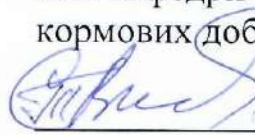


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
БІОЛОГО-ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерії»

Допускається до захисту
Зав. кафедри технології кормів,
кормових добавок і годівлі тварин

назва кафедри

 проф. Пашко В.С.

підпис, вчене звання, прізвище, ініціали

« 11 » травня 2026 року

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА БАКАЛАВРА

Аналіз біотехнології одержання біопрепарату «Гуміфренд»
для захисту рослин

Виконав: Малиш Галина Василівна

прізвище, ім'я, по батькові, підпис

Керівник канд. с.-г. наук, доцент Бабенко С.П.

вчене звання, прізвище, ініціали підпис

Рецензент

професор Чижикова О.С.

вчене звання, прізвище, ініціали підпис

Я, Малиш Г.В. (ПІБ здобувача), засвічую, що кваліфікаційну роботу виконано з дотриманням принципів академічної доброчесності.

Біла Церква – 2026 р.

ЗМІСТ

	Стор.
Завдання на виконання кваліфікаційної роботи	
Висновок керівника на кваліфікаційну роботу	
Вступ.....	
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	
1.1 Загальна характеристика біопрепаратів	
1.2 Аналіз ринку біопрепаратів в Україні та світі	
1.3 Характеристика біопрепарату «Гуміфренд»	
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ.....	
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	
3.1 Оцінка хімічного складу біодобрива “Гуміфренд	
3.2 Ідентифікація колоній мікроорганізмів	
3.3 Підбір оптимального середовища для ізолювання мікроорганізмів за розрахунком їх колонієутворюючих одиниць (КУО)	
3.4 Технологічна схема отримання біопрепарату для захисту рослин із використанням бактерій роду <i>Bacillus</i> та <i>Paenibacillus</i>	
ВИСНОВКИ.....	
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	

АНОТАЦІЯ

Прізвище, ініціали: Малиш Г.В.

Назва кваліфікаційної роботи: Аналіз біотехнології одержання біопрепарату «Гуміфренд» для захисту рослин

Досліджено. 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.

Об'єкт дослідження: біопрепарат “Гуміфренд” та мікроорганізми в його складі: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mucilaginosus*, *Paenibacillus tacerans*, *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.

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

Кваліфікаційна робота магістра містить 58 сторінок, 5 таблиць, 34 рисунки, список використаних джерел із 31 найменувань.

Ключові слова: “Гуміфренд”, засіб захисту рослин, мікроорганізми, біопрепарат, технологічна схема.

ANNOTATION

Surname, initials: Malysh G.V.

Title of the qualification work: Analysis of the biotechnology of production of the biological preparation "Gumifred" for plant protection

Researched. This qualification paper describes the study of a biotechnological means of plant protection, developed a technological scheme for the production of biological preparations.

In our time, the question of environmentalization of agriculture is relevant. For this, more and more farms are switching from chemical means of plant protection to those that do not have a harmful effect on human health and the environment.

The biological preparation under study contains 5 strains of bacteria that are useful for plants, as they improve their growth and development, as well as support nutrition by converting organic substances into forms available for use by plants. In addition, the composition of the biological preparation includes a wide range of micro- and macroelements necessary for the growth and development of plants. Also, the microorganisms in the biological preparation have antagonistic properties, thanks to which they are able to protect plants from parasites and phytopathogens.

The object of the study: the biological preparation "Gumifriend" and the microorganisms in its composition: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mucilaginosus*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus polymyxa*, technological process of obtaining the microbiological preparation.

Subject of research: chemical composition of the biological preparation "Gumifriend", identification of colonies of microorganisms, which are the basis of the biological preparation "Gumifriend"; selection of the optimal environment for isolating microorganisms.

Practical value of work. The biological preparation "Gumifrend" was studied, the perspective and improvement of modern biological preparations were evaluated, the scheme of biotechnology for obtaining preparations for plant protection was substantiated.

The master's qualification work contains 58 pages, 5 tables, 34 figures, a list of used sources from 31 items.

Key words: "Gumifriend", plant protection agent, microorganisms, biological preparation, technological scheme.

ВСТУП

У сучасних умовах особливої актуальності набуває питання екологізації господарської діяльності людини, що пов'язано з поступовим погіршенням стану біосфери. Одним із ефективних шляхів зменшення антропогенного навантаження на ґрунти є заміна хімічних засобів їх більш безпечними аналогами, зокрема препаратами біологічного походження.

До таких альтернатив належать біопрепарати, які містять комплекси корисних мікроорганізмів. Дані мікроорганізми здатні пригнічувати розвиток фітопатогенів і шкідників, не завдаючи шкоди природним екосистемам, корисній мікрофлорі ґрунту, тваринам і людині. Завдяки цьому біологічні засоби захисту рослин вважаються екологічно безпечними.

На відміну від традиційних хімічних препаратів, біопрепарати не спричиняють формування резистентності у патогенних мікроорганізмів, що дозволяє застосовувати їх протягом тривалого часу без необхідності збільшення концентрації діючих речовин. Це є важливою перевагою в умовах інтенсивного землеробства.

Окрім захисної функції, біопрепарати часто містять біологічно активні речовини, зокрема макро- та мікроелементи, амінокислоти і вітаміни, які позитивно впливають на фізіологічні процеси рослин, стимулюють їх ріст та підвищують стійкість до несприятливих факторів.

Сьогодні спостерігається активний розвиток ринку біологічних засобів захисту рослин, що дозволяє обирати препарати з урахуванням особливостей культури, сорту та спектра патогенів. Такий підхід сприяє підвищенню ефективності їх використання.

Важливою перевагою біопрепаратів є можливість їх застосування на різних етапах розвитку рослин, включаючи період формування та дозрівання плодів. При цьому продукція залишається безпечною для споживання, що є суттєвим фактором у виробництві якісної та екологічно чистої сільськогосподарської продукції.

Таким чином, розвиток та вдосконалення біопрепаратів є перспективним напрямом сучасної аграрної науки. Необхідно приділяти увагу оптимізації їх складу, удосконаленню технологій виробництва та популяризації біологічних методів захисту рослин як альтернативи хімічним засобам.

Мета і завдання дослідження

Метою даної роботи є дослідження властивостей біопрепарату для захисту рослин, зокрема аналіз його хімічного та мікробіологічного складу, а також розроблення технологічної схеми його виробництва.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі завдання:

- провести аналіз хімічного складу біопрепарату «Гуміфренд»;
- здійснити ідентифікацію мікроорганізмів, що входять до складу препарату;
- визначити оптимальні поживні середовища для виділення та культивування мікроорганізмів;
- розробити технологічну схему отримання біопрепарату для захисту рослин.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика біопрепаратів

Теоретичні відомості про біопрепарати

Біопрепарати являють собою засоби, отримані з природної сировини — рослин, грибів, тварин або мікроорганізмів — чи синтезовані за допомогою біотехнологічних методів. У сфері захисту рослин вони використовуються для боротьби з фітопатогенами та шкідниками і можуть містити бактерії, гриби, віруси, ферменти, а також рослинні екстракти.

На відміну від хімічних засобів, біопрепарати не чинять токсичного впливу на навколишнє середовище та здоров'я людини. Їх дія ґрунтується на природних механізмах — антагонізмі між мікроорганізмами, конкуренції за поживні речовини або активації захисних реакцій рослин.

Характерною особливістю біопрепаратів є відсутність накопичення в рослинних тканинах, що забезпечує безпечність продукції для споживання. Крім того, вони не викликають розвитку резистентності у шкідливих організмів, що є суттєвою перевагою у довготривалому застосуванні.

Основу більшості біопрепаратів становлять рістстимулюючі бактерії (Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB), які колонізують ризосферу або тканини рослин і сприяють їх росту та стійкості до стресових факторів.

PGPB можуть бути:

- вільноживучими;
- асоціативними;
- симбіотичними;
- ендofітними.

Їх дія реалізується через прямі та непрямі механізми. До прямих належать забезпечення рослин доступними формами поживних елементів (нітрогену, фосфору, калію, феруму) та регуляція рівня фітогормонів. Непрямі механізми включають синтез антибіотичних речовин, ферментів, сидерофорів, індукцію

системної стійкості рослин, а також підвищення їх адаптивності до стресових умов.

Класифікація біопрепаратів

Залежно від функціонального призначення біопрепарати поділяють на:

- біофунгіциди;
- біоінсектициди;
- біоакарациди;
- біонематициди;
- біогербіциди;
- біородентициди;
- біоінокулянти;
- біодеструктори рослинних решток;
- біодобрива.

За походженням розрізняють:

- бактеріальні препарати;
- грибні препарати;
- вірусні препарати.

Мікробіологічні добрива є окремою групою біопрепаратів, які забезпечують рослини поживними елементами за рахунок діяльності мікроорганізмів. Вони можуть фіксувати атмосферний нітроген, переводити сполуки фосфору та калію у доступні форми, а також сприяти мінералізації органічних решток і покращенню структури ґрунту.

Таким чином, застосування біопрепаратів є перспективним напрямом сталого розвитку сільського господарства, що поєднує підвищення продуктивності з мінімізацією негативного впливу на довкілля.

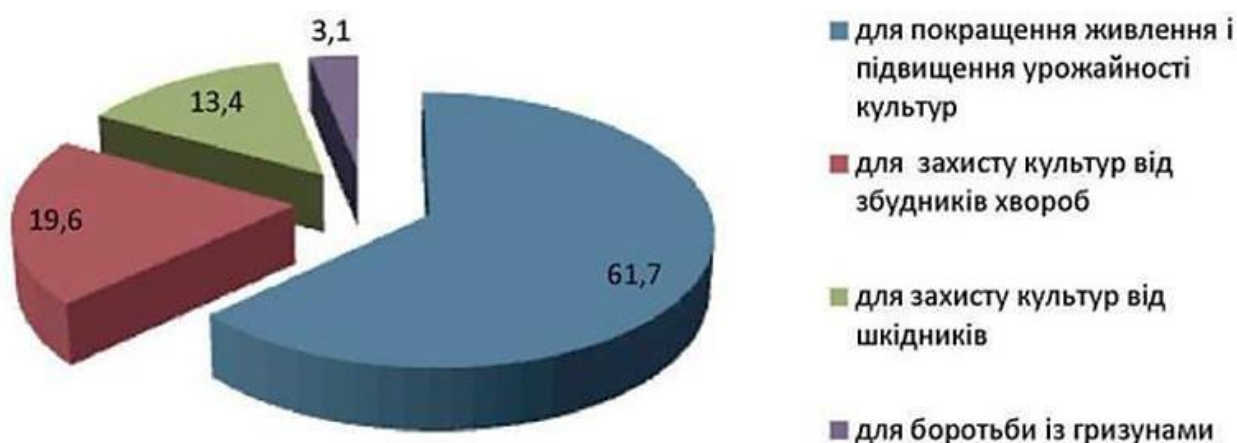


Рис. 1.1 Розподіл біопрепаратів за напрямком дії

1.2 Аналіз ринку біопрепаратів в Україні та світі

Перехід до екологічно орієнтованого землеробства та поступова відмова від застосування хімічних засобів захисту рослин значною мірою залежать від ефективного функціонування ринку біологічних препаратів. Важливою умовою цього процесу є наявність прозорих і зрозумілих правил для всіх учасників ринку, що сприяє його стабільному розвитку.

За сучасними оцінками, обсяг світового ринку біологічних засобів захисту рослин демонструє стійку тенденцію до зростання. Зокрема, у 2021 році він становив близько 4,5 млрд доларів США, тоді як у 2022 році досяг уже 5,3 млрд доларів США. Такі показники свідчать про активне розширення виробництва та підвищення попиту на біопрепарати у глобальному масштабі.

В Україні також спостерігається збільшення загальних площ, оброблених засобами захисту рослин: з 19 824 тис. га у 1995 році до 50 562 тис. га у 2020 році (табл. 1.1). Проте, попри загальне зростання обсягів застосування засобів захисту, частка саме біологічних препаратів має тенденцію до зниження, що є негативним явищем для розвитку екологічно безпечного агровиробництва.

У зв'язку з цим особливої актуальності набуває розробка та впровадження високоефективних біопрепаратів, які поєднують захисні та стимулюючі властивості. Важливими напрямками також є розширення ринку біологічних

засобів, популяризація їх використання серед аграріїв, а також інформування фахівців про переваги, безпечність і ефективність біологічного захисту рослин.

Таблиця 1.1

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

Скорочення обсягів використання біопрепаратів у системах захисту рослин зумовлене низкою взаємопов'язаних факторів. До основних із них належать:

- переважання на ринку традиційних хімічних засобів захисту рослин, які мають швидкий і прогнозований ефект;
- недостатній рівень державної підтримки агровиробників, що впроваджують біологічні методи захисту;
- недостатній розвиток інфраструктури ринку біопрепаратів;
- складність процедур державної реєстрації біологічних засобів;
- обмежена доступність інформації та труднощі з пошуком ефективних і якісних біопрепаратів.

Недостатній рівень розвитку ринку біологічних засобів захисту рослин в Україні суттєво стримує широке впровадження біометоду в агровиробництво. Це

обмежує можливості переходу до екологічно безпечних технологій вирощування сільськогосподарських культур.

Станом на травень 2022 року у «Державному реєстрі пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні» було зареєстровано 126 найменувань біологічних препаратів, що свідчить про наявність певного потенціалу ринку, який, однак, потребує подальшого розвитку та розширення біопрепаратів для захисту рослин від 38-ми українських виробників (рис. 1.2.) та 117 препаратів зарубіжних виробників зі 28-ми країн світу (рис. 1.2.).

Виробники	Найменування препаратів	Кількість препаратів
1	2	3
ПП «БТУ-Центр»	Органік-баланс; АКТОВЕРМ ФОРМУЛА; ФІТОХЕЛП; МусоНелр; Екостерн; «Актоверм»; РІЗОЛАЙН, р.; МІКОФРЕНД; МЕЛАНОРІЗ; СКЛЕРОЦИД; АНДЕРІЗ; МЕТАВАЙТ; Ecoster; Азотофіт, КП; Азотофіт, КС; Біокомплекс-БТУ, КС; Біоінокулянт-БТУ, КП; Біоінокулянт-БТУ, КС; Бітоксисацілін-БТУ, КС; Лепідоцид-БТУ, КС; Фітоцид, КС	21
ДП «Ензим»	«Ентоцид (Метаризин)»; «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. 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 Квуміка 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. 1.3. Імпортні біопрепарати для захисту рослин на ринку України (травень 2022 р.)

Аналіз наведених статистичних даних дає підстави стверджувати, що продукція іноземного виробництва формує суттєву конкуренцію для вітчизняних біопрепаратів. Це, у свою чергу, стримує розвиток національного виробництва засобів біологічного захисту рослин та знижує зацікавленість у їх впровадженні.

Для подолання зазначених проблем доцільно реалізувати комплекс заходів організаційного, економічного та нормативного характеру, зокрема:

- забезпечення державної та приватної фінансової підтримки виробників і споживачів біопрепаратів;
- стимулювання не лише виробництва, а й практичного застосування біологічних засобів у сільському господарстві;
- удосконалення законодавчої бази з урахуванням вимог та стандартів Європейського Союзу;
- модернізація існуючих виробничих потужностей та впровадження сучасних технологій;
- створення та розширення мережі біолабораторій і біофабрик;
- підтримка національних виробників біопрепаратів;

- виділення біологічних засобів в окрему категорію у «Державному реєстрі пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні»;
- спрощення процедури реєстрації нових препаратів, розроблених науковими установами НААН і НАН України;
- активізація фундаментальних і прикладних досліджень у сфері біологічного захисту рослин;
- удосконалення механізмів функціонування ринку біопрепаратів.

Реалізація зазначених заходів сприятиме активізації виробництва та використання біологічних препаратів, що позитивно позначиться на екологізації аграрного сектору, підвищенні продуктивності сільського господарства, створенні нових робочих місць і зростанні надходжень до державного бюджету.

1.3 Характеристика біопрепарату «Гуміфренд»

Біопрепарат «Гуміфренд» є комплексним мікробіологічним добривом, яке використовується для підвищення продуктивності рослин і їх захисту від несприятливих чинників. Препарат містить корисні мікроорганізми та продукти їх метаболізму. За фізичними властивостями він являє собою рідину від світло- до темно-коричневого кольору зі специфічним запахом. Форма випуску передбачає різні об'єми тари — від 5 мл до 1 л.

До складу препарату входять:

- солі гумінових і фульвових кислот (переважно калієві);
- біологічно активні речовини;
- мікроелементи;
- комплекс мікроорганізмів, зокрема представники родів *Bacillus* та *Paenibacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*, *Bacillus mucilaginosus*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus polymyxa*).

Застосування препарату забезпечує такі ефекти:

- підвищення ефективності засвоєння поживних речовин рослинами;
- посилення стійкості до абіотичних стресів;
- стимуляцію розвитку кореневої системи та надземної частини;
- покращення стану ґрунту та відновлення його родючості;
- активацію імунних реакцій рослин;

- збільшення врожайності та покращення якості сільськогосподарської продукції.

Препарат застосовують для передпосівної обробки насіння, позакореневого та прикореневого підживлення, а також для обробки ґрунту з метою підвищення його біологічної активності.

Особливості застосування

- Передпосівна обробка насіння здійснюється шляхом обприскування або замочування в робочому розчині протягом 1–2 годин безпосередньо перед висівом. Обробку проводять у затінених умовах, уникаючи прямого сонячного випромінювання.
- Позакореневе підживлення виконують шляхом обприскування рослин у період вегетації відповідно до фаз їх розвитку. Рекомендується проводити обробку у безвітряну погоду, у ранкові або вечірні години.
- Обробка ґрунту здійснюється шляхом внесення робочого розчину перед основними агротехнічними заходами (оранка, культивація, сівба).

Для приготування робочого розчину препарат розводять водою у визначених пропорціях. Перед використанням його необхідно ретельно перемішати. Готовий розчин слід використати протягом 24 годин.

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

Гарантійний строк придатності біопрепарату становить 3 роки з моменту виготовлення за умови зберігання в герметично закритій тарі виробника при

температурі від 10 до 40 °С у захищеному від прямого світла місці. Після розкриття упаковки препарат зберігає свої властивості не більше 6 місяців.

Біопрепарат має відповідне посвідчення про державну реєстрацію: серія А № 06323. Виробником є приватне підприємство «БТУ-Центр» (Україна, Вінницька обл., м. Ладижин, вул. Будівельників, 35).

1.4 Загальна характеристика мікроорганізмів, що входять до складу біопрепарату «Гуміфренд»

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis — це грампозитивні паличкоподібні бактерії із заокругленими кінцями, розміри яких становлять приблизно $0,8 \times 2,9$ мкм. Вони є рухливими та здатними до утворення ендоспор. Клітини характеризуються наявністю товстої клітинної стінки, що забезпечує підвищену стійкість до несприятливих умов середовища.

Дані мікроорганізми відзначаються невибагливістю до поживного складу середовища та здатні розвиватися навіть за обмеженого вмісту поживних речовин. Для їх життєдіяльності достатньо мінімального набору компонентів, зокрема джерел Карбону, Нітрогену та Фосфору, а також мінеральних солей.

За умов дефіциту поживних речовин *Bacillus subtilis* активує адаптаційні механізми, серед яких:

- синтез антибіотичних сполук, що пригнічують розвиток конкурентної мікрофлори;
- продукування позаклітинних ферментів;
- здатність до поглинання екзогенної ДНК;
- підвищення рухливості клітин;
- формування біоплівки;
- спороутворення.

Процес утворення спор є одним із ключових механізмів виживання цих бактерій. Він активується за несприятливих умов існування. Спори характеризуються високою стійкістю до дії температури, висушування та інших стресових факторів. У стані спокою вони можуть тривалий час зберігати

життєздатність, а при покращенні умов швидко проростають і переходять у вегетативну форму.

Спори *Bacillus subtilis* мають овальну форму та, як правило, розташовуються субтермінально в клітині. (рис. 1.5.).

Розташування	Форма	Деформація
Центральне 	Сферична 	Не випирає 
Субтермінальне 	Еліпсоїдна 	Випирає 
Термінальне 		

Рис. 1.5. Спори бактерій

Бактерії виду *Bacillus subtilis* широко використовуються у виробництві біологічних препаратів для захисту рослин. Вони сприяють покращенню фосфорного живлення, переводячи сполуки Фосфору у доступні для рослин форми. Для отримання промислових обсягів біомаси застосовують поживні середовища, що містять гідролізати білків, кукурудзяний екстракт, а також рідкі композиції на основі гідролізату казеїну, дріжджових компонентів, вуглеводів і мінеральних солей.

Bacillus megaterium* var. *Phosphaticum

Bacillus megaterium — це грампозитивні, паличкоподібні, рухливі бактерії, здатні утворювати спори. Вони характеризуються значними розмірами клітин (у середньому близько $1,5 \times 5$ мкм), що й зумовило їх назву (від лат. *mega* — великий). Завдяки наявності полісахаридних сполук на поверхні клітин, мікроорганізми можуть формувати ланцюги.

Цей вид бактерій широко застосовується у створенні біопрепаратів, оскільки проявляє антагоністичну активність щодо фітопатогенних

мікроорганізмів, стимулює імунні реакції рослин і бере участь у біогеохімічних циклах Карбону та Фосфору.

Bacillus mucilaginosus

Bacillus mucilaginosus — це паличкоподібні бактерії, які зазвичай відносять до грамнегативних. Їх розміри становлять приблизно $0,8\text{--}1,2 \times 3\text{--}9$ мкм. Клітини оточені потужною капсулою, що сприяє утворенню зооглеї — слизової агрегованої структури клітин, занурених у полімерний матрикс позаклітинних речовин. Розміри капсул можуть у декілька разів перевищувати розміри самих клітин.

Ці мікроорганізми здатні утворювати спори округлої або еліпсоподібної форми. Їх практичне значення полягає у здатності мобілізувати сполуки Калію та Фосфору, переводячи їх у легкодоступні для рослин форми, що обумовлює їх широке використання у біопрепаратах.

Paenibacillus macerans

Paenibacillus macerans — це бактерії паличкоподібної форми, які можуть бути як грампозитивними, так і грамнегативними. Вони не формують капсул, але характеризуються наявністю перитрихових джгутиків, що забезпечує їх рухливість.

Дані мікроорганізми здатні утворювати спори еліпсоподібної форми, які можуть розташовуватися як на кінцях клітини, так і поблизу них (термінально або субтермінально). Спори відзначаються високою стійкістю до несприятливих умов і можуть зберігати життєздатність протягом тривалого часу.

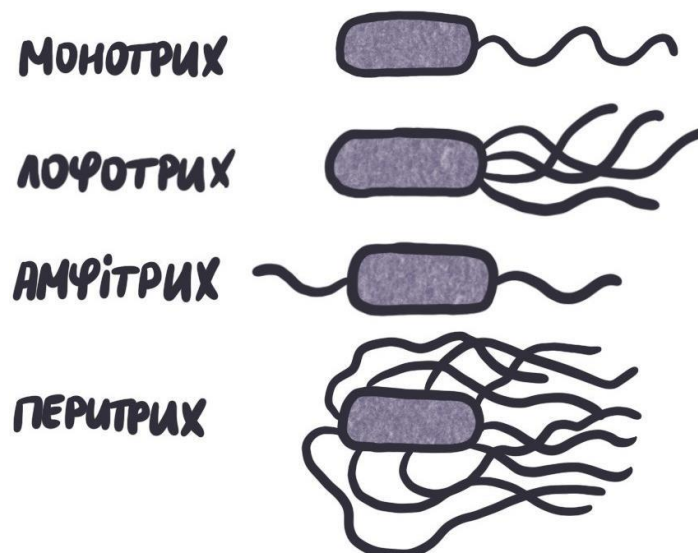


Рис. 1.6. Види джгутиків

Paenibacillus macerans застосовуються для виготовлення біопрепаратів для захисту рослин, оскільки фіксують та ферментують Нітроген.

***Paenibacillus polymyxa*.**

Paenibacillus polymyxa – грампозитивні, паличкоподібні бактерії розміром 0,6×3,0 мкм, що формують бліді колонії. Для руху використовують перитрихові джгутики (рис. 1.6.). Спори великі еліпсоїдні.

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.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИКА ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Біопрепарат “Гуміфренд”.

Взірець біодобрива “Гуміфренд” (рис. 2.1.) 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. Комплексне біодобриво “Гуміфренд”

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 кожну (рис. 2.2.). По одній чашці кожного середовища не засівали, а залишали як контрольну.

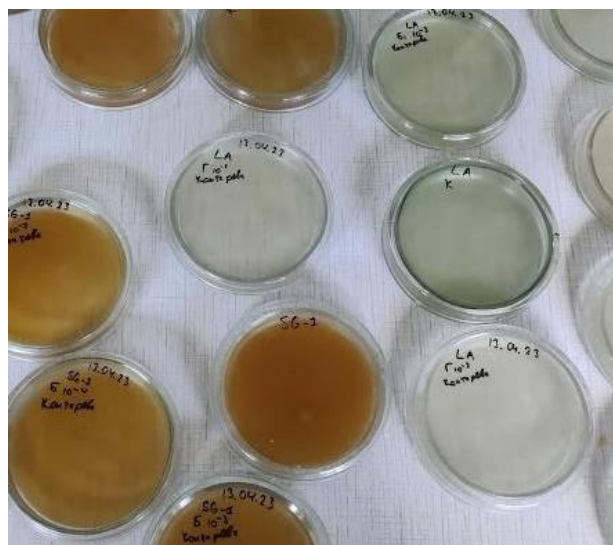


Рис. 2.2. Чашки Петрі з живильними середовищами SG-1 (коричнєве) та LA (прозоре)

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

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 °C;
- після гідролізу зразки пропускають під струмом, з позитивною полярністю (+), через систему капілярного електрофорезу на спеціальному приладі - “КАПЕЛЬ - 105М” (рис. 2.3.).



Рис. 2.3. Прилад для капілярного електрофорезу “КАПЕЛЬ - 105М”

Мікробіологічні методи.

Стерилізація

Стерилізація являє собою процес повного знищення мікроорганізмів-контамінантів, включаючи їх спорові форми. Розрізняють фізичні та хімічні методи стерилізації залежно від способу впливу на біологічні об'єкти.

Підтримання стерильних умов є ключовою вимогою при роботі в мікробіологічній лабораторії. Дотримання асептики забезпечує не лише безпеку персоналу та довкілля, а й дозволяє отримувати достовірні та відтворювані результати досліджень.

Підготовка лабораторного посуду та інструментів перед стерилізацією включає попереднє миття із застосуванням мийних засобів, а також обробку у хімічних розчинах. Після цього матеріали висушують і пакують у фольгу (рис. 2.4). Для скляного лабораторного посуду (колби, пробірки, піпетки тощо) додатково виготовляють ватно-марлеві пробки, які зверху також захищають фольгою (рис. 2.5).



Рис. 2.4. Підготовлені до стерилізації чашки Петрі



Рис. 2.5. Підготовані до стерилізації колби

Основним методом стерилізації посуду та інструментів є автоклавування. Автоклав забезпечує дію трьох основних факторів: підвищеного тиску, високої температури та насиченої вологості, що ефективно знищує вегетативні клітини та спори мікроорганізмів. У роботі використовували режим із параметрами: тиск 1,1 атм, температура 121 °С, тривалість 40–60 хв без урахування часу нагрівання.

Після автоклавування термостійкий посуд переміщували до сушильної шафи (пластикові матеріали не оброблялися цим етапом). Режим сушіння становив 170–180 °С протягом 2 годин.

Додатково стерильність робочого місця забезпечували шляхом обробки поверхонь 70% розчином етилового спирту. Дезінфекція рук також проводилась цим розчином. Усі маніпуляції з мікроорганізмами виконували у зоні полум'я пальника (10–15 см) або під витяжною шафою.

Приміщення лабораторії регулярно обробляли мийними та дезінфекційними засобами. Повітря очищували за допомогою фільтраційних систем та бактерицидних ламп.

Приготування десятикратних розведень

Для серійних розведень використовували автоклавовану дистильовану воду та вихідну культуру мікроорганізмів.

Розведення 10^{-1} отримували шляхом змішування однієї частини вихідного зразка з дев'ятьма частинами стерильної води (об'єм однієї частини міг становити 100 мкл або 1 мл). Кожне наступне розведення (10^{-2} , 10^{-3} тощо) готували шляхом перенесення однієї частини попереднього розчину у дев'ять частин води. У роботі застосовували серію розведень від 10^{-1} до 10^{-5} .

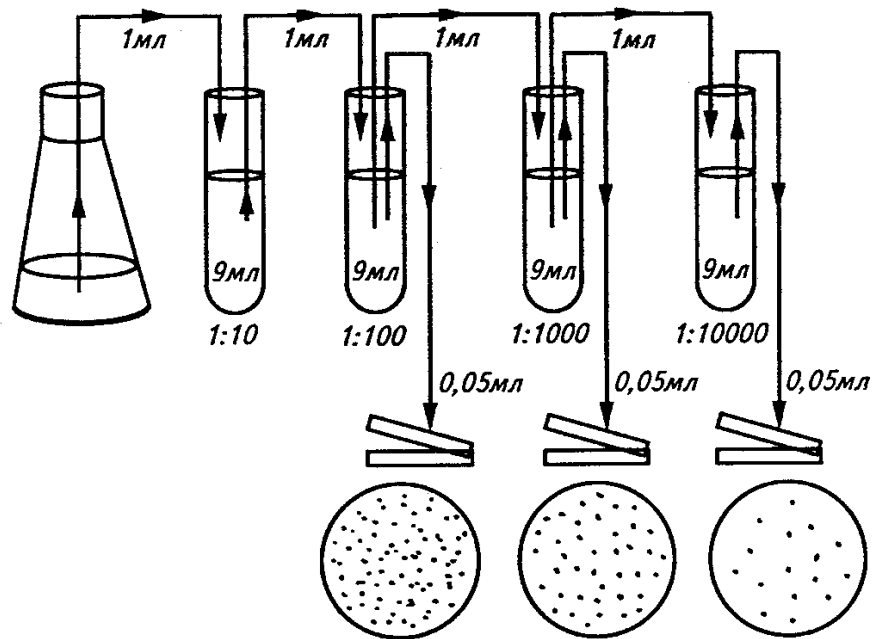


Рис. 2.6. Методика приготування десятикратних розведень Посів мікроорганізмів на живильні середовища методом “газону”

Посів мікроорганізмів на живильні середовища

1. Чашки Петрі зі стерильним агаром відкривали поблизу полум'я пальника (на відстані 10–15 см);
2. За допомогою піпет-дозатора наносили необхідний об'єм суспензії на поверхню середовища;
3. Рівномірний розподіл матеріалу здійснювали бактеріологічним шпателем Дригальського (рис. 2.7);
4. Чашки закривали та інкубували у термостаті у перевернутому положенні.



Рис. 2.7. Шпатель Дригальського

Підготовка мазків для мікроскопії

Перед виготовленням мазків скельця проходили попередню підготовку:

- миття з використанням мийних засобів;
- промивання дистильованою водою;
- знежирення 70% етиловим спиртом;
- повторне ополіскування дистильованою водою;
- висушування;
- нанесення маркування на зворотному боці;
- нанесення краплі стерильної дистильованої води на робочу поверхню

скельця.

Відбір мікроорганізмів та приготування фіксованих мазків

Перед виконанням відбору мікробіологічного матеріалу і виготовленням мазків необхідно підготувати предметні скельця. Підготовчий етап включає такі операції: спочатку скельця ретельно миють із використанням миючих засобів, після чого їх обполіскують дистильованою водою. Далі здійснюють знежирення поверхні за допомогою 70% розчину етилового спирту. Після цього скельця протирають серветкою, змоченою дистильованою водою, а потім витирають насухо. На зворотному боці кожного скельця в кутовій частині роблять позначку. На лицьову поверхню наносять невелику краплю дистильованої води.

Відбір мікроорганізмів здійснюють із використанням бактеріологічної петлі (рис. 2.8). За допомогою петлі беруть незначну кількість матеріалу з досліджуваної культури.

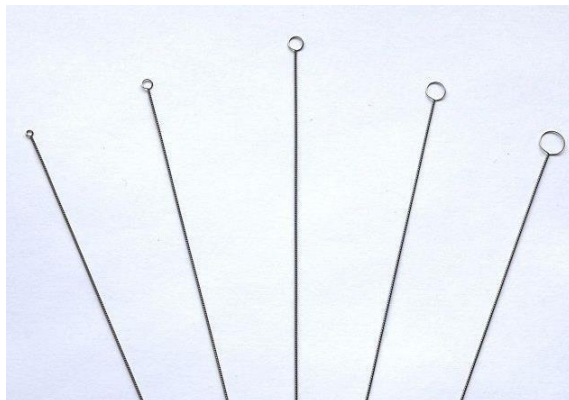


Рис. 2.8. Бактеріологічні петлі різного діаметру

Отриманий зразок переносять у краплю води на скельці, де його рівномірно розподіляють по поверхні. Після висихання мазок піддають фіксації, швидко проводячи скельце над полум'ям пальника (рис. 2.9).

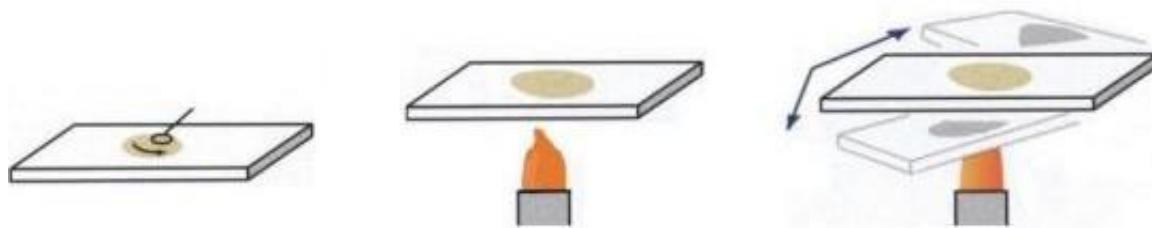


Рис. 2.9. Приготування фіксованого мазка

Ідентифікація мікроорганізмів

Одним із методів попереднього визначення мікроорганізмів є аналіз морфологічних характеристик колоній, вирощених на поживних середовищах у чашках Петрі.

Під час оцінки колоній звертають увагу на такі параметри:

- геометричну форму (округла, витягнута, неправильна, із рівними чи хвилястими краями);
- забарвлення (біле, кремове, жовте, рожеве тощо);
- характер поверхні (гладка, блискуча або матова);
- розміри колоній;
- консистенцію (щільна, слизиста, пухка).

На основі цих ознак проводять попередню класифікацію та ідентифікацію культур. Додатково можуть оцінюватися такі властивості, як чутливість до світла та кисню, швидкість росту, взаємодія з антибіотиками або іншими мікроорганізмами.

Фарбування за Грамом

Необхідні реактиви:

- дистильована вода;
- етиловий спирт (96%) або ацетон;
- генціановий фіолетовий;
- фуксин або сафранін;
- розчин Люголя (йодовмісний).

Порядок виконання:

1. На попередньо зафіксований мазок накладають фільтрувальний папір.
2. Папір просочують розчином генціанового фіолетового.
3. Через 5–7 хвилин папір видаляють і наносять розчин Люголя.
4. Через 1–2 хвилини надлишок розчину зливають.
5. Проводять знебарвлення спиртом або ацетоном протягом 30–60 секунд (із короткими нанесеннями по 10–15 секунд).
6. Мазок ретельно промивають дистильованою водою.
7. Наносять контрастний барвник — фуксин або сафранін.
8. Через 1–2 хвилини препарат промивають водою та висушують.

Результати фарбування

Мікроорганізми, які належать до грампозитивних, набувають фіолетового кольору. Це пояснюється особливостями будови їх клітинної стінки, де комплекс генціанового фіолетового з йодом утримується і не вимивається спиртом. Грамнегативні бактерії, навпаки, після обробки спиртом знебарвлюються, а при додатковому фарбуванні фуксином або сафраніном набувають червоного відтінку.

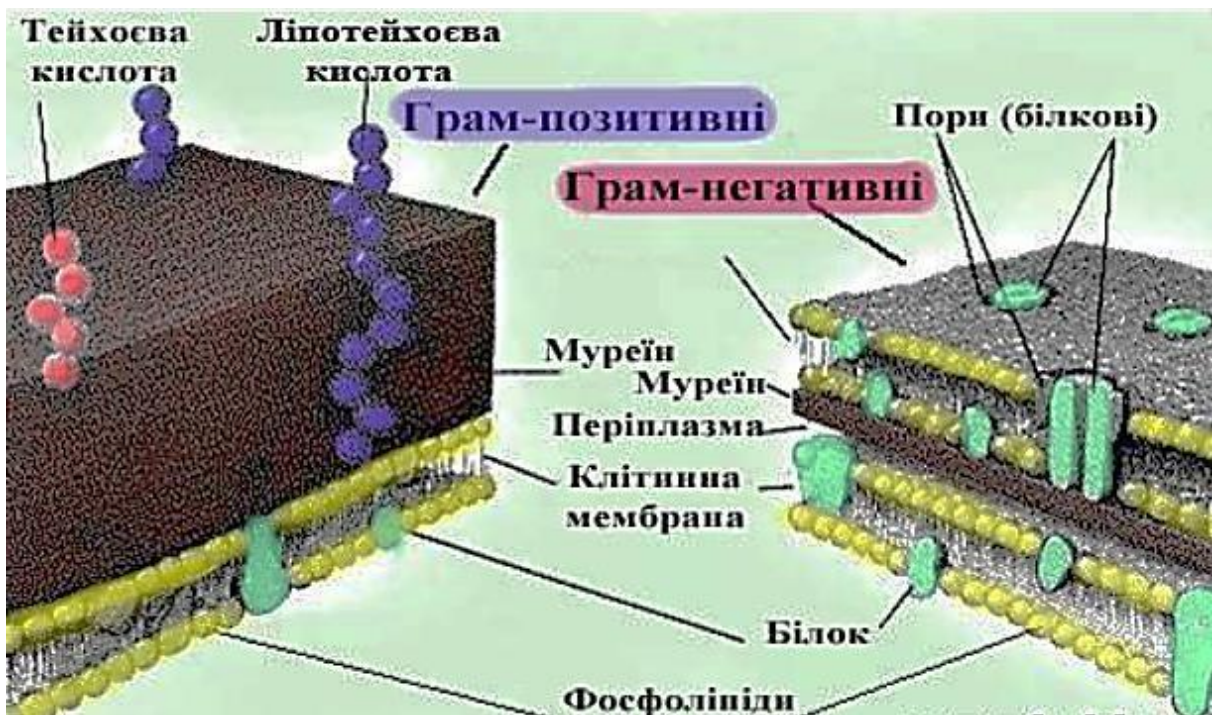


Рис. 2.10. Будова клітинних стінок грампозитивних та грамнегативних бактерій

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. 2.11. Відмінності між грампозитивними та грамнегативними бактеріями

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. 2.12.). Некислотостійкі бактерії знебарвлюються, тому під мікроскопом ми бачимо їх забарвленими у синій.

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

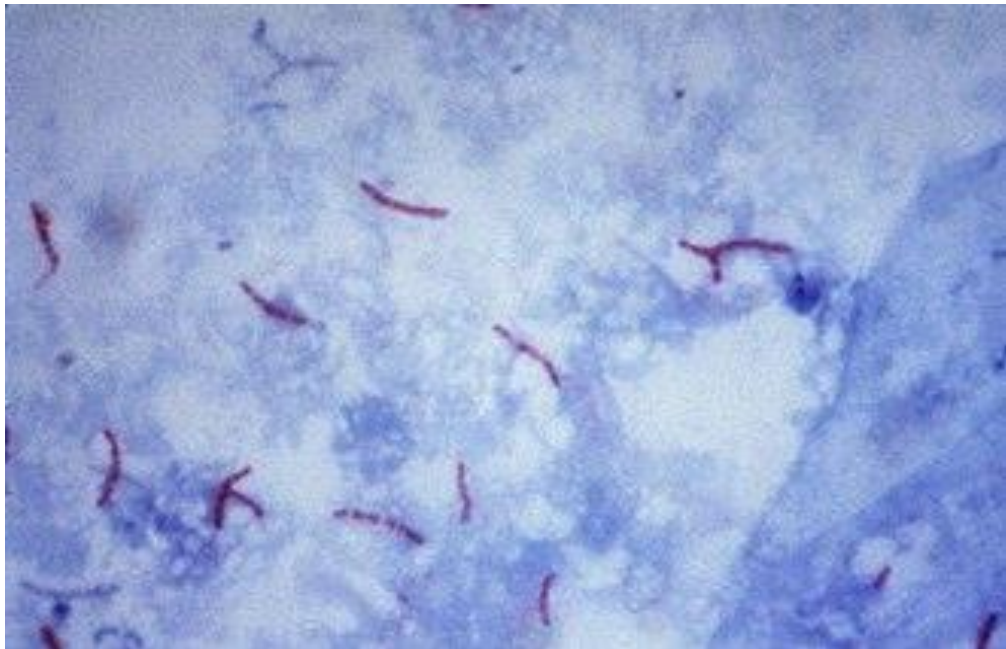


Рис. 2.12. Кислотостійкі палички туберкульозу під мікроскопом зафарбовані за методом Циля-Нільсена

Морфологічна оцінка мікроорганізмів під мікроскопом.

Морфологічне дослідження мікроорганізмів під мікроскопом передбачає комплексне вивчення їх клітинних характеристик, що дозволяє здійснювати первинну ідентифікацію культур. У процесі аналізу враховують такі основні ознаки:

- розміри клітин у мікрометрах;
- морфологічну форму (кокова, паличкоподібна тощо);
- наявність внутрішньоклітинних структур (вакуолі, рибосоми, мітохондріоподібні утворення та інші);
- наявність включень запасних речовин (волютин, крохмальні зерна тощо);
- присутність зовнішніх структур (капсули, джгутики, війки);
- здатність до спороутворення та особливості спор;
- реакцію на різні типи фарбування (грампозитивність/грамнегативність, кислотостійкість, стійкість до дії хімічних агентів);
- характер розташування клітин у колоніях або біоплівках (ланцюжки, пари, скупчення).

На основі сукупності зазначених ознак здійснюється попередня ідентифікація та класифікація мікроорганізмів.

Виділення чистих культур мікроорганізмів

Отримання чистих культур зі змішаних мікробних популяцій проводять у кілька послідовних етапів:

1. первинний посів змішаної культури на відповідні поживні середовища;
2. первинний аналіз вирослих колоній за морфологічними, мікроскопічними та за необхідності молекулярно-генетичними ознаками;
3. відбір окремих колоній з характерними властивостями;

4. ресуспендування відібраної культури у стерильній дистильованій воді;
5. повторний посів на поживне середовище методом штрихового розсіювання (паралельних штрихів);
6. оцінка результатів росту та відбір ізольованих колоній.

Метод штрихового посіву полягає у поступовому розведенні клітин на поверхні агару. Для цього невелику кількість суспензії наносять на край чашки Петрі, після чого стерильною бактеріологічною петлею виконують серію паралельних штрихів. Далі чашку повертають і продовжують штрихування від кінців попередніх ліній, поступово зменшуючи концентрацію клітин. Процедуру повторюють 4–5 разів для забезпечення отримання ізольованих колоній.

Після завершення посіву чашки інкубують у термостаті при температурі 30–36 °С протягом 1–3 діб, розміщуючи їх у перевернутому положенні.

У разі відсутності чистих колоній процедуру повторюють до досягнення необхідного результату.

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

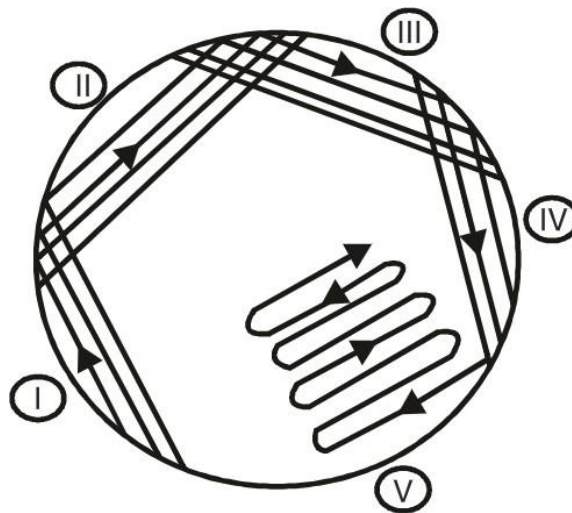


Рис. 2.13. Схема посіву мікроорганізмів на чашку Петрі методом паралельних штрихів

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.

За кількістю КУО можна розрахувати кількість життєздатних клітин мікроорганізмів у всьому об'ємі біопрепарату (табл. 3.2) за формулою:

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

M – загальна кількість мікроорганізмів у біопрепараті;

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

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

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

Мікробне число на 1 мл біопрепарату розраховується за наступною формулою:

$$M1 = \frac{M}{V},$$

де M1 – мікробне число в одному мл біопрепарату; M – загальне мікробне число;

V – об'єм біопрепарату в мл.

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. 2.14.) і навпаки, якщо мікроорганізми не мають каталазних властивостей, то піна не утворюється – реакція негативна.

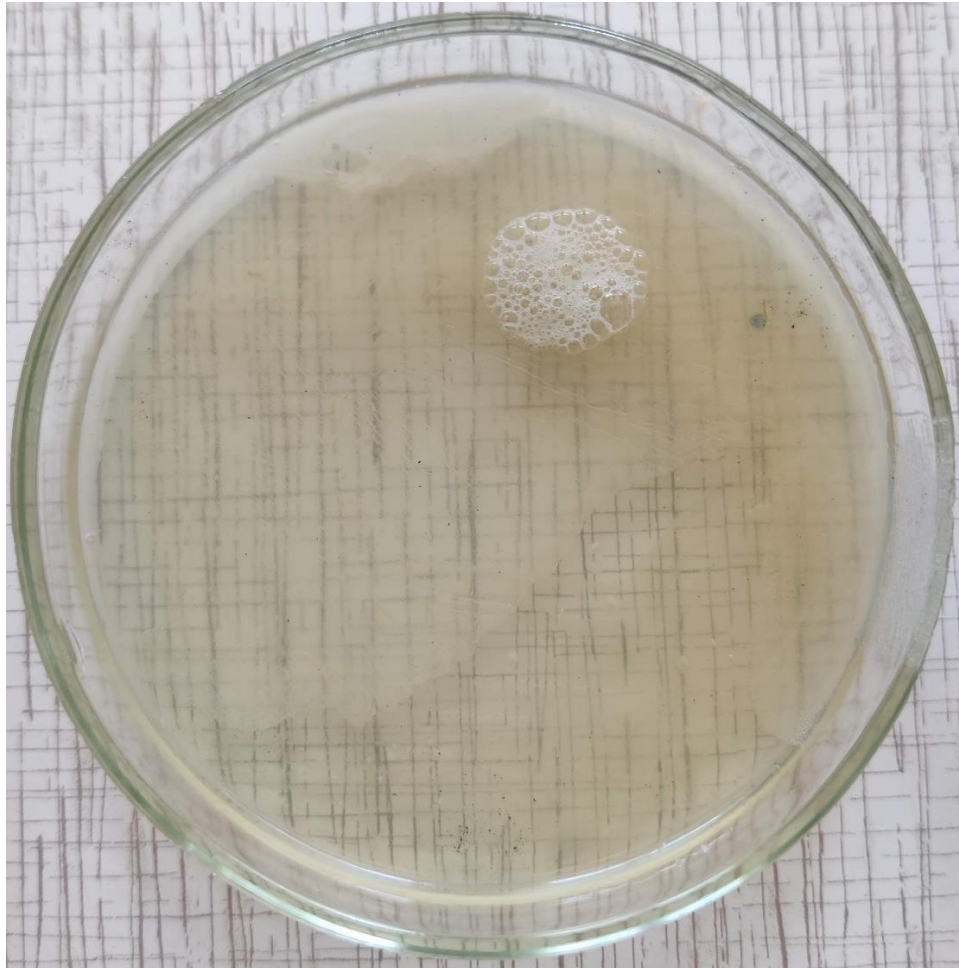


Рис. 2.14. Результат тестування на каталазні властивості виділеної чистої культури *Bacillus subtilis* – утворення піни свідчить про позитивну реакцію

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Оцінка хімічного складу біодобрива «Гуміфренд»

Визначення хімічного складу біопрепарату «Гуміфренд» здійснювали методом капілярного електрофорезу із використанням приладу «КАПЕЛЬ-105М». Для аналізу застосовували робочий розчин препарату, приготований на основі дистильованої води у співвідношенні 0,35 мл біопрепарату на 100 мл розчинника.

Отримані результати для робочого розчину «Гуміфренду» порівнювали з аналогічними показниками робочого розчину біогумусу, який досліджувався в умовах лабораторії.

За результатами аналізу встановлено, що у складі робочого розчину біопрепарату «Гуміфренд» присутній комплекс основних неорганічних йонів, зокрема NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , а також аніони SO_3^{2-} , SO_4^{2-} та PO_4^{3-} . Узагальнені результати досліджень наведено в таблиці 3.1.

Порівняльний аналіз із робочим розчином біогумусу показав, що «Гуміфренд» характеризується підвищеним вмістом низки елементів живлення. Зокрема, концентрація іонів амонію є вищою на 34,6 мг/л, калію — на 2040 мг/л, натрію — на 40 мг/л, магнію — на 43 мг/л, сульфуровмісних сполук — на 142,9 мг/л.

Водночас у розчині біогумусу відмічено більший вміст кальцію — на 356 мг/л порівняно з «Гуміфрендом». Вміст фосфоровмісних сполук у обох зразках є близьким і становить менше 50 мг/л.

Таким чином, досліджуваний біопрепарат характеризується вираженим мінеральним складом і підвищеним вмістом основних елементів живлення, що підтверджує його потенційну агрохімічну ефективність.

Таблиця 3.1.

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 було проведено дослідження амінокислотного складу біопрепарату «Гуміфренд» (табл. 3.2.). У порівнянні з робочим розчином біогумусу встановлено, що досліджуваний препарат характеризується як нижчим, так і вищим вмістом окремих амінокислот.

Зокрема, у «Гуміфренді» зафіксовано менші концентрації аргініну (на 15 мг/л), проліну (на 4,6 мг/л) та гліцину (на 6 мг/л). Водночас відмічено підвищений вміст ряду інших амінокислот: лізину (на 34 мг/л), тирозину (на 5,6 мг/л), фенілаланіну (на 3,4 мг/л), сумарно лейцину та ізолейцину (на 10,1 мг/л), валіну (на 1,4 мг/л), треоніну (на 8,1 мг/л), серину (на 2,4 мг/л) та аланіну (на 12,2 мг/л). Крім того, гістидин і метіонін були виявлені у складі «Гуміфренду», тоді як у зразку біогумусу вони не визначалися.

Отримані результати свідчать про специфічний амінокислотний профіль біопрепарату, який формується за рахунок підбраного мікробіологічного складу та метаболічної активності мікроорганізмів. Це дозволяє розглядати «Гуміфренд» як комплексний засіб із властивостями як біодобрива, так і профілактичного препарату для рослин.

З огляду на отримані дані, доцільним є подальше вдосконалення складу препарату шляхом введення ризобактерій, зокрема представників роду *Streptomyces*. Це потенційно може підсилити його ростостимулювальну та захисну дію щодо фітопатогенів.

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

3.1 Ідентифікація колоній мікроорганізмів

Ідентифікацію виділених мікроорганізмів проводили із використанням класифікаційного визначника Берджі. Морфологічні та культуральні характеристики досліджуваних штамів оцінювали на основі макроскопічного аналізу колоній та мікроскопічного дослідження клітин після фарбування за Грамом та за Цілем–Нільсеном. На рисунках 3.1–3.5 наведено результати дослідження для *Bacillus subtilis*, *Bacillus mucilaginosus*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus megaterium* та *Paenibacillus polymyxa*, зокрема: зовнішній вигляд колоній на агаризованих середовищах, а також мікрофотографії клітин.

Bacillus subtilis

Колонії *Bacillus subtilis* були отримані на поживному агарі LA на сьому добу культивування після посіву. Вони характеризуються середнім розміром, білуватим відтінком, напівпрозорістю та сухою, матовою поверхнею. Структура колоній дрібнозморшкувата, форма переважно неправильна, з хвилястими та дещо округленими краями.

Біохімічна активність штаму підтверджена позитивною реакцією на каталазу. При мікроскопічному дослідженні клітини мають паличкоподібну

форму з заокругленими кінцями, є грампозитивними та не проявляють кислотостійкості.

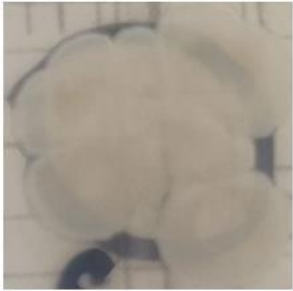
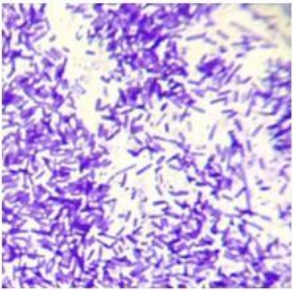
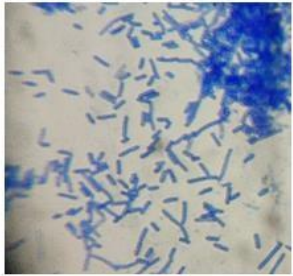
Колонія	
Фарбування за Грамом	
Фарбування за Цілем-Нільсеном	

Рис. 3.1 Результати дослідження *Bacillus subtilis*

Чисті колонії *Bacillus subtilis* на живильному середовищі LA білі, напівпрозорі, сухі, дрібнозморшкуваті (рис. 3.1.).



Рис. 3.2. Чисті колонії *Bacillus subtilis* на живильному середовищі

***Bacillus mucilaginosus*.**

Колонія *Bacillus mucilaginosus*, зображена на рисунку 3.2. 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.

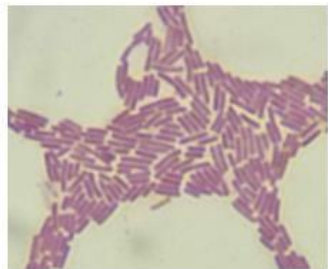
Колонія	
Фарбування за Грамом	
Фарбування за Цілем-Нільсеном	

Рис. 3.3. Результати дослідження *Bacillus mucilaginosus*

Чисті колонії *Bacillus mucilaginosus* на живильному середовищі LA бежево-жовті, дрібнозморшкуваті, непрозорі, сухі (рис. 3.3.).



Рис. 3.4. Чисті колонії *Bacillus mucilaginosus* на живильному середовищі LA

Paenibacillus macerans.

Колонія *Paenibacillus macerans*, зображена на рисунку 3.4. 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.

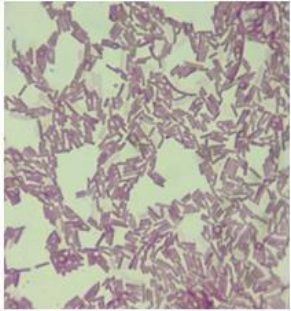
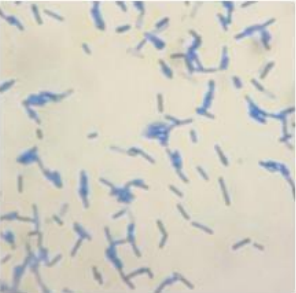
Колонія	
Фарбування за Грамом	
Фарбування за Цілем-Нільсеном	

Рис. 3.5. Результати дослідження *Paenibacillus macerans*

Чисті колонії *Paenibacillus macerans* на живильному середовищі LA молочного кольору, напівпрозорі, поверхня дрібнозморшкувата, блискуча (рис. 3.6.).



Рис. 3.6. Чисті колонії *Paenibacillus macerans* на живильному середовищі LA

***Bacillus megaterium*.**

Колонія *Bacillus megaterium*, зображена на рисунку 3.7. 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.

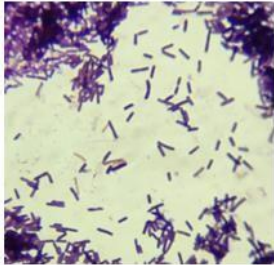
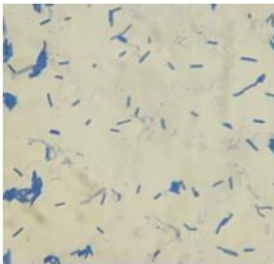
Колонія	
Фарбування за Грамом	
Фарбування за Цілем-Нільсеном	

Рис. 3.7 Результати дослідження *Bacillus megaterium*



Чисті колонії *Bacillus megaterium* на живильному середовищі LA молочно-білого кольору, непрозорі, глянцеві (рис. 3.8).

Рис. 3.8 Чисті колонії *Bacillus megaterium* на живильному середовищі LA

***Paenibacillus polymyxa*.**

Колонія *Paenibacillus polymyxa*, зображена на рисунку 3.9 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.

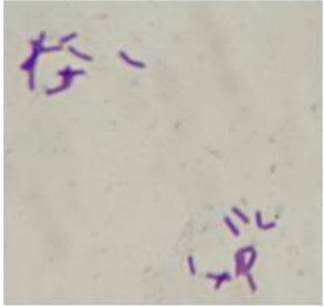
Колонія	
Фарбування за Грамом	
Фарбування за Цілем-Нільсеном	

Рис. 3.9 Результати дослідження *Paenibacillus polymyxa*

Чисті колонії *Paenibacillus polymyxa* на живильному середовищі LA білі, непрозорі, глянцеві (рис. 3.10).



Рис. 3.10 Чисті колонії *Paenibacillus polymyxa* на живильному середовищі LA

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

Досліджувані мікроорганізми були висіяні на два різні за складом поживні середовища — LA та SG-1. Метою експерименту було визначення найбільш оптимального середовища для скринінгу та подальшого культивування мікроорганізмів, що входять до складу біопрепарату «Гуміфренд», а саме: *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus megaterium* та *Paenibacillus polymyxa*.

Результати підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО), отримані після інкубування зразків на різних поживних середовищах, наведено у таблиці 3.1. Кількісна оцінка колоній здійснювалася органолептичним методом, після чого середні значення визначалися відповідно до стандартних підходів статистичної обробки експериментальних даних.

Таблиця 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	-

На основі отриманих даних щодо кількості колонієутворюючих одиниць можна зробити висновок, що поживне середовище LA є більш ефективним для скринінгу мікроорганізмів біопрепарату «Гуміфренд», а також для культивування бактерій родів *Bacillus* та *Paenibacillus* порівняно із середовищем SG-1.

Згідно з результатами дослідження, на середовищі LA було виявлено наступну кількість колоній: *Bacillus mucilaginosus* — 2 ± 1 КУО при посіві зразка, розведеного до 10^{-1} ; *Bacillus subtilis* — 8 ± 1 КУО при розведенні 10^{-3} ; *Paenibacillus macerans* — 6 ± 1 КУО також при розведенні 10^{-3} ; *Bacillus megaterium* — 4 ± 1 КУО при розведенні 10^{-4} ; *Paenibacillus polymyxa* — 3 ± 1 КУО при розведенні 10^{-4} .

Натомість на поживному середовищі SG-1 ріст колоній вищезазначених мікроорганізмів не спостерігався, що свідчить про його низьку придатність для виділення та культивування досліджуваних штамів у даних умовах експерименту.

Таблиця 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 3.2 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.

Bacillus megaterium характеризуються здатністю синтезувати фітогормони групи цитокінінів, які відіграють важливу роль у стимуляції росту та розвитку рослин. Крім того, ці мікроорганізми беруть участь у процесах транспортування поживних елементів із ґрунту до рослин, зокрема у фосфатному та нітратному живленні.

Окремо слід відзначити їхню біоконтрольну активність щодо фітопатогенів, серед яких *Mycosphaerella graminicola* та *Ralstonia solanacearum*. Також *Bacillus megaterium* сприяють підвищенню стресостійкості рослин до абіотичних факторів, таких як посуха, засолення ґрунтів і низькі температури. Додатково встановлено їх здатність до деградації пестицидів та інших ксенобіотиків, що позитивно впливає на процеси самоочищення ґрунту та покращення його екологічного стану.

Таким чином, біопрепарат «Гуміфренд» завдяки наявності у своєму складі даного виду мікроорганізмів також потенційно проявляє зазначені біологічні властивості.

3.4. Технологічна схема отримання біопрепарату для захисту рослин із використанням бактерій роду *Bacillus* та *Paenibacillus*

Основою виробництва біопрепаратів для захисту рослин є нарощування мікробної біомаси цільових мікроорганізмів. Початковим етапом є отримання чистої культури, яку спочатку культивують на щільних агаризованих середовищах у лабораторних умовах.

Наступним етапом є нарощування посівного матеріалу шляхом перенесення культури у рідкі живильні середовища з поступовим збільшенням об'єму культивування — від колб до малих ферментерів. На всіх етапах обов'язковим є контроль чистоти культури та дотримання асептичних умов, а також забезпечення оптимальних параметрів росту мікроорганізмів.

Основне промислове культивування здійснюють у ферментерах із рідкими поживними середовищами, які є більш технологічно ефективними порівняно з агаризованими. Ферментери оснащуються системами подачі стерильного повітря, живильного середовища та піногасників, а також пристроями для перемішування.

Конструкція обладнання передбачає контроль і регулювання основних параметрів процесу, зокрема температури, рН, тиску та концентрації розчиненого кисню. Додатково передбачені системи видалення метаболітів, які можуть інгібувати ріст культури.

Окремо ферментери обладнані системами стерилізації та мийки, які працюють із використанням насиченої водяної пари, що забезпечує підтримання необхідного рівня біобезпеки та стерильності виробничого процесу.

Схема ферментера зображена на рисунку 3.11.

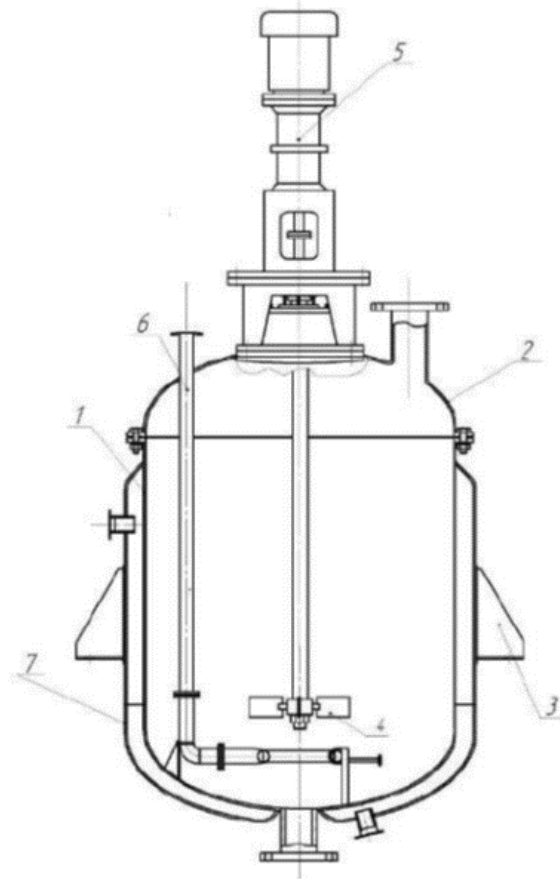


Рис. 3.11 Схема ферментера: 1 – корпус, 2 – кришка, 3 – опора, 4 – мішалка, 5 – привод, 6 – барботер, 7 – сорочка

Глибинне культивування мікроорганізмів може здійснюватися у трьох основних режимах:

1. **Періодичний (batch) режим** – передбачає одноразове завантаження у ферментер поживного середовища та посівного матеріалу. Після завершення процесу культивування вміст біореактора повністю вивантажується для подальшого виділення цільового продукту.

2. **Безперервний режим** – характеризується постійним надходженням свіжого живильного середовища та одночасним відведенням культуральної рідини разом із біомасою, що забезпечує підтримання процесу у стаціонарному стані.

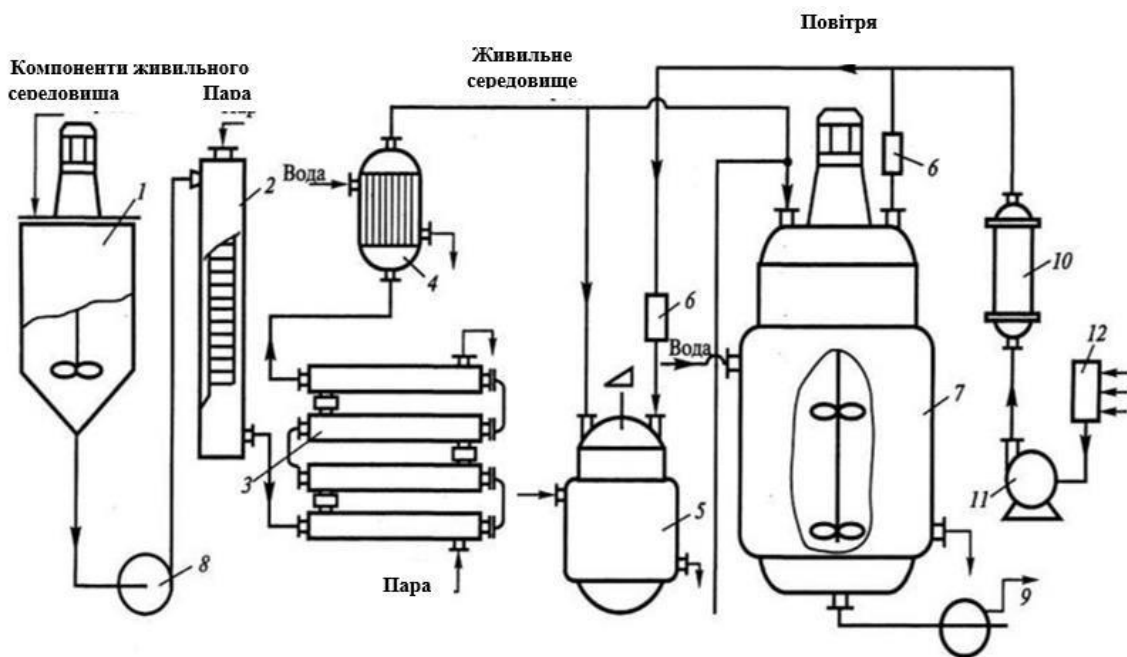
3. **Напівбезперервний режим** – поєднує елементи двох попередніх: частина культуральної рідини періодично вилучається з біореактора, після чого компенсується введенням свіжого поживного середовища.

Для культивування мікроорганізмів родів *Bacillus* та *Paenibacillus* доцільним є використання періодичного режиму глибинного культивування (рис.

3.12) у ферментерах об'ємом близько 1000 л на дріжджеполісахаридному живильному середовищі за аеробних умов.

Процес супроводжується постійним перемішуванням (швидкість обертання мішалки становить 200–220 об/хв), при цьому завантаження ферментера не перевищує 70% його робочого об'єму. Живильне середовище та посівний матеріал вносять із суворим дотриманням асептичних умов, одночасно контролюючи ключові параметри культивування, зокрема температуру та рН.

Аерація забезпечується за допомогою барботера, через який подається стерильне повітря під тиском. Оптимальна температура процесу становить 30–36 °С. На початкових етапах культивування значення рН знаходиться в межах 6,2–6,5, однак у процесі росту культури може підвищуватися до 8,0–8,5. Для підтримання стабільних умов середовище періодично коригують шляхом внесення буферних розчинів лужного характеру до досягнення оптимального рівня рН 6,0–6,2.



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 – насос; 9 – насос; 10 – фільтр для попереднього очищення повітря; 11 – компресор; 12 – основний фільтр для очищення повітря.

Рис. 3.12. Принципова технологічна схема глибинного культивування

Після завершення процесу ферментації культуральна рідина підлягає постферментаційній обробці. На цьому етапі можливе внесення додаткових компонентів, зокрема мікро- та макроелементів, вітамінів та інших біологічно активних речовин, після чого продукт може використовуватися у рідкій формі як готовий біопрепарат.

Альтернативно здійснюється концентрування клітинної біомаси мікроорганізмів із застосуванням різних методів розділення, таких як фільтрація, флотація, сепарація або центрифугування. Отриманий клітинний концентрат може піддаватися подальшому сушінню, зокрема ліофільному або розпилювальному, з метою одержання стабільної сухої форми препарату.

Готовий продукт після відповідної обробки фасується у тару, маркується, пакується та направляється на зберігання і транспортування відповідно до вимог технологічного процесу.

Важливим етапом біотехнологічного виробництва із використанням мікроорганізмів є також знешкодження виробничих відходів. Для інактивації спор та вегетативних клітин застосовують методи стерилізації, а також хімічну обробку із використанням розчинів соляної кислоти або гідроксиду натрію з подальшою нейтралізацією до нейтрального рівня рН (≈ 7) перед скиданням у каналізаційну систему. Мийні та дезінфекційні розчини також попередньо нейтралізують. Повітряні викиди систем вентиляції підлягають знезараженню. Тверді відходи виробництва (засоби індивідуального захисту, склобій, пакувальні матеріали тощо) утилізуються відповідно до встановлених санітарних норм.

Технологічна схема отримання біопрепаратів на основі мікроорганізмів *Bacillus subtilis*, *Bacillus mucilaginosus*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus megaterium* та *Paenibacillus polymyxa* включає такі основні етапи (рис. 3.13):

1. Передферментаційна стадія:

- підготовка технологічного обладнання;
- приготування поживних середовищ;
- підготовка піногасників;
- стерилізація систем;
- нарощування посівного (маточного) матеріалу.

2. Ферментаційна стадія:

- глибинне культивування мікроорганізмів у біореакторах.

3. Постферментаційна стадія:

- виділення та очищення цільового продукту;
- концентрування біомаси;
- стабілізація та фасування препарату;
- утилізація виробничих відходів.

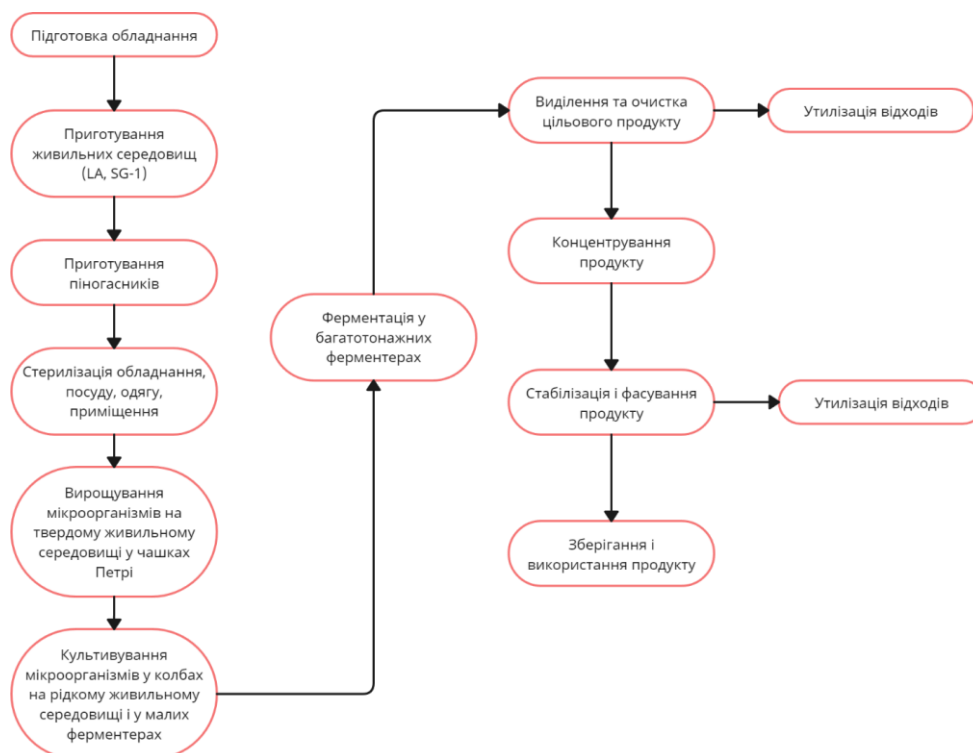


Рис. 3.13 Технологічна схема отримання біопрепарату для захисту рослин

ВИСНОВКИ

1. У біопрепараті «Гуміфренд» було виділено та ідентифіковано такі мікроорганізми: *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus polymyxa*. Усі вони представлені паличкоподібними клітинами з округлими кінцями, здатними до спороутворення, не є кислотостійкими та характеризуються позитивною каталазною реакцією. За результатами фарбування встановлено, що грампозитивними є *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* та *Paenibacillus polymyxa*, тоді як *Bacillus mucilaginosus* і *Paenibacillus macerans* віднесено до грамнегативних. Функціонально мікроорганізми мають різні властивості: *Bacillus subtilis* покращує засвоєння фосфору рослинами; *Bacillus megaterium* проявляє антагоністичну активність щодо фітопатогенів, підвищує імунітет рослин і бере участь у кругообігу Карбону та Фосфору; *Paenibacillus polymyxa* здатний до фіксації атмосферного азоту, синтезує фітогормони (цитокініни, ауксини, гібереліни) та антибіотичні сполуки, що пригнічують розвиток патогенів; *Bacillus mucilaginosus* переводить сполуки Калію та Фосфору у форми, доступні для рослин; *Paenibacillus macerans* бере участь у процесах азотфіксації та ферментації азоту.

2. За результатами хімічного аналізу робочого розчину біопрепарату «Гуміфренд» встановлено наявність іонів амонію, Калію, Натрію, Магнію, Кальцію, Сульфору та Фосфору. Найвищі концентрації серед них становлять: Калій — 3290 мг/л, Кальцій — 704 мг/л, Сульфур — 215 мг/л та Натрій — 190 мг/л. Крім того, у складі препарату виявлено широкий спектр амінокислот: аргінін, лізин, тирозин, фенілаланін, гістидин, лейцин, ізолейцин, метіонін, валін, пролін, треонін, серин, аланін та гліцин. Найбільш представленими є лізин — 52 мг/л, аланін — 19 мг/л, лейцин та ізолейцин — 19 мг/л, гліцин — 17 мг/л, а також треонін і аргінін — по 15 мг/л.

3. Аналіз кількості колонієутворюючих одиниць показав, що серед досліджених середовищ більш придатним для скринінгу мікроорганізмів біопрепарату «Гуміфренд» є середовище LA порівняно з SG-1. На середовищі LA зафіксовано ріст: *Bacillus mucilaginosus* — 2 ± 1 колонії (10^{-1}), *Bacillus subtilis* — 8 ± 1 (10^{-3}), *Paenibacillus macerans* — 6 ± 1 (10^{-3}), *Bacillus megaterium* — 4 ± 1

(10^{-4}), *Paenibacillus polymyxa* — 3 ± 1 (10^{-4}). Натомість на середовищі SG-1 ріст колоній зазначених мікроорганізмів не був виявлений. Отримані дані свідчать, що у складі препарату домінує *Bacillus megaterium*, тоді як *Bacillus mucilaginosus* представлений у найменшій кількості.

4. Для ефективного культивування бактерій родів *Bacillus* та *Paenibacillus* доцільно застосовувати періодичне глибинне культивування у ферментерах об'ємом близько 1000 л із використанням дріжджеполісахаридного поживного середовища в умовах аеробіозу. Процес супроводжується безперервним перемішуванням зі швидкістю 200–220 об/хв. Оптимальна температура культивування становить 30–36 °C. Значення рН на старті процесу перебуває в межах 6,2–6,5 і поступово зростає до 8,0–8,5. Для підтримання оптимальних умов середовище періодично коригують до рівня 6,0–6,2 шляхом внесення буферних лужних розчинів.

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 «ІНК ОС», 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. Оpubл. 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. Оpubл. 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”. Оpubл 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 . Поживне середовище для отримання біомаси бактерій роду *basillus*. 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.