»; «BiNitro БОБОВІ» марка «BiNitro ГОРОХ»; «Viridin (Триходермін)», р.; «Азотфіксатор ґрунтовий Біомаг», р.; «Антистресант «FitoNis», р.; «Гаубсин», с.; «CORNEX», р.; Біомаг-Соя, з.п.; Біомаг-Соя, с.е.; «Актарофіт, КЕ»; Колорадоцид, з.п.; «Soyex», с.е.; «РАТТЕР», р.; «Аміноріз», р.; «Антистресант «Flores», р.	15
ТОВ «БІОНАСЕРВІС ПЛЮС»	Нітрофікс (LS); Нітрофікс (CP); БіоЗлак; НітроЗлак; Нітрофікс (Нітрагін); Різомакс; «Бактофіт», рідка суспензія; «Лепідоцид», в.р.; «Фунгістоп», рідка суспензія; Бактеронцид гель, рідина гелеподібної форми; НітроМаїс, РН	11
ПП НВП «Еко-Гарант»	Біонорма гр.; Агрінсекта; Біонорма, р.; Ризоактив Концентрат, п.; Ризоактив Бобові, р.; Ризоактив Концентрат, р.	6
ТОВ «БІОНОРМА»	Біонорма гр.; Агрінсекта; Біонорма, р.; Ризоактив Концентрат, п.; Ризоактив Бобові, р.; Ризоактив Концентрат, р.	6
ТОВ «Черкаський науково-виробничий центр по біологічному захисту рослин»	Родента БІО; «Азотфіксатор на сою», гель; «Триходермін-біо», суспензія; «Фітопсин», суспензія; «Флорабацилін», суспензія; «Планриз-біо», суспензія	6
ДУ «Волинська обласна фітосанітарна лабораторія», «Кіровоградська обласна фітосанітарна лабораторія», «Львівська обласна фітосанітарна лабораторія», «Полтавська обласна фітосанітарна лабораторія», «Харківська обласна фітосанітарна лабораторія»	Бактоцид, сипуча маса; Планориз ВЛ, в.с.; Сігер Ейр, р; Триходермін ОК, р.	4

Рис. 1.2.1 Найбільші виробники біопрепаратів для захисту рослин в Україні (травень 2022 р.)

Країна	Фірма виробник	Кількість препаратів	Усього
1	2	3	4
Аргентина	«Rizobacter Argentina S.A.»	10	12
	«Синтезис Квуимика SAIC»	1	
	ТОВ «Фрагарія» (FRAGARIA S.R.L.)	1	
США	Агрінос Інк. (Agrinos Inc.)	2	30
	TerraMax Inc	6	
	Індіго Аг, Інк. 500	7	
Угорщина	ТзОВ «Рактарбазіш-Транзіт»	1	10
	Корпорація із захисту навколишнього природного середовища «Коракс-Біонер» (Corax-Bioner Environmental Protection Co.)	1	
	Виробничо-торгівельне підприємство «PhylagroKft»	5	
	BioFil Microbiological, Biotechnological and Biochemical Ltd	2	
	AGRO.bio Hungary Trading and Manufacturing Limited Liability Company	1	
Велика Британія	Беккер Андервуд Лтд	1	6
	Легум Технолоджи Лтд	4	
	БАСФ Агрікалчурал Спешіелітіс Лтд	1	
Італія	«Грін Равенна срл» («Green Ravenna srl»)	4	6
	Agrifutur Srl	2	
Іспанія	«Футуреко Біосайєнс, С.А.»	2	5
	Симборг С.Л. (Symborg S.L.)	3	

Рис. 1.2.2 Імпортні біопрепарати для захисту рослин на ринку України (травень 2022 р.)

За результатами такої статистики можна зробити висновок, що імпортні біопрепарати складають велику конкуренцію для вітчизняних, що не стимулює виробництво біопрепаратів для захисту рослин в Україні.

Для вирішення цієї проблеми необхідно вжити наступних заходів:

- Забезпечити організаційну й фінансову підтримку з боку держави та приватного бізнесу;
- Стимулювати не лише виробництво, а й використання біопрепаратів;
- Перегляд законодавства у сфері біопрепаратів та забезпечення його відповідності до правових норм ЄС;
- Технічні й технологічні реконструкції наявних виробництв;
- Створення та розвиток нових мереж біолабораторій та біофабрик;
- Підтримка вітчизняних виробників;
- Відокремлення біопрепаратів у “Державному реєстрі пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні” від хімічних засобів;

- Спрощення процедури внесення нових препаратів, які розробляються та випускаються спеціалізованими науково-дослідними інститутами НААН і НАН України.
- Систематизація та проведення ґрунтовних наукових досліджень в сфері біологічних методів;
- Пошук нових та вдосконалення існуючих механізмів функціонування ринку біопрепаратів в Україні.

Такі нововведення стимулюватимуть нарощення виробництва і споживання біопрепаратів в Україні, що матиме позитивний вплив на екологізацію сільського господарства, підвищення врожайності, збільшення робочих місць та збільшення податкових коштів, що надходитимуть до бюджету країни.

1.3 Характеристика біопрепарату “Гуміфренд”

Гуміфренд – біодобриво для захисту рослин із вмістом корисних мікроорганізмів та їх метаболітів. За фізичними характеристиками - це рідина від коричневого до темно коричневого кольору зі специфічним запахом. Випускається у тарах від 5 мл до 1 л.

До складу біопрепарату входять:

- Калійні солі гумінових та фульвових кислот;
- Біологічно-активні речовини;
- Мікроелементи;
- Мікроорганізми: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*, *Bacillus mucilaginosus*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus polymyxa*.

Використання Гуміфренду сприяє:

- Прискоренню надходження поживних речовин і підвищенню коефіцієнту їх використання;

- Підвищенню стійкості рослин до несприятливих умов навколишнього середовища;
- Покращенню росту та розвитку кореневої системи на надземній частини рослин;
- Оздоровленню ґрунту та відновленню його родючості;
- Посиленню імунітету рослин;
- Підвищенню кількості та якості врожаю сільськогосподарської продукції.

Біопрепарат призначений для обробки насіння, позакореневого та прикореневого підживлення культур та обробки ґрунту з метою збагачення його активним гумусом та корисною мікробіотою.

Особливості застосування:

- Для передпосівної обробки насіння обприскують робочим розчином добрива або замочують у ньому у день висіву на 1-2 години. Обробку насіння проводять у затінку, уникаючи потрапляння сонячних променів;
- Для підживлення рослини обприскують робочим розчином у період вегетації під час рекомендованих фаз росту рослин. Проводять у безвітряну, похмуру погоду або вранці/ввечері;
- Для обробки ґрунту проводять обприскування робочим розчином перед дискуванням, оранкою, культивацією, сівбою або висаджуванням сільськогосподарських культур.

Для приготування робочого розчину препарат змішують у певних пропорціях з водою (рис. 1.3.1). Перед застосуванням препарат обов'язково ретельно збовтують. Робочий розчин зберігають не більше доби.

Культура	Обробка насіння	Позакореневе підживлення Обприскування	Кореневе підживлення
Овочеві (томати, огірки, капуста, баклажани, перець та ін.)	35мл/ 0,25-0,5 л води на 1 кг насіння	35мл/10 л води на 2-3 сотки	35мл/10 л води на 1 сотку
Плодово-ягідні	-	35мл/10 л води на 1 сотку	
Кімнатні та садові квіти	35мл/ 0,25-0,5 л води на 1 кг насіння	35мл/10 л води на 2-3 сотки	
Хвойні та декоративні рослини	-	35мл/10 л води на 1 сотку	

Рис. 1.3.1 Пропорції біопрепарату та води для приготування робочого розчину на кількість сировини, що обробляється

Гарантійний термін зберігання біопрепарату 3 роки від дати виготовлення за температури від 10°C до 40°C за умов зберігання в герметичній упаковці виробника, в захищеному від світла місці.

Після відкриття упаковки термін зберігання препарату не більше 6 місяців.

Посвідчення про державну реєстрацію: серія А № 06323

Виробник: ПП «БТУ-Центр», 24321, м. Ладижин, Вінницька обл., вул. Будівельників, 35. тел./факс (04343) 6-87-09; 6-44-84 [26]

1.4 Загальна характеристика мікроорганізмів, що входять до складу біопрепарату “Гуміфренд”

1.4.1. *Bacillus subtilis*.

Bacillus subtilis – це паличкоподібні з круглими кінцями, грампозитивні, рухливі, розміром близько 0,8×2,9 мкм бактерії, що здатні утворювати спори. Клітини бактерій оточені товстою клітинною стінкою. Ці мікроорганізми здатні рости на середовищах з низьким вмістом поживних речовин. Їм достатньо лише деяких солей та джерел Вуглецю, Нітрогену та Фосфору. Також вони можуть

вмикати механізми виживання, коли стикаються з обмеженням поживних речовин:

- синтез антибіотичних речовин;
- синтез позаклітинних ферментів;
- поглинання ДНК;
- рухливість;
- формування біоплівки;
- утворення спор.

Формування спор відбувається при найгірших умовах. Спори володіють термостійкістю і знаходяться в стані спокою, але можуть швидко проростати і повертатись до вегетативного стану при настанні сприятливих умов. Спори овальні, розташовані субтермінально (рис. 1.4.1.1).

Розташування	Форма	Деформація
Центральне 	Сферична 	Не випирає 
Субтермінальне 	Еліпсоїдна 	Випирає 
Термінальне 		

Рис. 1.4.1.1 Спори бактерій

Bacillus subtilis широко застосовуються для виготовлення біопрепаратів для захисту рослин. Вони поліпшують фосфорне живлення рослин. Для промислового отримання біомаси використовують середовища на основі гідролізатів та кукурудзяного екстракту, а також рідкі середовища на основі гідролізату казеїну, дріжджового екстракту, дріжджів, вуглеводів та солей.

1.4.2. *Bacillus megaterium* var. *Phosphaticum*.

Bacillus megaterium – це грампозитивні, паличкоподібні, рухливі, спороутворюючі бактерії. Свою назву отримали завдяки тому, що клітини мають великий розмір (mega – з лат. великий) - 1,5×5 мкм. Колонії можуть формувати ланцюги завдяки липким полісахаридам на поверхні клітинної стінки.

Bacillus megaterium використовуються для виготовлення біопрепаратів для захисту рослин, оскільки володіють антагоністичними властивостями проти патогенних мікроорганізмів, підвищують імунітет рослин, відіграють важливу роль в циклі Карбону та Фосфору.

1.4.3. *Bacillus mucilaginosus*.

Bacillus mucilaginosus – грамнегативні, паличкоподібні бактерії. Розміри 0,8–1,2×3–9 мкм. Клітини оточені товстими капсулами, які сприяють з'єднанню окремих бактерій у зооглею – желатинову матрицю клітин із сильно полімеризованим екзоклітинним матеріалом. Капсули за розміром в 2-5 разів більші, аніж клітини. Бактерії можуть формувати еліпсоподібні або круглі спори.

Ці бактерії використовуються для виготовлення біопрепаратів, оскільки здатні перетворювати Калій і Фосфор у форми, які легко засвоюються рослинами.

1.4.4. *Paenibacillus macerans*.

Paenibacillus macerans – грампозитивні або грамнегативні, паличкоподібні бактерії. Не утворюють капсули та мають перитрихові джгутики для руху (рис. 1.4.4.1). Можуть формувати еліпсоподібні спори, які розташовуються термінально або субтермінально (рис. 1.4.1.1) і можуть виживати роками.

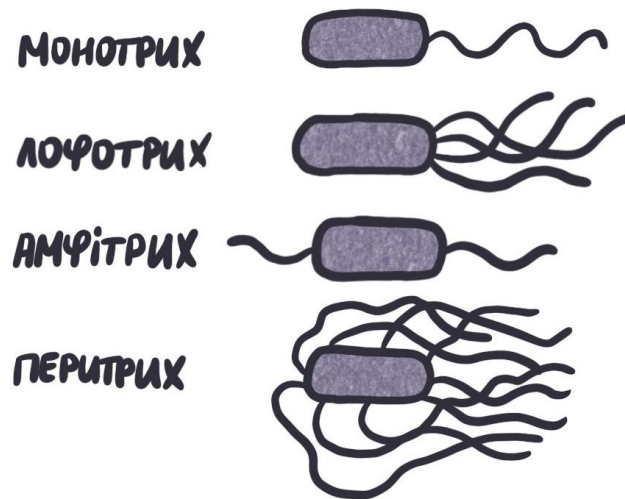


Рис. 1.4.4.1 Види джгутиків

Raenibacillus taserans застосовуються для виготовлення біопрепаратів для захисту рослин, оскільки фіксують та ферментують Нітроген.

1.4.5. *Raenibacillus polyмуха*.

Raenibacillus polyмуха – грампозитивні, паличкоподібні бактерії розміром $0,6 \times 3,0$ мкм, що формують бліді колонії. Для руху використовують перитрихові джгутики (рис. 1.4.4.1). Спори великі еліпсоподібні.

Використовуються для виготовлення біопрепаратів, оскільки здатні фіксувати атмосферний Нітроген і перетворювати його у форми, які засвоюються рослинами; продукують гормони для росту рослин (цитокініни, ауксини, гібереліни); синтезують антибіотичні речовини для захисту від фітопатогенів, підвищують імунітет ризосфери

РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали

2.1.1. Біопрепарат “Гуміфренд”.

Взірець біодобрива “Гуміфренд” (рис. 2.1.1.1) взяли в об’ємі 100 мкл, попередньо струшивши пляшку з препаратом, та провели десятикратні розведення у таких степенях: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .



Рис. 2.1.1.1 Комплексне біодобриво “Гуміфренд”

2.1.2. Живильні середовища та умови культивування.

Посів проводили на живильні середовища *SG-1* та *Luria Agar (LA)* з наступним складом:

Середовище SG-1:

- Глюкоза – 20 г;
- Дріжджовий екстракт – 5 г;
- Соєвий пептон – 10 г;
- CaCO_3 – 2 г;
- Агар – 20 г;
- Дистильована вода – 1 л.

Середовище LA:

- Пептон – 10 г;
- Дріжджовий екстракт – 5 г;
- NaCl – 10 г;
- Агар – 20 г;
- Дистильована вода – 1 л.

Після автоклавування середовище розливали у стерильні чашки Петрі по 20 мл в кожную (рис. 2.1.2.1). По одній чашці кожного середовища не засівали, а залишали як контрольну.

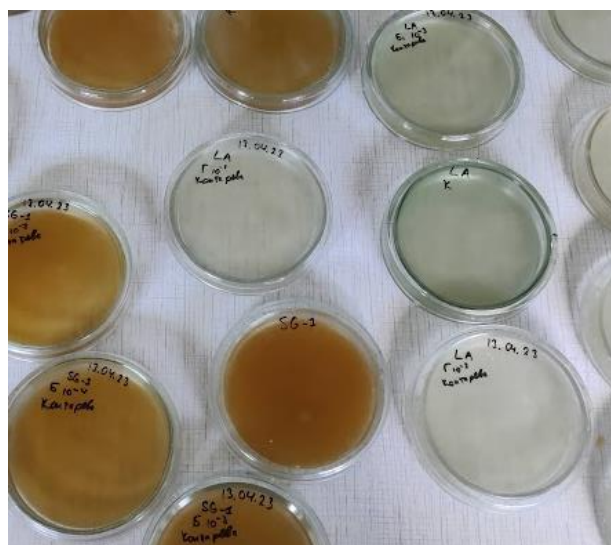


Рис. 2.1.2.1 Чашки Петрі з живильними середовищами SG-1 (коричневе) та LA (прозоре)

pH середовищ встановлювали в межах 7,2-7,4. Культивували за температури 30-34 °С протягом 7-12 днів в залежності від швидкості проростання колоній.

2.2 Методи

2.2.1. Хімічний аналіз.

Оцінювання вмісту амінокислот, макро- та мікроелементів у складі робочого розчину комплексного добрива на основі мікроорганізмів та продуктів їх метаболізму з додаванням гумату калію “Гуміфренд” проводили методом капілярного електрофорезу.

Метод реалізується за наступною схемою:

- 100 мг кожного зразку у скляних бюксах гідролізують 10 мл розведеної соляної кислоти (1:1) протягом 4 годин за температури 110 °С;
- після гідролізу зразки пропускають під струмом, з позитивною полярністю (+), через систему капілярного електрофорезу на спеціальному приладі - “КАПЕЛЬ - 105М” (рис. 2.2.1.1).



Рис. 2.2.1.1 Прилад для капілярного електрофорезу “КАПЕЛЬ - 105М”

2.2.2. Мікробіологічні методи.

Стерилізація

Стерилізація – це процес знищення контамінантів у вигляді мікроорганізмів та їх спор. Стерилізація буває хімічна та фізична.

Стерильні умови є однією з найважливіших частин роботи в мікробіологічній лабораторії. Дотримання правил стерильності гарантує безпеку працівникам та навколишньому середовищу, а також є складовою для отримання точних і правильних результатів досліджень.

Передстерилізаційна обробка посуду та інструментів являє собою миття з миючими засобами, а також замочування у хімічних розчинах. Потім все підсушують та загортають у фольгу (рис. 2.2.2.1). Для скляних колб, піпеток, пробірок тощо виготовляють ватно-марлеві корки та зверху надягають фольгу (рис. 2.2.2.2).



Рис. 2.2.2.1 Підготовлені до стерилізації чашки Петрі



Рис. 2.2.2.2 Підготовані до стерилізації колби

Стерилізують посуд та інструменти в автоклавах - апарати, що забезпечують 3 головні умови для боротьби з мікроорганізмами та їх спорами: високий тиск, висока температура, висока вологість. Існують різні режими роботи автоклавів. В нашому випадку був використаний режим з такими параметрами: тиск – 1,1 атм, температура – 121 °С, час – 40-60 хв (без урахування часу на нагрівання).

Простерилізований у автоклаві посуд переносять до сушильної шафи (окрім пластикового та іншого, що не витримує високі температури). Параметри роботи сушильної шафи в нашому випадку: температура – 170-180 °С, час – 2 години.

Стіл та руки дезинфікують 70%-им розчином етилового спирту. Для того, щоб забезпечити стерильність під час виконання безпосередньої роботи з мікроорганізмами, усі маніпуляції проводять під витяжною шафою в межах 10-15 см від полум'я пальника.

Приміщення (підлогу та стіни) миють, використовуючи мийні засоби та хімічні розчини. Повітря в лабораторії фільтрують, а також використовують бактерицидні лампи.

Приготування десятикратних розведень

Десятикратні розведення готують, використовуючи автоклавовану дистильовану воду та вихідну сировину, що містить культуру мікроорганізмів.

Для приготування першого розведення 10^{-1} беруть одну частину вихідної сировини та 9 частин води. Одна частину може дорівнювати 100 мкл, 1 мл тощо.

Наступне розведення 10^{-2} готують з 9 частин води та 1 частини розведення 10^{-1} .

Далі розведення готують за аналогічною схемою до того відношення, яке необхідне для роботи (рис. 2.2.2.3). В нашому випадку використовувались розведення від 10^{-1} до 10^{-5} .

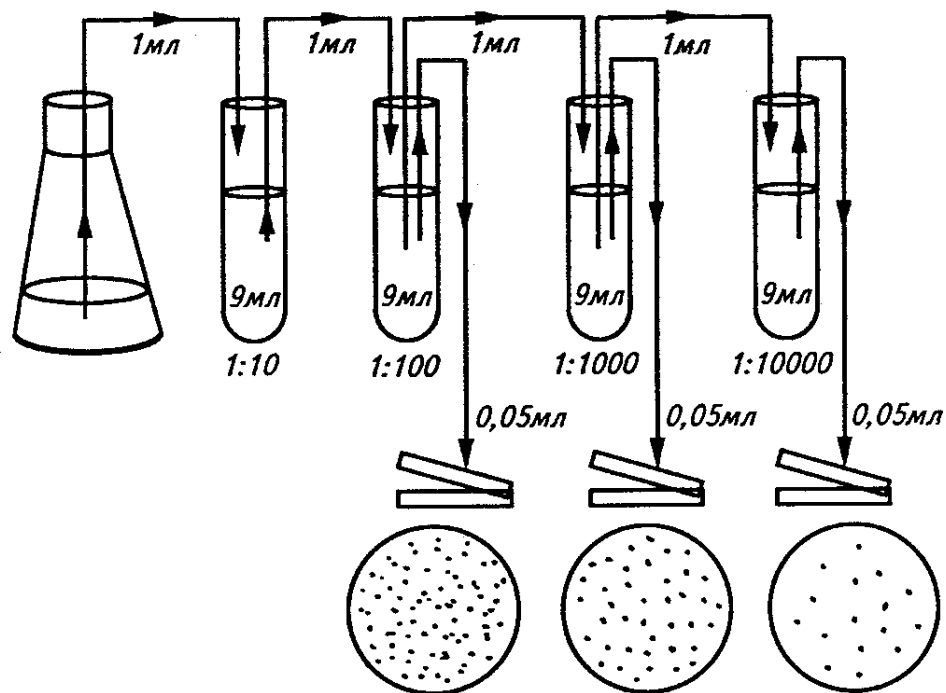


Рис. 2.2.2.3 Методика приготування десятикратних розведень
Посів мікроорганізмів на живильні середовища методом “газону”

1. Чашки Петрі з розлитими в стерильних умовах живильними середовищами привідкривають біля полум'я пальника (на відстані 10-15 см);
2. Піпетдозатором відбирають посівний матеріал і вприскують на поверхню агару;
3. Бактеріологічним шпателем Дригальського (рис. 2.2.2.4) взірець з мікроорганізмами розподіляють по поверхні середовища;
4. Чашку закривають і ставлять у термостат для культивування догори дном.



Рис. 2.2.2.4 Шпатель Дригальського

Відбір проб мікроорганізмів та приготування фіксованих мазків

Перед відбором проб та приготуванням мазків проводять підготовку скелець, що включає:

- Миття скелець з миючими засобами;
- Промивання скелець дистильованою водою;
- Знежирення скелець розчином етилового спирту 70%;
- Протирання скелець серветкою змоченою в дистильованій воді;
- Протирання скелець серветкою насухо;
- Нанесення позначки зі зворотнього боку скельця в кутку;
- Нанесення краплі дистильованої води посередині скельця з лицьового боку.

Відбір проб проводять за допомогою бактеріологічних петель (рис. 2.2.2.5). Кінчиком петлі відбирається невелика кількість мікроорганізмів з бажаної культури.

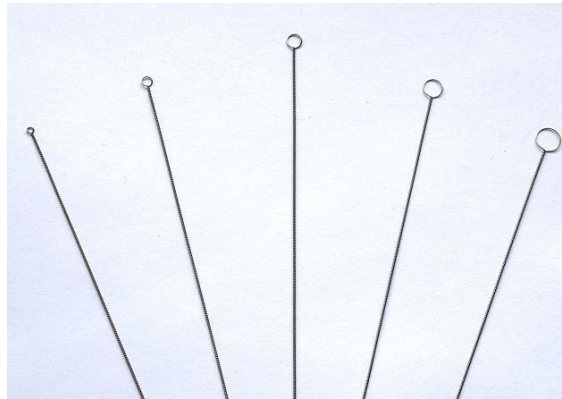


Рис. 2.2.2.5 Бактеріологічні петлі різного діаметру

Далі пробу суспендують у краплі дистильованої води та розподіляють петлею по скельцю. Потім мазок фіксують у полум'ї пальника шляхом проведення скельця над вогнем (рис. 2.2.2.6).

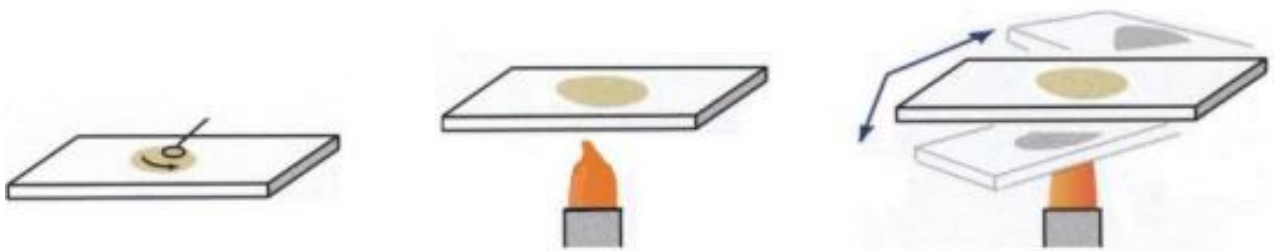


Рис. 2.2.2.6 Приготування фіксованого мазка

2.2.3. Ідентифікація мікроорганізмів.

2.2.3.1. Морфологічна оцінка колоній мікроорганізмів на чашках

Петрі.

Морфологічна оцінка колоній включає дослідження таких ознак:

- Форма (кругла, овальна, неправильна, з рівними краями, з нерівними краями тощо);
- Колір (жовтий, рожевий, тілесний, білий тощо);
- Поверхня (матова, глянцева);
- Розмір (малі, середні, великі);
- Консистенція.

За цими ознаками можна ідентифікувати та класифікувати мікроорганізми, що утворили ту чи іншу колонію. Також є можливість дослідити реакцію на світло, кисень, швидкість росту, антибіотики, колонії інших видів мікроорганізмів.

2.2.3.2. Фарбування за Грамом.

Реактиви

- Дистильована вода;
- Етиловий спирт 96% або ацетон;
- Генціановий фіолетовий;
- Фуксин або сафранін;
- Розчин Люголя або йодистий розчин.

Методика

1. На фіксований мазок покласти фільтрувальний папір;
2. Просочити фільтрувальний папір генціановим фіолетовим;
3. Через 5-7 хвилин зняти фільтрувальний папір і нанести розчин Люголя/йодистий розчин;
4. Через 1-2 хвилини злити розчин Люголя;
5. Наносити спирт/ацетон на 10-15 секунд, зливати і повторювати 30-60 секунд;
6. Ретельно промити мазки дистильованою водою;
7. Нанести фуксин/сафранін;
8. Через 1-2 хвилини змити дистильованою водою і просушити мазок.

Результат

Грампозитивні бактерії завдяки особливостям будови клітини (рис. 2.2.3.2.1 та рис. 2.2.3.2.2) забарвлюються у фіолетовий колір, оскільки в їх оболонці та цитоплазмі генціанвіолет у присутності йоду утворює стійку сполуку, яка не вимивається спиртом. Грамнегативні бактерії мають іншу будову, тому знебарвлюються, а потім дофарбовуються фуксином/сафраніном у червоний.

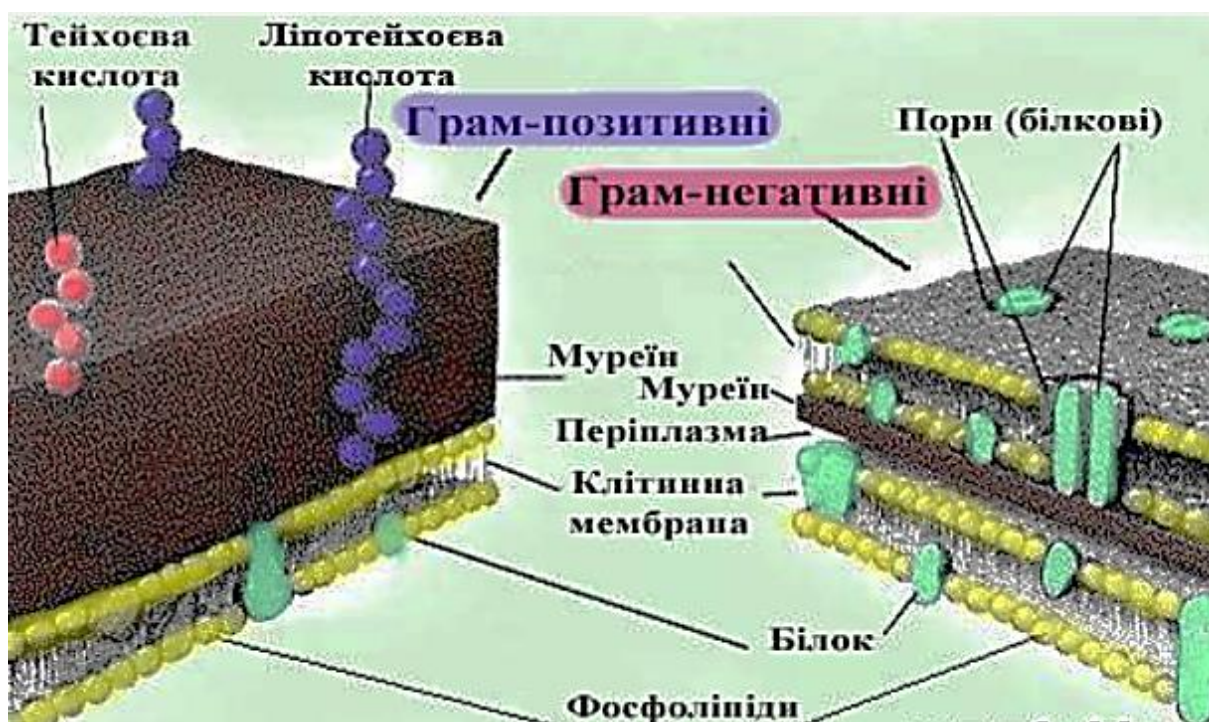


Рис. 2.2.3.2.1 Будова клітинних стінок грампозитивних та грамнегативних бактерій

Грамнегативні мікроорганізми	Грампозитивні мікроорганізми
Забарвлюються у червоний колір	Забарвлюються у фіолетовий колір
Клітинна стінка тонша, складніша за структурою	Клітинна стінка товстіша, простіша за структурою
Вміст пептидоглікану незначний (5-10%)	Вміст пептидоглікану значний (до 90%)
Малочутливі до йоду, пеніциліну, лізоциму	Чутливі до йоду, лізоциму, пеніциліну (пептидоглікан є мішенню)
Клітинна стінка містить ЛПС (ендотоксин)	Більшість бактерій утворюють екзотоксини. Не містять ЛПС

Рис. 2.2.3.2.2 Відмінності між грампозитивними та грамнегативними бактеріями

2.2.3.3. Фарбування за Цілем-Нільсеном.

Реактиви

- Карболовий фуксин Циля;
- Дистильована вода;
- 5%-й розчин сірчаної кислоти H_2SO_4 ;
- 1%-й розчин метиленового синього;

Методика

1. На фіксований мазок покласти фільтрувальний папір;
2. Просочити фільтрувальний папір карболовим фуксином Циля;
3. Нагріти мазок над полум'ям спиртівки до появи пари;
4. Зняти фільтрувальний папір;
5. Промити мазок дистильованою водою;
6. Нанести 5%-ву сірчану кислоту;
7. Через 3 хвилини ретельно промити мазок дистильованою водою;
8. Нанести 0,5-1%-ий розчин метиленового синього;
9. Через 1-2 хвилини промити мазок і висушити.

Результат

Кислотостійкі бактерії на етапі 6 не знебарвлюються, тому залишаються червоними, що можна побачити під мікроскоп (рис. 2.2.3.3.1). Некислотостійкі бактерії знебарвлюються, тому під мікроскопом ми бачимо їх забарвленими у синій.

Стійкість бактерій до кислот в більшості випадків свідчить про їх патогенність.

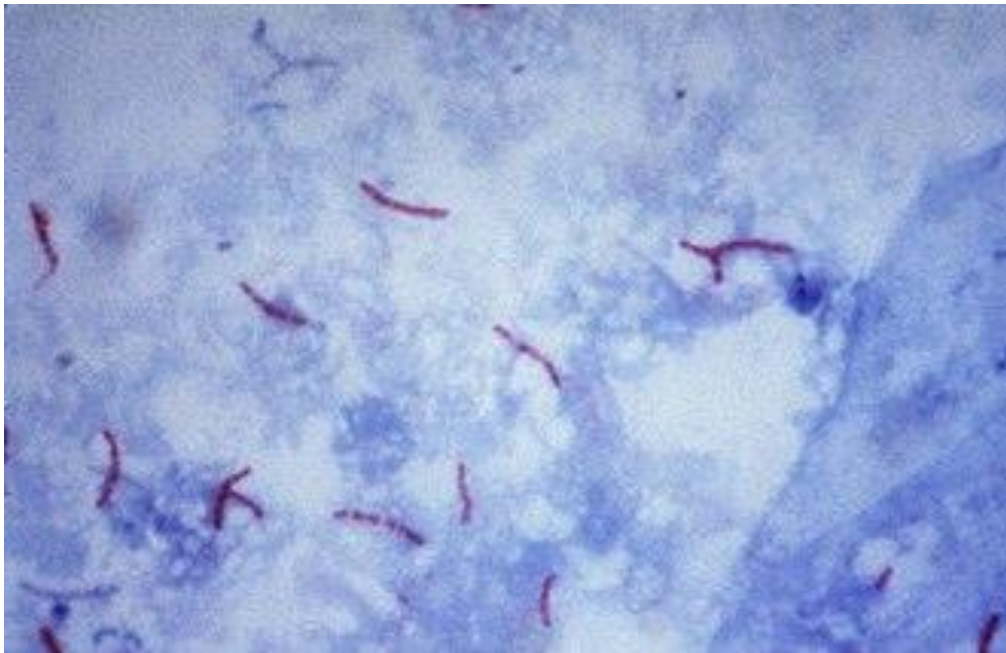


Рис. 2.2.3.3.1 Кислотостійкі палички туберкульозу під мікроскопом зафарбовані за методом Циля-Нільсена

2.2.4. Морфологічна оцінка мікроорганізмів під мікроскопом.

Морфологічна оцінка мікроорганізмів під мікроскопом включає дослідження таких ознак мікробних клітин:

- Розмір (в мкм);
- Форма (коки, палички тощо);
- Наявність внутрішньоклітинних структурних елементів (вакуолі, рибосоми, мітохондрії тощо);
- Наявність включень (волютин, крохмаль тощо);
- Наявність зовнішньоклітинних структур (капсула, джгутики, війки);
- Спороутворення та характеристика спор;
- Реакція на проведені фарбування (визначення грампозитивності, стійкості до кислот, лугів, спирту тощо);
- Організація та розташування клітин у колоніях та плівках (утворення пар, ланцюгів, скупчень).

За цими ознаками можна ідентифікувати та класифікувати мікроорганізми.

2.2.5. Виділення чистих колоній мікроорганізмів.

Виділення чистих колоній мікроорганізмів зі змішаних культур проводиться за наступною схемою:

1. Посів змішаної культури на живильні середовища;
2. Ідентифікація колоній, що вирости органолептично, мікроскопічно, генетично;
3. Відбір культури;
4. Розчинення культури в дистильованій воді;
5. Посів на чисте середовище методом паралельних штрихів (рис. 2.2.5.1);
6. Оцінка результатів.

Посів методом паралельних штрихів: краплю суспензії колонії наносять біля краю чашки Петрі; профламбованою бактеріологічною петлею від краплі проводять декілька паралельних штрихів; чашку прокручують і від кінців

попередніх штрихів профламбованою петлею проводять знову паралельні лінії і так повторюють 4-5 разів. Чашку перевертають догори дном і термостатують за 30-36 °С протягом 1-3 діб.

З першого разу може не вдатись посіяти чисту культуру. Тоді вище згадані дії повторюють до отримання бажаного результату.

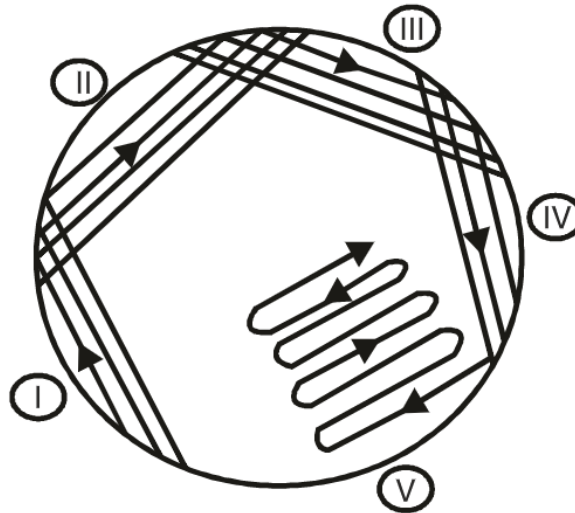


Рис. 2.2.5.1 Схема посіву мікроорганізмів на чашку Петрі методом паралельних штрихів

2.2.6. Статистична обробка даних.

Для того, щоб забезпечити достовірність результатів, досліди проводять тричі, а середнє значення розраховують за формулою:

$$M = \frac{m_1 + m_2 + m_3}{3}, \text{ де}$$

M – середнє значення всієї сухої біомаси;

m_1, m_2, m_3 – значення біомаси в результаті кожного з дослідів, сума яких ділиться на кількість тих самих дослідів.

2.2.7. Виявлення каталазних властивостей культури.

Каталаза – це фермент, який можуть продукувати мікроорганізми. Він відповідає за розщеплення Гідроген пероксиду на воду та Кисень.

Існує два способи визначення каталазних властивостей культури мікроорганізмів. Для першого на предметне скельце наносять краплю 3%-го розчину Гідроген пероксиду та суспендують в ній тест-культуру. Для другого

перекис наносять безпосередньо на колонію тест-культури на агаровому середовищі.

Результат оцінюють за виділенням газу – Кисню. Якщо мікроорганізми володіють каталазною активністю, то відбувається активне піноутворення протягом 1-5 хв – реакція позитивна (рис. 2.2.7.1) і навпаки, якщо мікроорганізми не мають каталазних властивостей, то піна не утворюється – реакція негативна.

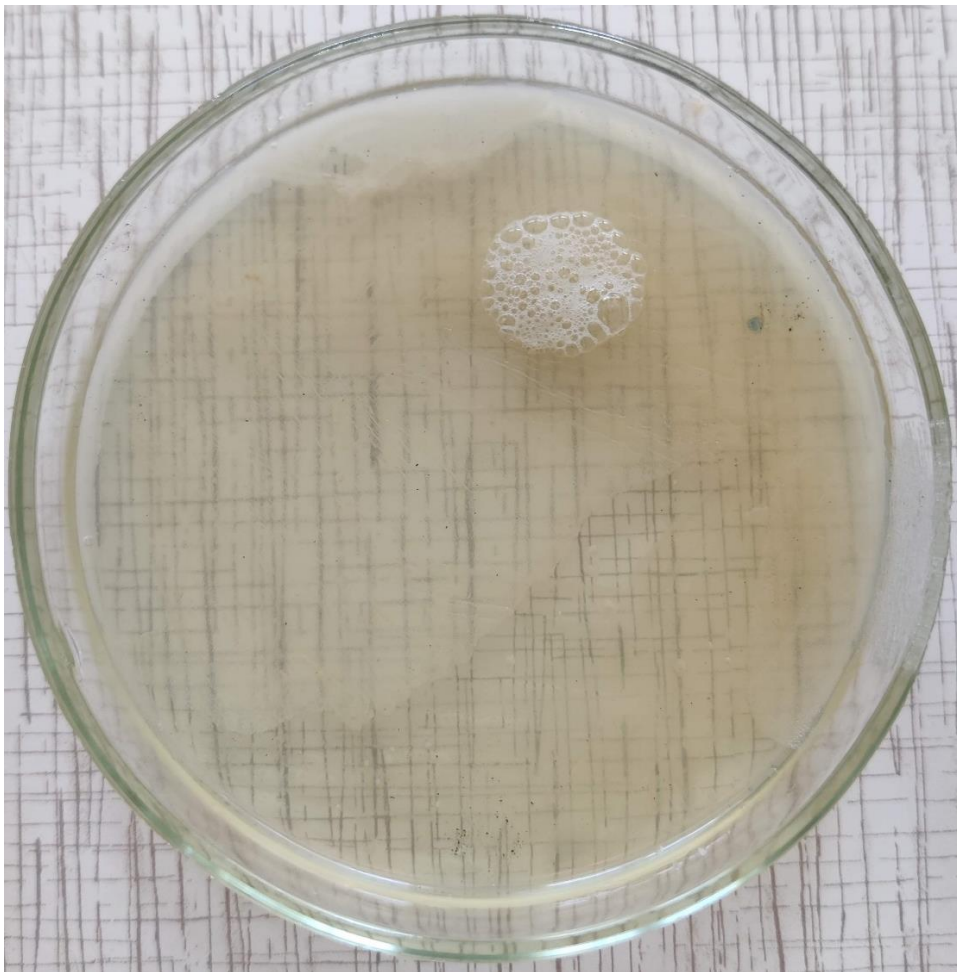


Рис. 2.2.7.1 Результат тестування на каталазні властивості виділеної чистої культури *Bacillus subtilis* – утворення піни свідчить про позитивну реакцію

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1 Оцінка хімічного складу біодобрива “Гуміфренд”

Хімічний склад біопрепарату “Гуміфренд” визначався за допомогою приладу для капілярного електрофорезу “КАПЕЛЬ-105М”. В якості дослідних зразків використовували робочий розчин біопрепарату в дистильованій воді (0,35 мл “Гуміфренд” на 100 мл води).

Хімічний склад робочого розчину Гуміфренду порівнювався з хімічним складом робочого розчину біогумусу, дослідження якого проводилось в нашій лабораторії.

За результатами дослідження можна зробити висновок, що “Гуміфренд” містить високу кількість іонів: NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_3^{2-} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} . Результати дослідження висвітлено у таблиці 3.1.1.

За порівняння з робочим розчином біогумусу можна зробити висновки, що робочий розчин біопрепарату “Гуміфренд” є багатшим сполуками Амонію на 34,6 мг/л, Калію на 2040 мг/л, Натрію на 40 мг/л, Магнію на 43 мг/л, Сульфуру на 142,9 мг/л. Сполук Кальцію в робочому розчині біогумусу на 356 мг/л більше, ніж в робочому розчині Гуміфренду. Кількість сполук Фосфору в обох зразках однакова – менше 50 мг/л.

Таблиця 3.1.1

Вміст мінеральних елементів у зразку біопрепарату “Гуміфренд”

Назва показника	Вміст в зразку
Амоній	71,0 мг/л
Калій	3290 мг/л
Натрій	190 мг/л

Магній	90 мг/л
Кальцій	704 мг/л
Сульфур	215 мг/л
Фосфор	Менше 50 мг/л

Також ми дослідили вміст амінокислот у біопрепараті “Гуміфренд” (табл. 3.1.2). Порівняно з робочим розчином біогумусу робочий розчин біопрепарату “Гуміфренд” поступається за вмістом амінокислот: аргініну на 15 мг/л, проліну на 4,6 мг/л, гліцину на 6 мг/л. Проте, в ньому більше таких амінокислот, як: лізин на 34 мг/л, тирозин на 5,6 мг/л, фенілаланін на 3,4 мг/л, лейцин, ізолейцин на 10,1 мг/л, валін на 1,4 мг/л, треонін на 8,1 мг/л, серін на 2,4 мг/л, аланін на 12,2 мг/л. Такі амінокислоти, як гістидин і метіонін, виявлені в Гуміфренді, але їх немає в біогумусі.

Підібраний склад мікроорганізмів надає властивостей профілактичного засобу і біодобрива біопрепарату “Гуміфренд”. Припускаємо, що досліджуваний біопрепарат можна збагатити ризобактеріями (наприклад, представниками роду *Streptomyces*), що покращить профілактичні та стимулюючі ріст рослин властивості Гуміфренду.

Таблиця 3.1.2

Вміст амінокислот у зразку біопрепарату “Гуміфренд”

Назва показника	Вміст в зразку
аргінін	15 мг/л
лізин	52 мг/л
тирозин	8 мг/л
фенілаланін	9 мг/л
гістидин	4 мг/л
Лейцин, ізолейцин	19 мг/л
метіонін	5 мг/л
валін	6,6 мг/л
пролін	3,9 мг/л
треонін	15 мг/л
серін	10 мг/л

аланін	19 мг/л
гліцин	17 мг/л

3.2 Ідентифікація колоній мікроорганізмів

Ідентифікацію проводили за допомогою визначника Берджі.

На рисунках зображено результати дослідження морфологічних характеристик колоній та клітин бактерій *Bacillus subtilis* (рис. 3.2.1.1), *Bacillus mucilaginosus* (рис. 3.2.2.1), *Paenibacillus macerans* (рис. 3.2.3.1), *Bacillus megaterium* (рис. 3.2.4.1), *Paenibacillus polymyxa* (рис. 3.2.5.1). А саме: фото колонії на агаровому середовищі, фото під мікроскопом в результаті фарбування за Грамом та фото під мікроскопом в результаті фарбування за Цілем-Нільсеном.

3.2.1. *Bacillus subtilis*.

Колонія *Bacillus subtilis*, зображена на рисунку 3.2.1.1 вирощена на агаровому середовищі LA на 7-й день після посіву.

Колонії середнього розміру, напівпрозорі, білого кольору, сухі, дрібнозморшкуваті, матові. Форма неправильна з округлими хвилястими краями. Реакція на каталазу – позитивна.

Клітини під мікроскопом паличкоподібні з круглими кінцями, грампозитивні, не стійкі до кислот.


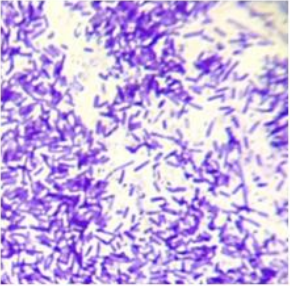
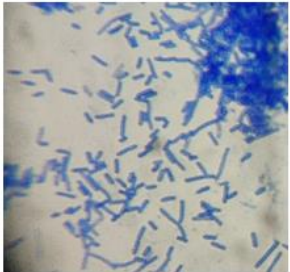
Колонія	
Фарбування за Грамом	
Фарбування за Цілем-Нільсеном	

Рис. 3.2.1.1 Результати дослідження *Bacillus subtilis*

Чисті колонії *Bacillus subtilis* на живильному середовищі LA білі, напівпрозорі, сухі, дрібнозморшкуваті (рис. 3.2.1.2).



Рис. 3.2.1.2 Чисті колонії *Bacillus subtilis* на живильному середовищі
LA

3.2.2. *Bacillus mucilaginosus*.

Колонія *Bacillus mucilaginosus*, зображена на рисунку 3.2.2.1 вирощена на агаровому середовищі LA на 7-й день після посіву.

Колонії дрібні, круглої форми з хвилястими краями, непрозорі, бежевого кольору з темною серединою. Поверхня матова, суха. Реакція на каталазу – позитивна.

Клітини під мікроскопом паличкоподібні з круглими кінцями, грамнегативні, не кислотостійкі.

<p style="text-align: center;">Колонія</p>	
<p style="text-align: center;">Фарбування за Грамом</p>	
<p style="text-align: center;">Фарбування за Цілем-Нільсеном</p>	

Рис. 3.2.2.1 Результати дослідження *Bacillus mucilaginosus*

Чисті колонії *Bacillus mucilaginosus* на живильному середовищі LA бежево-жовті, дрібнозморшкуваті, непрозорі, сухі (рис. 3.2.2.2).



Рис. 3.2.2.2 Чисті колонії *Bacillus mucilaginosus* на живильному середовищі LA

3.2.3. *Paenibacillus macerans*.

Колонія *Paenibacillus macerans*, зображена на рисунку 3.2.3.1 вирощена на агаровому середовищі LA на 11-й день після посіву.

Колонії середнього розміру, неправильної розгалуженої форми з хвилястими краями, бежевого кольору, мутні. В середині колонії темніші. Поверхня гладка, блискуча. Реакція на каталазу – позитивна.

Клітини під мікроскопом паличкоподібні з круглими кінцями, грамнегативні, не кислотостійкі.


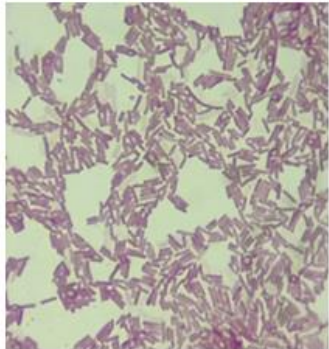
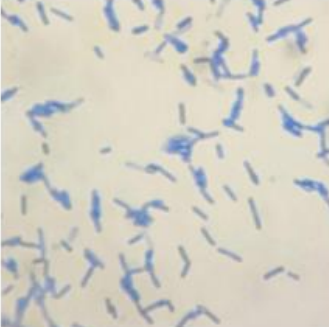
Колонія	
Фарбування за Грамом	
Фарбування за Цілем-Нільсеном	

Рис. 3.2.3.1 Результати дослідження *Paenibacillus macerans*

Чисті колонії *Paenibacillus macerans* на живильному середовищі LA молочного кольору, напівпрозорі, поверхня дрібнозморшкувата, блискуча (рис. 3.2.3.2).



Рис. 3.2.3.2 Чисті колонії *Paenibacillus taserans* на живильному середовищі LA

3.2.4. *Bacillus megaterium*.

Колонія *Bacillus megaterium*, зображена на рисунку 3.2.4.1 вирощена на агаровому середовищі LA на 12-й день після посіву.

Колонії дрібні, помаранчевого кольору, непрозорі, неправильної форми з заокругленими кінцями. Реакція на каталазу – позитивна.

Клітини під мікроскопом паличкоподібні з круглими кінцями, грампозитивні, не кислотостійкі.


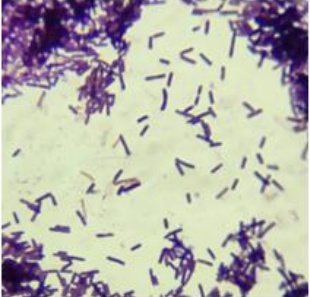
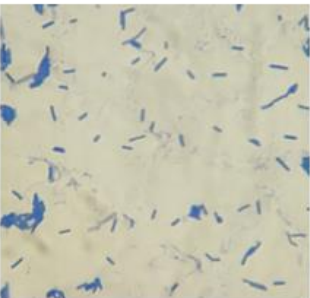
Колонія	
Фарбування за Грамом	
Фарбування за Цілем-Нільсеном	

Рис. 3.2.4.1 Результати дослідження *Bacillus megaterium*

Чисті колонії *Bacillus megaterium* на живильному середовищі LA молочно-білого кольору, непрозорі, глянцеві (рис. 3.2.4.2).



Рис. 3.2.4.2 Чисті колонії *Bacillus megaterium* на живильному середовищі LA

3.2.5. *Paenibacillus polytuxa*.

Колонія *Paenibacillus polytuxa*, зображена на рисунку 3.2.5.1 вирощена на агаровому середовищі LA на 12-й день після посіву.

Колонії маленького розміру, білі, непрозорі, круглої форми. Поверхня матова. Реакція на каталазу – позитивна.

Клітини під мікроскопом паличкоподібні з круглими кінцями, грампозитивні, не кислотостійкі.



<p align="center">Колонія</p>	
<p align="center">Фарбування за Грамом</p>	
<p align="center">Фарбування за Цілем-Нільсеном</p>	

Рис. 3.2.5.1 Результати дослідження *Paenibacillus polytuxa*

Чисті колонії *Paenibacillus polytuxa* на живильному середовищі LA білі, непрозорі, глянцеві (рис. 3.2.5.2).



Рис. 3.2.5.2 Чисті колонії *Paenibacillus polymyxa* на живильному середовищі LA

3.3 Підбір оптимального середовища для ізолювання мікроорганізмів за розрахунком їх колонієутворюючих одиниць (КУО)

Мікроорганізми висіяно на два живильні середовища різного складу: LA та SG-1. Нашим завданням було дослідити, яке з них буде більш оптимальним для скринінгу та культивування мікроорганізмів, що входять до складу біопрепарату “Гуміфренд”, а саме *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus polymyxa*. Результати дослідження кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) мікроорганізмів за інкубування на різних живильних середовищах посіву взірців біопрепарату “Гуміфренд” висвітлено у таблиці 3.3.1. Підрахунок колоній здійснювався за допомогою органолептичного методу, а середнє значення розраховувалось за загальноприйнятою методикою статистичної обробки даних.

Таблиця 3.3.1

**Дослідження кількості колонієутворюючих одиниць (КУО)
мікроорганізмів за інкубування на різних живильних середовищах посіву
взірців біопрепарату “Гуміфренд”**

Мікроорганізми	LA	SG-1
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	Розведення: 10^{-1} КУО = 2 ± 1	-
<i>Bacillus subtilis</i>	Розведення: 10^{-3} КУО = 8 ± 1	-
<i>Paenibacillus macerans</i>	Розведення: 10^{-3} КУО = 6 ± 1	-
<i>Bacillus megaterium</i>	Розведення: 10^{-4} КУО = 4 ± 1	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Розведення: 10^{-4} КУО = 3 ± 1	-

За розрахунком колонієутворюючих одиниць можна зробити висновок, що середовище LA є більш оптимальним для скринінгу мікроорганізмів біопрепарату “Гуміфренд” і культивування бактерій роду *Bacillus* та *Paenibacillus*, аніж SG-1.

За результатами дослідження бачимо, що на середовищі LA виявлено: 2 ± 1 колонія *Bacillus mucilaginosus* при посіві Гуміфренду розведеного до 10^{-1} , 8 ± 1 колонія *Bacillus subtilis* при посіві Гуміфренду розведеного до 10^{-3} , 6 ± 1 колонія *Paenibacillus macerans* при посіві Гуміфренду розведеного до 10^{-3} , 4 ± 1 колонія *Bacillus megaterium* при посіві Гуміфренду розведеного до 10^{-4} , 3 ± 1 колонія *Paenibacillus polymyxa* при посіві Гуміфренду розведеного до 10^{-4} .

На середовищі SG-1 не виявлено жодної колонії вищезгаданих мікроорганізмів.

За кількістю КУО можна розрахувати кількість життєздатних клітин мікроорганізмів у всьому об’ємі біопрепарату (табл. 3.3.2) за формулою:

$$M = \frac{KYO \cdot V_{\text{пр}}}{V_{\text{пос}} \cdot R}, \text{ де}$$

M – загальна кількість мікроорганізмів у біопрепараті;

$V_{\text{пр}}$ – загальний об'єм проби (в нашому випадку 1000 мкл = 1 мл)

$V_{\text{пос}}$ – об'єм проби, який був посіяний (в нашому випадку 100 мкл = 0,1 мл);

R – степінь розведення (від 10^{-1} до 10^{-5});

Мікробне число на 1 мл біопрепарату (табл. 3.3.2) розраховується за наступною формулою:

$$M1 = \frac{M}{V}, \text{ де}$$

M1 – мікробне число в одному мл біопрепарату;

M – загальне мікробне число;

V – об'єм біопрепарату в мл.

Таблиця 3.3.2

Розрахунок життєздатних клітин мікроорганізмів у біопрепараті

	У всьому об'ємі	В 1 мл
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	200 ± 1 кл.	1 ± 1 кл.
<i>Bacillus subtilis</i>	80 000 ± 1 кл.	160 ± 1 кл.
<i>Paenibacillus macerans</i>	60 000 ± 1 кл.	120 ± 1 кл.
<i>Bacillus megaterium</i>	400 000 ± 1 кл.	800 ± 1 кл.
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	300 000 ± 1 кл.	600 ± 1 кл.

За таблицею 3.3.2 бачимо, що бактерії виду *Bacillus megaterium* переважають у біопрепараті – 400 000 ± 1 життєздатних клітин у всьому об'ємі біопрепарату або 800 ± 1 кл на 1 мл біопрепарату, а *Bacillus mucilaginosus* в ньому містяться у найменшій кількості – 200 ± 1 життєздатних клітин у всьому об'ємі біопрепарату або 1 ± 1 кл на 1 мл біопрепарату.

Бактерії *Bacillus megaterium* продукують фітогормони цитокініни, що стимулюють ріст рослин; відіграють важливу роль у транслокації поживних речовин з ґрунту до рослин, в тому числі у фосфатному та нітратному живленні рослин. Вони виступають агентами у біоконтролі захворювань рослин, викликаних патогенними мікроорганізмами такими, як *Mycosphaerella graminicola*, *Ralstonia solanacearum*. Бактерії *Bacillus megaterium* підвищують стресостійкість рослин до таких несприятливих умов середовища, як посуха, засоленість ґрунтів, низька температура. Також вони деградують пестициди та інші забруднюючі речовини, сприяючи очищенню ґрунту та покращенню умов для росту та розвитку рослин.

Отже, і біопрепарат “Гуміфренд” володіє вищезгаданими властивостями.

3.4 Технологічна схема отримання біопрепарату для захисту рослин з вмістом бактерій роду *Bacillus* та *Paenibacillus*

Основу біопрепаратів для захисту рослин складають мікроорганізми. Для їх виготовлення спершу нарощують біомасу необхідних бактерій. Нарощування посівного матеріалу відбувається в лабораторії. Спершу чисту культуру вирощують на агарових середовищах, потім її намножують, вирощуючи в колбах на рідкому середовищі і далі у малих ферментерах. На кожному етапі перевіряють чистоту культури, дотримуються умов асептики, а також забезпечують оптимальні умови для росту і розвитку клітин бактерій.

Далі отриманий матеріал ферментують на рідких живильних середовищах, оскільки вони є більш досконалішими в порівнянні з агаровими. Сам процес культивування проходить у промислових ферментерах. Ферментери оснащені патрубками для подачі живильного середовища, піногасників, стерильного повітря для забезпечення аерації та часткового перемішування, мішалками для перемішування. Вони також оснащені патрубками для відтоку продуктів життєдіяльності мікроорганізмів, які можуть нашкодити росту та розвитку біомаси, приладами для вимірювання та регулювання температури,

pH, тиску, концентрації кисню тощо. Також у конструкції ферментера передбачена система мийки та стерилізації насиченою водяною парою.

Схема ферментера зображена на рисунку 3.4.1.

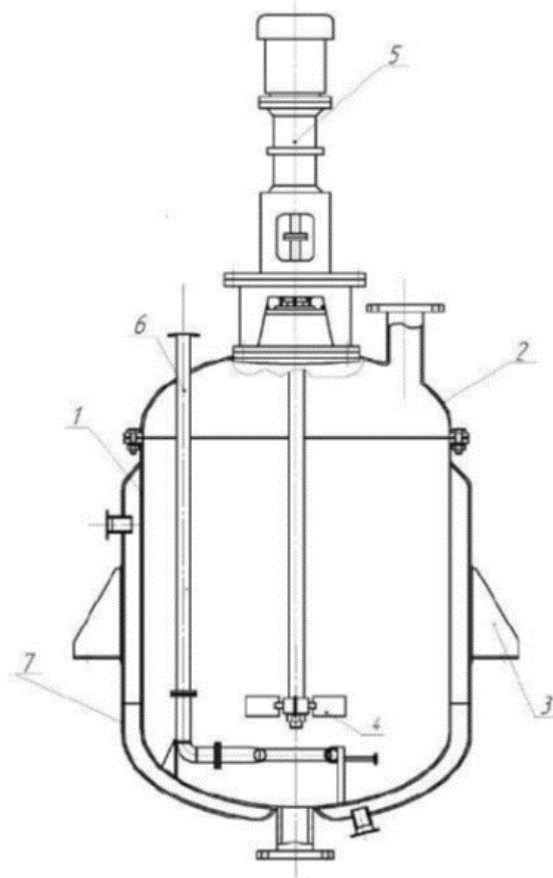
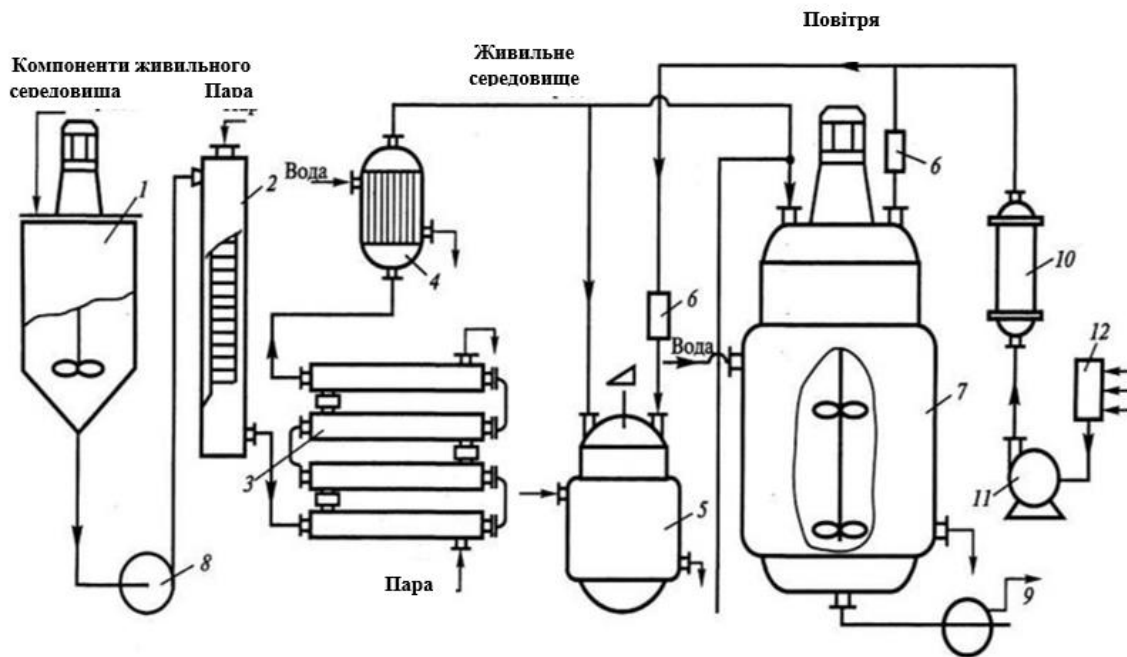


Рис. 3.4.1 Схема ферментера: 1 – корпус, 2 – кришка, 3 – опора, 4 – мішалка, 5 – привод, 6 – барботер, 7 – сорочка

Глибинне культивування буває трьох видів:

1. Періодичне – у ферментер завантажують одразу все живильне середовище та посівний матеріал, ферментують, а потім зливають вміст ферментера і проводять наступні маніпуляції для виділення цільового продукту;
2. Безперервне – живильне середовище постійно подається в біореактор і так само постійно з ферментера виводиться культуральна рідина з біомасою;
3. Напівбезперервне – частина вмісту біореактора час від часу вилучається, а замість цього додається свіже живильне середовище.

Для культивування мікроорганізмів роду *Bacillus* та *Paenibacillus* варто використовувати періодичне глибинне культивування (рис. 3.4.2) у ферментерах об'ємом 1000 л на дріжджеполісахаридному середовищі в аеробних умовах з постійним перемішуванням (швидкість обертання мішалки – 200 - 220 об/хв). Живильне середовище та посівний матеріал вносять поступово, постійно дотримуючись умов асептики та контролюючи температуру і рН. Заповнення ферментера дорівнює 70%. Аерація забезпечується пристроєм – барботером, до якого подається стерильне повітря під тиском. Температура культивування встановлюється 30-36 °С. На початку культивування рН становить 6,2-6,5, а наприкінці підвищується до 8,0-8,5. Для регуляції рівня рН культуральну рідину нейтралізують до 6,0-6,2, додаючи буферний розчин лугу.



1 – змішувач живильного середовища; 2 – колонка для безперервного стерилізування потоку живильного середовища; 3 – теплообмінник; 4 – холодильник; 5 – інокулятор; 6 – фільтр для очищення повітря; 7 – ферментер; 8-9 – насоси; 10 – фільтр для попереднього очищення повітря; 11 – компресор; 12 – основний фільтр для очищення повітря.

Рис. 3.4.2 Принципова технологічна схема глибинного культивування

Після процесу ферментації культуральна рідина піддається постферментаційній обробці. Для цього можуть додавати до культуральної рідини додаткові добавки (мікро-, макроелементи, вітаміни тощо) і

використовувати як готовий продукт. Або ж клітини мікроорганізмів концентрують, використовуючи такі методи, як фільтрація, флотація, сепарація, центрифугування тощо. Концентрат клітин можуть піддавати ліофільній сушці на розпилюючій сушарці для отримання сухого препарату.

Готовий продукт розливають/розсипають по тарам, наклеюють етикетки, фасують, транспортують та зберігають.

Важливим етапом біотехнологічних виробництв, пов'язаних з культурами мікроорганізмів є знешкодження відходів. Для знищення спор та живих клітин використовують методи стерилізації, обробляють соляною кислотою або розчином їдкого Натрію до рН = 7 та зливають у каналізацію. Миючі та дезинфікуючі розчини нейтралізують і зливають в каналізаційну систему. Вентиляційне і нестерильне повітря знезаражують. Тверді відходи (одяг, склобій, пакувальний матеріал тощо) утилізують на міському сміттєзвалищі.

Технологія отримання біопрепаратів на основі культур мікроорганізмів *Bacillus subtilis*, *Bacillus mucilaginosus*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus polymyxa* включає наступні етапи (рис. 3.4.3):

1. Передферментаційний етап:

- Підготовка обладнання;
- Приготування живильних середовищ;
- Приготування піногасників;
- Стерилізація;
- Нарощування маточної культури – посівного матеріалу;

2. Ферментація

3. Постферментаційний етап:

- Виділення та очистка цільового продукту;
- Концентрування продукту;
- Стабілізація і фасування продукту;
- Утилізація відходів.

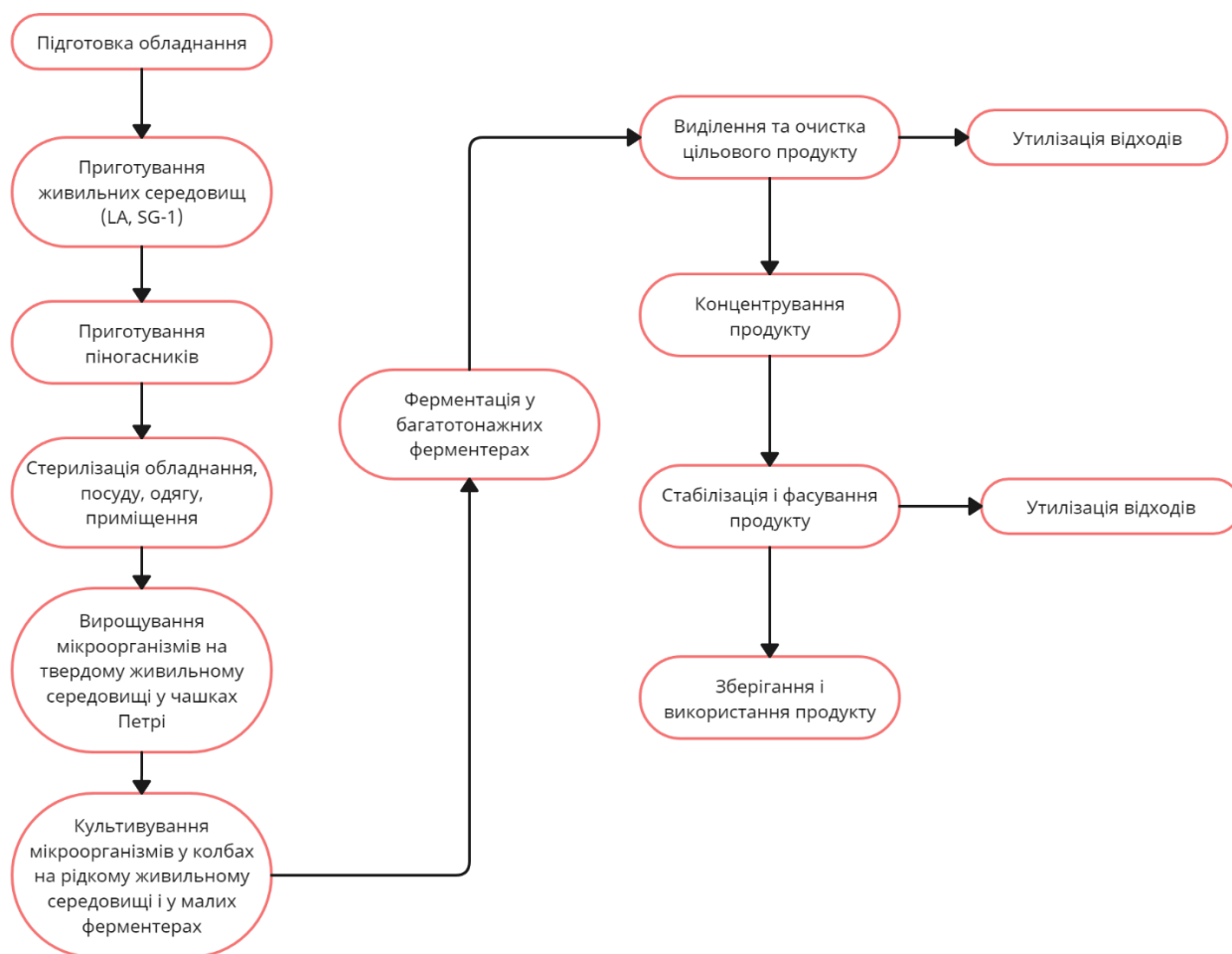


Рис. 3.4.3 Технологічна схема отримання біопрепарату для захисту рослин

ВИСНОВКИ

1. У складі біопрепарату “Гуміфренд” ідентифіковано та ізольовано мікроорганізми: *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus polymyxa*. Усі перераховані мікроорганізми є паличками з округлими кінцями, спроутворюючими, не кислотостійкими, з позитивною реакцією на каталазу. З них грампозитивні: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus polymyxa*. *Bacillus mucilaginosus* та *Paenibacillus macerans* – грамнегативні. *Bacillus subtilis* поліпшують фосфорне живлення рослин. *Bacillus megaterium* володіють антагоністичними властивостями проти патогенних мікроорганізмів, підвищують імунітет рослин, відіграють важливу роль в циклі Карбону та Фосфору. *Paenibacillus polymyxa* здатні фіксувати атмосферний Нітроген і перетворювати його у форми, які засвоюються рослинами; продукують гормони для росту рослин (цитокініни, ауксини, гібереліни); синтезують антибіотичні речовини для захисту від фітопатогенів, підвищують імунітет ризосфери. *Bacillus mucilaginosus* здатні перетворювати Калій і Фосфор у форми, які легко засвоюються рослинами. *Paenibacillus macerans* фіксують та ферментують Нітроген.
2. В результаті хімічного аналізу робочого розчину біопрепарату для захисту рослин “Гуміфренд” у його складі виявлено сполуки Амонію, Калію, Натрію, Магнію, Кальцію, Сульфур у та Фосфору. З них найбільше: сполук Калію – 3290 мг/л, Кальцію – 704 мг/л, Сульфур у – 215 мг/л та Натрію – 190 мг/л. Також Гуміфренд багатий на амінокислоти, а саме: аргінін, лізин, тирозин, фенілаланін, гістидин, лейцин, ізолейцин, метіонін, валін, пролін, треонін, серін, аланін, гліцин. З них найбільше виявлено: лізину – 52 мг/л, аланіну – 19 мг/л, лейцину, ізолейцину - 19 мг/л, гліцину – 17 мг/л, треоніну та аргініну – по 15 мг/л.

3. За розрахунком колонієутворюючих одиниць можна зробити висновок, що середовище LA є більш оптимальним для скринінгу мікроорганізмів біопрепарату “Гуміфренд” і культивування бактерій роду *Bacillus* та *Paenibacillus*, аніж SG-1. Оскільки на середовищі LA виявлено: 2 ± 1 колонія *Bacillus mucilaginosus* (10^{-1}), 8 ± 1 колонія *Bacillus subtilis* (10^{-3}), 6 ± 1 колонія *Paenibacillus macerans* (10^{-3}), 4 ± 1 колонія *Bacillus megaterium* (10^{-4}), 3 ± 1 колонія *Paenibacillus polytuxa* (10^{-4}). В той час, як на середовищі SG-1 не виявлено жодної колонії вищезгаданих мікроорганізмів. Бактерії виду *Bacillus megaterium* переважають у біопрепараті, а *Bacillus mucilaginosus* в ньому містяться у найменшій кількості.
4. Для культивування мікроорганізмів роду *Bacillus* та *Paenibacillus* варто використовувати періодичне глибинне культивування у ферментерах об’ємом 1000 л на дріжджеполісахаридному середовищі в аеробних умовах з постійним перемішуванням (швидкість обертання мішалки – 200 - 220 об/хв). Температура культивування встановлюється 30-36 °C. На початку культивування рН становить 6,2-6,5, а наприкінці підвищується до 8,0-8,5. Для регуляції рівня рН культуральну рідину нейтралізують до 6,0-6,2, додаючи буферний розчин лугу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Beneduzi A., Ambrosini A. & Passaglia M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology: журн.* 2012. 35/4. С. 1044-1051.
2. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
3. Kildea, S. *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of septoria tritici blotch of wheat // *Biological Control: журн.* 2008, № 47. С. 37–45.
4. Nguyen, M. T., Ranamukhaarachchi, S. L. & Hannaway, D. B. Efficacy of Antagonist Strains of *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae*, *Pichia guilliermondii* and *Candida ethanolica* against Bacterial Wilt Disease of Tomato // *Journal of Phytological Research: журн.* 2011, № 3. С. 1–10.
5. Randy Ortíz-Castro, Eduardo Valencia-Cantero, and José López-Bucio. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Landes Bioscience: журн.* 2018. 3:4. С. 263-265.
6. Біопрепарати – альтернативний захист сільськогосподарських культур від хвороб та шкідників URL:<https://consumer-cv.gov.ua/blog/2019/06/11/biopreparaty-alternatyvnyj-zahyst-silskogospodarskyh-kultur-vid-hvorob-ta-shkidnykiv/>
7. Біопрепарати для захисту рослин: види і способи застосування URL:<https://biochem-service.com.ua/blog/biopreparati-dlya-zahistu-roslin-vidi-i-sposobi-zastosuvannya/>
8. В.Г. Герасименко, М.О. Гера сименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під общ. ред. В.Г. Герасименка. Біотехнологія: Підручник, К.: Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.
9. Волкогон В.В. Мікробіологія у сучасному аграрному виробництві // *Сільськогосподарська мікробіологія журн.* 2005. №1. С. 6-29.
10. Волкогон В.В., Скріпка О.М., Токмакова Л.М. Деклараційний патент України № 110252 від Спосіб виготовлення біомінеральних добрив з

властивостями активізації процесу засвоєння рослинами сполук біогенних елементів з добрив. Опубл. 26.09.2016.

11. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв: Навч. посібник. – К.: НУХТ, 2022. 373 с.
12. Климнюк С.І., Ситник І.О., Творко М.С., Широбоков В.П. Практична мікробіологія: Посібник. Тернопіль “Укрмедкнига”, 2004. 440 с.
13. Козировська Н. О. Механізми природної імунності рослини // Біополімери і клітина: журн. 2006. 22/2. С. 91-101.
14. Косилович Г. О., Коханець О. М. Інтегрований захист рослин : Навч. Посібник. – Львів: Львівський національний аграрний університет, 2010. 165 с.
15. Костюченко Н.І. Біотехнологічні аспекти раціонального природокористування: Навч. посібник. – Запоріжжя: ЗНУ, 2018. 116 с.
16. Крутякова В.І., Гулич О.І., Пилипенко Л.А. Біологічний метод захисту рослин: перспективи для України // Вісник аграрної науки журн. 2018. № 11(788). С. 159 – 168.
17. Крутякова В.І., Гулич О.І., Янсе Л.А. Стан і проблеми ринку біологічних засобів захисту рослин в Україні // Вісник аграрної науки журн. 2023. №1 (838). С. 30-39.
18. Курдиш І.К., Рой А.О. Деклараційний патент України № 54923А від Штамм *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального препарату для рослинництва. Опубл. 17.03.2003.
19. Лапа С.В., Дрозда В.Ф., Лапа О.М. Деклараційний патент України № 13772 від Препарат для захисту рослин від збудників хвороб “фруктоспорин філд”. Опубл 17.04.2006.
20. М.О. Білик. Біологічний захист рослин від шкідливих організмів: підручник. Харків “Майдан”, 2022. 356 с.
21. Мацай Н.Ю. Основи біотехнології: Підручник. Луганськ, 2011. 153 с.

22. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Бородай В.В., Коломієць Ю.В. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник. Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. 252 с.
23. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу “Основи мікробіології”. Під загальною редакцією Ставської С.С., Вембер В.В., 2012. 44 с.
24. Методичні вказівки до проведення лабораторних занять з предмету “Загальна мікробіологія і вірусологія”. Під заг. ред. Ястремської Л. С. Л 124 К.: НАУ, 2017. 144 с.
25. Рой А.О., Мацелюх О.В., Зубко П.Д., Варбанець Л.Д., Курдиш І.К. Протеолітична активність фосфатмобілізувальних бактерій роду *Bacillus* та їх вплив на деяких фітофагів // Сільськогосподарська мікробіологія журн. 2014. Вип. 20. С. 66-73.
26. Рой А.О., Царенко І.Ю., Курдиш І.К. Деклараційний патент України № 42415 від Поживне середовище для отримання біомаси бактерій роду *bacillus*. Опубл. 10.07.2009.
27. Світовий досвід застосування біологічного методу захисту рослин та перспективи в Україні. URL:<https://svgr.gov.ua/news/1666084314/>
28. Ткаленко Г.М., Борзих О.І., Ігнат В.В. Сучасний стан застосування біологічних засобів захисту рослин в агроценозах України // Вісник аграрної науки журн. 2020. № 12(813). С. 18–25.
29. ТУ У 20.1-38010942-004:2017
30. Чайковська В.В., Опришко Н.О., Чабанюк Я.В., Бунас А.А., Шерстобоева О.В., Калинич О.М. Деклараційний патент України № 79741 від Речовина для передпосівної обробки насіння бобових культур. Опубл. 25.04.2013
31. Шаловило Ю. І. Бактеріальна біоінокуляція як спосіб підвищення морфометричних показників однорічних сіянців сосни звичайної // Науковий вісник НЛТУ України журн. 2019, т. 29, № 9. С. 22–26.