

УДК 579.64:632.937.1

РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТИВНОЙ ФОРМЫ БИОПЕСТИЦИДА «БЕТАПРОТЕКТИН»

А. В. БЕРЕЖНАЯ¹⁾

¹⁾Институт микробиологии НАН Беларуси, ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Беларусь

В ходе исследований проведена оценка стабильности и эффективности действия разработанной сухой препаративной формы биоpestицида «Бетапротектин» при долгосрочном хранении. В качестве стабилизаторов использованы минеральные добавки – мел, измельченный трепел и доломитовая мука. Установлено, что наиболее перспективным носителем для получения «Бетапротектина» в сухой форме является доломитовая мука, добавление которой позволяет увеличить срок хранения биопрепарата до 12 мес.

Ключевые слова: биоpestицид; препаративная форма; носитель; трепел; доломитовая мука.

DEVELOPMENT OF FORMULATION OF BIOPESTICIDE «BETAPROTECTIN»

A. V. BEREZHNYAYA^a

^aInstitute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,
2 Kuprevič Street, Minsk 220141, Belarus

During research, the stability and efficacy of the action in the long-term storage of dry formulation of the biopesticide «Betaprotectin» was evaluated. As carriers for dry formulations were tested two mineral additives were tested – tripoli powder and dolomite flour. It has been established that the most promising carrier for getting dry formulation of «Betaprotectin» is a dolomite flour. Addition of this mineral component allows prolonging the shelf life of the biopreparation till 12 months and stabilizes its pH level.

Key words: biopesticide; dry formulation; carrier; tripoli powder; dolomite flour.

Введение

Одним из путей повышения стабильности и эффективности действия биологических средств защиты растений является научно аргументированный подбор их компонентного состава, основанный на понимании механизмов действия вносимых добавок. Многие биопрепараты, созданные на основе микроорганизмов, высокочувствительны к различным факторам окружающей среды, таким как солнечный свет, высушивание, перепады температур, критические значения pH. Защитить клетки продуцента от их негативного влияния можно путем добавления в препарат определенных компонентов-протекторов. Доказано положительное влияние неорганических минеральных добавок на жизнеспособность и антагонистическую активность бактерий рода *Vacillus* и эффективность биопрепаратов на их основе [1]. Имобилизация бактерий на минеральном носителе обеспечивает им дополнительную механическую защиту,

Образец цитирования:

Бережная А. В. Разработка препаративной формы биоpestицида «Бетапротектин» // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 69–75.

For citation:

Berezhnaya A. V. Development of formulation of biopesticide «Betaprotectin». *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 69–75 (in Russ.).

Автор:

Анастасия Валерьевна Бережная – научный сотрудник лаборатории средств биологического контроля.

Author:

Anastasiya V. Berezhnaya, researcher at the laboratory of biological control agents.
domilazo@bk.ru

предотвращает агрегирование спор и обуславливает стабильность биопрепаратов при хранении. Кроме того, многие микро- и макроэлементы, входящие в состав минеральных протекторов, становятся более доступными для растений при их совместном внесении в почву с биопрепаратами [2].

Большинство биопрепаратов на основе клеток бактерий рода *Bacillus* выпускаются в виде жидкости, текучей пасты или смачивающегося порошка. Жидкая форма удобна для применения, но, как правило, имеет небольшой срок годности, занимает много места при хранении и транспортировке. Кроме того, эта форма обладает существенным недостатком при внесении в грунт или на поверхность растений: клетки штамма – продуцента биопрепарата не защищены от воздействия внешних физических факторов и микроорганизмов, которые уже колонизировали субстрат до внесения биопрепарата. Паста обладает лучшей эффективностью, чем жидкая форма, за счет более высокой концентрации клеток на единицу объема, но также имеет небольшой срок хранения. Сухие формы биопрепаратов (порошок, смачивающийся порошок, таблетки) характеризуются большим сроком хранения и являются наиболее перспективными ввиду удобства их применения и простоты транспортировки [3]. Однако стоит учитывать, что высушивание клеток и спор без добавления протектора приводит к слеживанию и агрегированию компонентов препарата, кроме того, нейтральный носитель обеспечивает дополнительную защиту иммобилизованным на его поверхности клеткам от воздействия высоких температур [1].

В качестве перспективных добавок-протекторов для биопрепаратов можно рассматривать широкий спектр соединений: производные лигнина, активированный уголь, карбонатные минеральные размолы, природные цеолиты, в том числе трепел, диатомиты и др. Природные цеолиты – это группа близких по составу и свойствам минералов, обладающих уникальными адсорбционными, ионообменными, каталитическими и пролонгирующими свойствами. Стоит отметить, что на территории Беларуси имеются залежи различных цеолитов, что исключает необходимость их ввоза из-за границы и обуславливает их широкое применение. Трепел является уникальным комплексным минералом, содержащим практически все важные макро- и микроэлементы. Доказано, что адсорбирующая эффективность трепелов зависит не столько от их химического состава, сколько от способности содержащихся в них монтмориллонита и клиноптилолита поглощать и удерживать на своей поверхности молекулы других веществ, увеличивая их концентрации. Регулярное внесение трепела в почву предотвращает вымывание питательных элементов из плодородного слоя и повышает степень их усвоения культурными растениями. Доказано, что добавление трепела в состав органоминеральных удобрений улучшает физико-химические и агрохимические свойства почвы. Это минеральное соединение широко используется в животноводческой практике – в производстве кормовых добавок для животных и птицы. Опыт применения трепелов в хозяйствах Германии, Китая, России, США, Японии и других стран показал, что его включение в рационы животных повышает усвояемость кормов, укрепляет иммунитет, сокращает падеж молодняка, нормализует обмен веществ, предупреждает появление диспепсии [4; 5].

Доломитовая (известняковая) мука – это размельченный доломит, относящийся к группе карбонатных горных пород, распространенный минерал гидротермальных месторождений. Она широко применяется в качестве универсального удобрения – при длительном воздействии на почву доломитовая мука способствует нормализации уровня pH, повышает эффективность других вносимых удобрений, обогащает почву кальцием и магнием, связывает вредные радионуклиды, а также используется для борьбы с насекомыми, имеющими хитиновый покров. В биопрепаратах доломитовая мука повышает жизнеспособность входящих в их состав микроорганизмов и таким образом увеличивает их срок годности [6].

Широкое использование цеолитов и размолотых известняковых пород в качестве минеральных удобрений обусловлено тем, что эти природные соединения, обладая высокой адсорбционной и ионообменной емкостью, обеспечивают удержание влаги в пахотном слое почвы. Месторождения этих минералов разрабатываются на территории Республики Беларусь, что делает их применение экономически обоснованным.

В настоящей работе представлены результаты исследований по созданию сухой формы биопестицида «Бетапротектин», основой которого являются клетки, споры и метаболиты бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д (штамм выделен сотрудниками лаборатории средств биологического контроля Института микробиологии НАН Беларуси). Жидкая форма препарата с выраженным фунгицидным действием используется в Беларуси и за ее пределами для борьбы с кагатной гнилью сахарной и столовой свеклы, серой и прикорневой гнилями огурца и томата в закрытом грунте, гнилью корнеплодов, пенициллезом и фузариозом луковичных, клубнелуковичных и цветочных культур, диплоидозом хвойных. В ходе предыдущих исследований были оптимизированы условия глубинного культивирования бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д. Показано, что оптимальным консервантом является раствор NaCl в концентрации 4 %, при добавлении которого количество жизнеспособных клеток и спор, определяющих антифунгальную активность, сохранялось на высоком уровне при комнатной температуре в течение 3 мес. (полностью отвечал требованиям ТУ ВУ 100289066.045–2008) [7]. Анализ влияния различных прилипателей на адгезионную способность

клеток и спор штамма *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д позволил установить, что добавление хитозана или гидрогеля «Гисинар» в концентрации 1 % повышает эффективность действия биопестицида «Бетапротектин» в отношении возбудителей кагатной гнили корнеплодов сахарной свеклы на 15,0 и 2,9 % соответственно [8].

Цель настоящей работы – создание стабильной сухой формы биопрепарата «Бетапротектин» с увеличенным сроком хранения.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования служил штамм спорообразующих бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д – основа биопестицида «Бетапротектин».

В качестве тест-культуры для определения антагонистической активности штамма использовали фитопатогенный гриб *Fusarium oxysporum* БИМ F-381 – типовой возбудитель кагатной гнили сахарной свеклы, выделенный сотрудниками УО «Гродненский государственный аграрный университет» и депонированный в коллекции Института микробиологии НАН Беларуси.

В работе использовали жидкие питательные среды: бульон Хоттингера агаризованный (БХА) (50,0 мл); глюкозу (10,0 г/л); пептон (5,0 г/л); NaCl (5,0 г/л); агар-агар (12,0–20,0 г/л); воду водопроводную (до 1,0 л); Мейнелла (меласса – 30,0 г/л; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 7,0 г/л; KH_2PO_4 – 3,0 г/л; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1 г/л; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,5 г/л; Na-цитрат – 0,5 г/л; вода дистиллированная – до 1,0 л) и картофельно-глюкозный бульон (КГБ) (глюкоза – 20,0 г/л; картофельный бульон – 1,0 л). Агаризованные среды содержали 1,2–2,0 % агар-агара.

Глубинное культивирование бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д осуществляли в питательной среде Мейнелла в колбах Эрленмейера с аэрацией (при режиме перемешивания 180–200 об/мин, температуре 30 °С) в течение 48 ч. Для оценки полученного препарата проверяли его качественные характеристики на соответствие ТУ ВУ 100289066.045–2008 (рН 6,8–7,4, титр спор составлял не менее 1,0 млрд/см³, диаметр зоны подавления роста тест-культуры *F. oxysporum* БИМ F-381 был равен 28–32 мм).

Культуру фитопатогенных грибов выращивали в среде КГБ в колбах Эрленмейера с аэрацией (200 об/мин, температура 23–24 °С) в течение 32–48 ч.

Для приготовления сухих образцов препарата перед сушкой культуральную жидкость (КЖ) бактерий смешивали с минеральными добавками в различных соотношениях. В качестве протекторов и стабилизаторов использовали измельченный трепел, доломитовую муку и измельченный мел. Бактерии высушивали при температуре 55–60 °С в сухожаровом шкафу Memmert UFE 500 (Германия) до состояния сухого вещества (СВ), контроль влажности проводили на анализаторе влажности Sartorius MA150 (Германия). Установлено, что при стандартных условиях культивирования в 1 л КЖ содержалось 40 г сухого вещества. Хранение высушенных форм препарата осуществляли в течение 15 мес. в условиях, рекомендованных указанными ТУ (от 4 до 15 °С в сухом проветриваемом помещении). Через каждые 3 мес. хранения (через 3, 6, 9, 12 и 15 мес. хранения соответственно) высушенные образцы разводили стерильной водой до исходного объема КЖ и определяли количество жизнеспособных клеток и спор, антагонистическую активность и значение рН. Титр клеток и спор бактерий-антагонистов устанавливали методом предельных разведений [9]. Антагонистическую активность оценивали методом лунок [10], результаты учитывали через 18–24 ч по диаметру зон задержки роста тест-культуры, выращенной на агаризованной среде БХА. Уровень рН в образцах измеряли на иономере рН-150М (Беларусь).

Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам в программе *Microsoft Excel*.

Результаты исследований и их обсуждение

Определено влияние различных минеральных добавок на жизнеспособность бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д при высушивании жидкой споровой культуры штамма в лабораторных условиях. Основным критерием при выборе минерального носителя и его оптимального соотношения с культуральной жидкостью бактерий служили данные о количестве жизнеспособных клеток и спор в 1 г сухой формы (таблица). Высокие показатели титров (не менее 10⁹ КОЕ/1 г) регистрировали в сухих препаративных формах с добавлением трепела или доломитовой муки практически во всех вариантах соотношений (за исключением 1 : 4). В то же время при смешивании культуральной жидкости бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д с измельченным мелом количество жизнеспособных клеток и спор в концентрации 10⁹ КОЕ/1 г выявляли только при соотношении 1 : 1. Таким образом, наибольший защитный эффект при высушивании КЖ бактерий достигался при добавлении трепела или доломитовой муки. Поскольку в сухих формах препарата с добавлением трепела или доломитовой муки в соотношении 1 : 2 содержалось достаточное количество жизнеспособных

клеток и спор (более $7 \cdot 10^9/1$ г), в полной мере обеспечивающих антифунгальные свойства, оно представлялось наиболее экономически целесообразным. Дело в том, что вследствие невысокой цены на носители (стоимость трепела составляет 0,45 руб./кг, доломитовой муки – 0,2 руб./кг) основная стоимость препарата зависит от количества используемой культуральной жидкости бактерий. Подсчеты показали, что использование КЖ и носителя в соотношении 1 : 1 в значительной степени увеличивает себестоимость конечного продукта и является экономически необоснованным.

**Количество жизнеспособных клеток и спор
 в сухой форме препарата с минеральными стабилизаторами**
**The titer of CFU and spores of CL (cultural liquid) strain
 during drying with the addition of mineral carrier**

Стабилизатор	Соотношение культуральной жидкости и стабилизатора	Количество жизнеспособных клеток и спор в 1 г сухого препарата, КОЕ	
		Клетки	Споры
Мел	1 : 1	$9,5 \cdot 10^9$	$8,0 \cdot 10^9$
	1 : 2	$7,1 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^8$
	1 : 3	$2,3 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$
	1 : 4	$2,0 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$
Трепел	1 : 1	$2,2 \cdot 10^{10}$	$1,9 \cdot 10^{10}$
	1 : 2	$9,2 \cdot 10^9$	$6,3 \cdot 10^9$
	1 : 3	$3,3 \cdot 10^9$	$1,9 \cdot 10^9$
	1 : 4	$1,1 \cdot 10^9$	$8,9 \cdot 10^8$
Доломитовая мука	1 : 1	$2,3 \cdot 10^{10}$	$1,8 \cdot 10^{10}$
	1 : 2	$8,9 \cdot 10^9$	$7,5 \cdot 10^9$
	1 : 3	$3,5 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^9$
	1 : 4	$9,0 \cdot 10^8$	$8,1 \cdot 10^8$

Согласно полученным данным оптимальными протекторами для бактерий штамма *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д являются измельченный трепел и доломитовая мука, добавленные при высушивании культуральной жидкости в соотношении 1 : 2.

На следующем этапе работы проводили анализ качественных показателей сухих препаратов с добавлением трепела и доломитовой муки при долгосрочном хранении. Для этого в течение 15 мес. определяли количество жизнеспособных клеток и спор, а также антагонистическую активность у высушенных образцов (анализ проводили через каждые 3 мес.). Параллельно эти показатели контролировали для препарата в жидкой форме, который был заложен на хранение одновременно с сухими формами. Исходный титр двухсуточного жидкого препарата, на основе которого были созданы все образцы препаративных форм, составлял $1,4 \cdot 10^9$ КОЕ/мл и $1,3 \cdot 10^9$ спор/мл, антагонистическая активность, определяемая зоной задержки роста грибного патогена *Fusarium oxysporum* БИМ F-381, равнялась ($32,0 \pm 0,6$) мм, показатель pH имел нейтральное значение (7,1). В результате этих экспериментов было показано, что в высушенной форме препарата с носителями (трепел, доломитовая мука) в течение 12 мес. стабильно сохранялись жизнеспособные клетки и споры (титр составил не менее $1,1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл) и он обладал высокой антагонистической активностью по отношению к патогенному грибу *Fusarium oxysporum* БИМ F-381 (рис. 1–3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что за 12 мес. хранения в высушенных образцах с добавлением носителей контролируемые показатели остались в пределах нормы (соответствовали ТУ ВУ 100289066.045–2008). При этом количество жизнеспособных клеток и спор через 12 мес. хранения в сухом препарате с доломитовой мукой незначительно превышало эти показатели в образце с трепелом (на 5,8 % – КОЕ и на 8,0 % – споры). Установлено, что значение pH в сухих образцах оставалось в пределах нормы (в соответствии с ТУ) на протяжении всего периода хранения. Например, через 15 мес. хранения значение pH в сухой форме препарата составляло $6,9 \pm 0,05$. В то же время в жидком препарате уже через 7 мес. хранения наблюдалось повышение концентрации ионов H^+ , а через 12 мес. хранения показатель

pH снизился до 6,5. Стоит отметить, что на протяжении первых 6 мес. контролируемые показатели (титр клеток и спор, а также антагонистическая активность) жидкой формы препарата оставались в пределах нормы (соответствовали ТУ ВУ 100289066.045–2008), а затем неуклонно снижались. Результаты исследований свидетельствуют о том, что иммобилизация клеток и спор на минеральных носителях не оказывает негативного влияния на жизнеспособность и активность бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ-439Д, более того, она создает клеткам дополнительную механическую защиту при высушивании жидкой культуры, предотвращает агрегирование спор и обуславливает стабильность биопрепаратов при долгосрочном хранении.

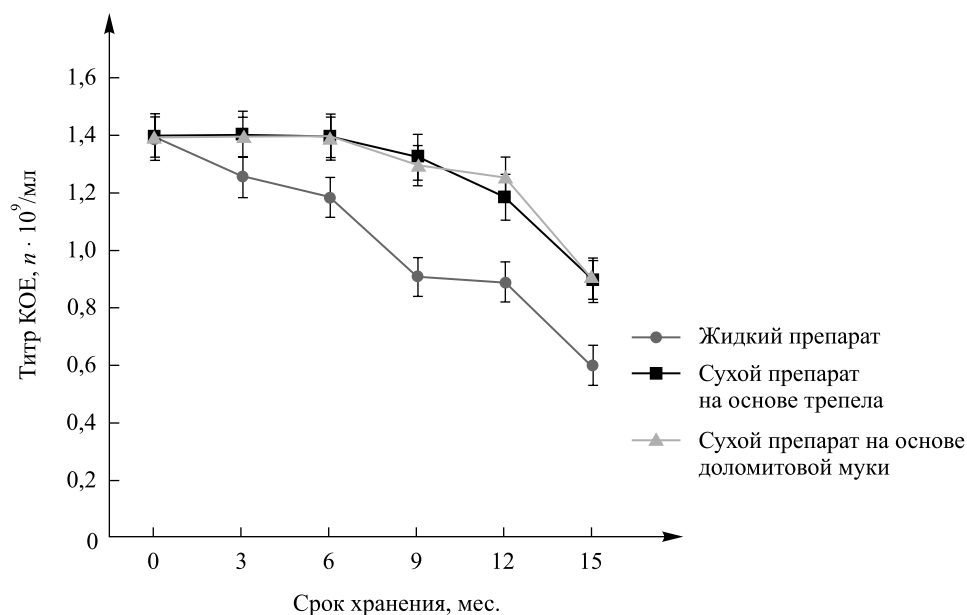


Рис. 1. Количество жизнеспособных клеток в образцах препарата при хранении

Fig. 1. The dynamics of the titer of CFU in the samples of Betaprotectin during storage

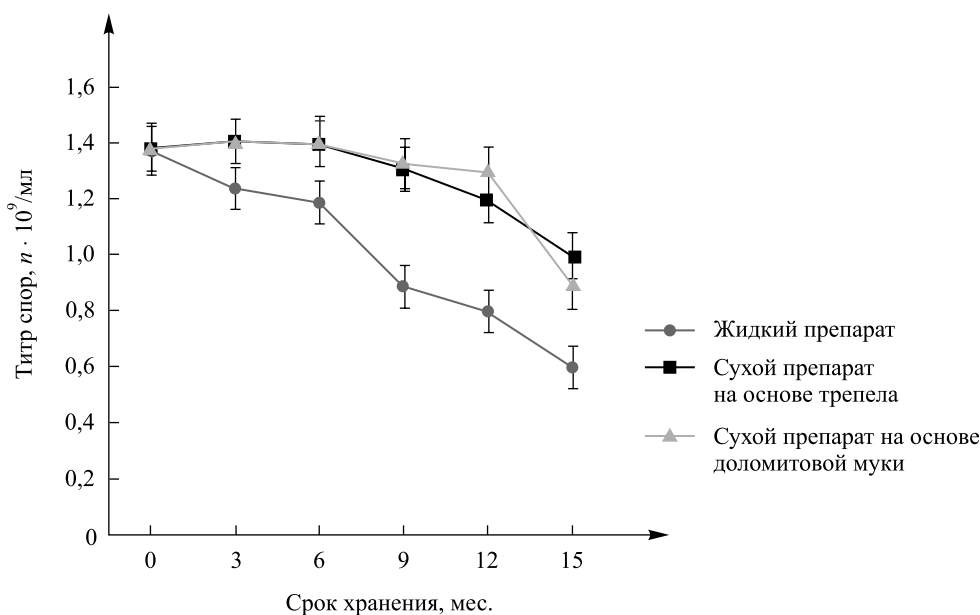


Рис. 2. Количество спор в образцах препарата при хранении

Fig. 2. The dynamics of the titer of spores in the samples of Betaprotectin during storage

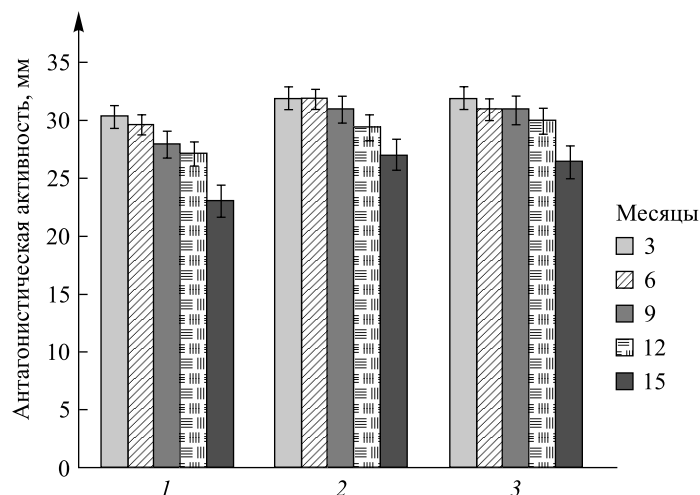


Рис. 3. Антагонистическая активность образцов препарата при хранении:

1 – жидкий препарат; 2 – сухой препарат на основе трепела;

3 – сухой препарат на основе доломитовой муки

Fig. 3. Dynamics of antagonistic activity of the samples of Betaprotectin during storage:

1 – liquid preparation; 2 – dry preparation on a tripoli powder;

3 – dry preparation based on a dolomite flour

Заключение

Согласно полученным данным наиболее перспективной для долгосрочного хранения биопестицида «Бетапротектин» является сухая форма с добавлением в качестве носителя доломитовой муки в соотношении 1 : 2 (КЖ – носитель) в пересчете на сухое вещество. Данная препаративная форма обеспечивает более длительный срок хранения биопестицида, способствует поддержанию его качественных характеристик в течение 12 мес., что в 4 раза превышает рекомендованный срок хранения жидкого препарата. Такой эффект может быть обусловлен тем, что минеральный компонент, на частицах которого иммобилизованы клетки штамма-продуцента, создает им дополнительную механическую защиту от внешних воздействий, предотвращает агрегирование спор, закисление препарата, а также является еще одним фактором защиты культуры от контаминации патогенной микрофлорой [1; 6]. Таким образом, разработанная сухая препаративная форма «Бетапротектина», обеспечивающая стабильность и эффективность действия биопрепарата, может быть рекомендована для долгосрочного хранения.

Библиографические ссылки

1. Синицын А. П., Райнина Е. И., Лозинский В. И. и др. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. М. : Изд-во МГУ, 1994.
2. Штаммы бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*, обеспечивающие восстановление микробиоценозов почвы и желудочно-кишечного тракта животных, обладающие бактерицидной, фунгицидной и вирулицидной активностью, и препарат на основе этих штаммов : пат. 2482174 RU, IPC A 01 N 63/00, A 61 K 35/74, C 12 N 1/20 / А. И. Леляк, А. А. Леляк ; заявл. 10.02.2011 ; опубл. 20.05.2013 // Офиц. бюл. / Федер. служба по интеллектуал. собственности. 2013. № 14.
3. Ефимова М. С., Марквичев Н. С. Разработка новой препаративной формы для защиты корневой системы растений на основе клеток *Bacillus subtilis* для внесения в торфосубстраты // Успех в химии и хим. технологии. 2011. Т. XXV, № 11 (127). С. 48–52.
4. Голушко В., Козинец А., Надаринская М. и др. Знакомьтесь – трепел, кормовой адсорбент [Электронный ресурс]. 2013. URL: <http://agriculture.by/articles/zhivotnovodstvo/znakomtes-%E2%80%94-trepel-kormovoj-adsorbent> (дата обращения: 30.08.2017).
5. Надаринская М. А., Кветковская А. В., Голушко О. Г. и др. Влияние трепела на морфофункциональные свойства крови у высокопродуктивных коров в период раздоя // Актуал. пробл. интенсив. развития животноводства : сб. науч. тр. : в 2 ч. 2011. Вып. 14, ч. 1. С. 140–145.
6. Способ получения биоминеральных удобрений и мелиорантов (варианты) : пат. 2512277 RU, IPC C 05 F, 11/08 / В. К. Чеботарь, Е. В. Ерофеев ; заявл. 10.10.2012 ; опубл. 10.04.2014 // Офиц. бюл. / Федер. служба по интеллектуал. собственности. 2014. № 10.
7. Коломиец Э. И., Кильчевская О. С., Романовская Т. В. Разработка препаративной формы биопестицида для защиты сахарной свеклы от кагатной гнили // Биологическая защита растений, перспективы и роль в фитосанитарном оздоровлении агроценозов и получении экологически безопасной сельскохозяйственной продукции : материалы V Междунар. конф. (Краснодар, 23–25 сент. 2008 г.). Краснодар, 2008. С. 250–252.
8. Свиридов А. В., Коломиец Э. И. Бактерии-антагонисты в защите сахарной свеклы от кагатной гнили. Гродно : Гродн. гос. аграр. ун-т, 2012.
9. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхард : в 3 т. М. : Мир, 1984. Т. 3.
10. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. М. : Колос, 1983.

References

1. Sinitsyn A. P., Rainina E. I., Lozinsky V. I., et al. [Immobilized cells of microorganisms]. Moscow : Publ. house of Moscow State Univ., 1994 (in Russ.).
2. Strains of bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*, providing restoration of microbiocenoses of soil and gastrointestinal tract of animals, possessing bactericidal, fungicidal and virulent activity, and preparation based on these strains : pat. 2482174 RU, IPC A 01 N 63/00, A 61 K 35/74, C 12 N 1/20. I. A. Lelyak, A. A. Lelyak ; declar. 10.02.2011 ; publ. 20.05.2013. *Off. bull. Federal service for intellectual own.* 2013. No. 14 (in Russ.).
3. Efimova M. S., Markvichev N. S. [Development of a new formulation for the protection of the root system of plants based on *Bacillus subtilis* cells for incorporation into peat]. *Usp. v khim. i khim. tekhnol.* 2011. Vol. XXV, No. 11 (127). P. 48–52 (in Russ.).
4. Golushko V., Kozinets A., Nadarinskaya M., et al. [Meet – Tripoli, feed adsorbent]. 2013. URL: <http://agriculture.by/articles/zhivotnovodstvo/znakomtes-%E2%80%94-trepel-kormovoj-adsorbent> (date of access: 30.08.2017) (in Russ.).
5. Nadarinskaya M. A., Kwiatkowskaya A. V., Galushko O. G., et al. [Effect of diatomaceous earth on the morphological and functional properties of blood of high yielding cows in period of milking]. In: *Aktual. probl. intensivn. razvit. zhivotnovod.* : collect. of sci. pap. : in 2 parts. 2011. Issue 14, part 1. P. 140–145 (in Russ.).
6. Method for producing biomineral fertilizers and meliorants (variants) : pat. 2512277 RU, IPC C 05 F, 11/08. V. K. Chebotar, E. V. Erofeev ; declar. 10.10.2012 ; publ. 10.04.2014. *Off. bull. Federal service for intellectual own.* 2014. No. 10 (in Russ.).
7. Kolomiets E. I., Kilchevsky O. S., Romanovskaya T. V. [Development of formulations of biopesticide for protection of sugar beet against the clamp rot]. *Biological plant protection, prospects and the role of phytosanitary improvement of agriculture and production of ecologically safe agricultural production* : mater. of the V Int. conf. (Krasnodar, 23–25 Sept., 2008). Krasnodar, 2008. P. 250–252 (in Russ.).
8. Sviridov A. V., Kolomiets E. I. [Bacteria-antagonists in the protection of sugar beet against the clamp rot]. Grodno : Grodno State Agric. Univ., 2012 (in Russ.).
9. Gerhard F. (ed.). [Methods of General bacteriology] : in 3 vols. Moscow : Mir, 1984. Vol. 3 (in Russ.).
10. Sagi Ye. [Methods of soil Microbiology]. Moscow : Kolos, 1983 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 12.01.2018.
Received by editorial board 12.01.2018.