

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНОКУЛЯЦИИ СЕМЯН ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ БАКТЕРИЯМИ РОДА *BACILLUS*, ПЕРСПЕКТИВНЫМИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ

**А. М. Асатурова**, кандидат биологических наук, зав. лабораторией создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов, ORCID ID: 0000-0002-0060-1995;

**Н. А. Жевнова**, научный сотрудник лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов, ORCID ID: 0000-0003-4702-1709;

**М. Д. Павлова**, младший научный сотрудник лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов, ORCID ID: 0000-0002-1714-2326;

**В. М. Дубяга**, научный сотрудник лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов, ORCID ID: 0000-0003-0083-6505;

**Н. С. Томашевич**, старший научный сотрудник лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов, ORCID ID: 0000-0002-7297-5929;

**А. И. Хомяк**, научный сотрудник лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов, ORCID ID: 0000-0001-9360-2323;

**А. А. Цыгичко**, младший научный сотрудник лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов, ORCID ID: 0000-0001-7209-3849;

**Е. Ю. Бондарчук**, младший научный сотрудник лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов, ORCID ID: 0000-0003-2164-5935

**Т. М. Сидорова**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов, ORCID ID: 0000-0003-4281-5278

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений», 350039, г. Краснодар, п/о-39

В результате ступенчатого скрининга были отобраны перспективные штаммы бактерий для создания на их основе лабораторных образцов биопрепаратов для защиты озимой пшеницы от возбудителей фузариозных корневых гнилей. Цель работы – определить ростстимулирующий и защитный эффекты лабораторных образцов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на растения озимой пшеницы, а также определить антагонистическое действие штаммов в отношении грибов рода *Fusarium*. В результате работы было отмечено положительное влияние лабораторных образцов на рост, развитие и всхожесть растений в условиях теплицы и способность значительно ингибировать мицелий фитопатогенных грибов *F. graminearum*, *F. culmorum* и *Microdochium nivale* в лабораторных условиях. Исследования на искусственном инфекционном фоне в условиях климатической камеры не только показали высокое защитное действие лабораторных образцов, но и позволили определить регламенты их применения. Проведенные испытания доказывают перспективность новых биоагентов в качестве экологически безопасных средств защиты растений.

**Ключевые слова:** бактерии-антагонисты, *Bacillus subtilis*, фузариозные корневые гнили, биологическая защита растений, стимуляция роста растений.



## EFFICIENCY OF WINTER WHEAT SEED INOCULATION BY THE *BACILLUS* BACTERIA PROMISING FOR THE DEVELOPMENT OF BIO MEDICINES

**A. M. Asaturova**, Candidate of Biological Sciences, head of the laboratory of development of microbiological means of plant protection and collection of microorganisms, ORCID ID: 0000-0002-0060-1995;

**N. A. Zhevnova**, researcher of the laboratory of development of microbiological means of plant protection and collection of microorganisms, ORCID ID: 0000-0003-4702-1709;

**M. D. Pavlova**, junior researcher of the laboratory of development of microbiological means of plant protection and collection of microorganisms, ORCID ID: 0000-0002-1714-2326;

**V. M. Dubyaga**, researcher of the laboratory of development of microbiological means of plant protection and collection of microorganisms, ORCID ID: 0000-0003-0083-6505;

**N. S. Tomashevich**, senior researcher of the laboratory of development of microbiological means of plant protection and collection of microorganisms, ORCID ID: 0000-0002-7297-5929;

**A. I. Homyak**, researcher

of the laboratory of development of microbiological means of plant protection and collection of microorganisms, ORCID ID: 0000-0001-9360-2323;

**A. A. Tsygichko**, junior researcher

of the laboratory of development of microbiological means of plant protection and collection of microorganisms, ORCID ID: 0000-0001-7209-3849;

**E. Yu. Bondarchuk**, junior researcher

of the laboratory of development of microbiological means of plant protection and collection of microorganisms, ORCID ID: 0000-0003-2164-5935;

**T. M. Sidorova**, Candidate of Biological Sciences, senior researcher

of the laboratory of development of microbiological means of plant protection and collection of microorganisms, ORCID ID: 0000-0003-4281-5278

FSBSI "All-Russian Research Institute of Biological Protection of Plants",

350039, Krasnodar, p/of. 39

As a result of stage screening, there were selected promising bacterial strains to create laboratory samples of biological products on their basis to protect winter wheat from the causative agents of fusarium root rot. The purpose of the work is to determine the growth-stimulating and protective effect of laboratory samples of *Bacillus subtilis* BZR 336g and *B. subtilis* BZR 517 on winter wheat plants, as well as to determine the antagonistic effect of strains on *Fusarium* fungi. As a result of the work, there was established a positive effect of laboratory samples on the growth, development and germination of plants in greenhouse conditions and the ability to significantly inhibit the mycelium of phytopathogenic fungi *F. graminearum*, *F. culmorum* and *Microdochium nivale* in laboratory conditions. The study of the samples artificially infected in a climatic chamber showed not only a high protective effect of these laboratory samples, but also made it possible to determine the regimes for their use. The conducted tests prove the viability of new bioagents as environmentally friendly plant-protective products.

**Keywords:** bacteria-antagonists, *Bacillus subtilis*, *Fusarium* root rots, biological protection of plants, plant growth stimulation.

**Введение.** Заболевания, вызываемые грибами рода *Fusarium*, провоцируют корневые и прикорневые гнили всходов, трахеомикозное увядание растений, загнивание семян, поражение репродуктивных частей растений, увядания, что приводит к снижению качества зерна и значительным потерям урожая (Коломиец и Панкратова, 2016).

Современная стратегия предполагает применение биологических средств защиты растений, способствующих снижению химической нагрузки на агроценозы. Но, несмотря на современную тенденцию развития экологически безопасного земледелия, защита растений преимущественно основана на использовании химических пестицидов. Эти средства высокоэффективны, но имеют ряд недостатков: накопление токсичных остатков в окружающей среде, отсутствие избирательности действия, формирование устойчивых рас патогенов (Пожарский и Боканча, 2016).

По сравнению с химическими аналогами микробные биопрепараты обладают рядом преимуществ: высокая эффективность при правильном применении, избирательность действия в отношении широкого спектра патогенов, экологическая безопасность и др. (Азизбекян, 2013; Максимов и др., 2015).

Перспективность использования бактериальных штаммов против болезней, вызываемых грибами рода *Fusarium*, доказывают исследования зарубежных и российских ученых (Gagkaeva et al., 2014; Mnasri et al., 2017).

Сотрудниками лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВНИИБЗР в результате ступенчатого скрининга были отобраны перспективные штаммы бактерий р. *Bacillus* для создания на их основе биопрепаратов для защиты озимой пшеницы от возбудителей фузариоза (Асатурова и др., 2016). Штаммы адаптированы к условиям южного региона – основного производителя зерновых культур Российской Федерации.

Цель работы – определить ростстимулирующий и защитный эффекты лабораторных образцов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на растения озимой пшеницы, а также определить антагонистическое действие штаммов в отношении грибов рода *Fusarium*.

**Материалы и методы исследований.** Исследования проводили в 2012–2013 гг. Объектами исследований служили лабораторные образцы биопрепа-

ратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g (патент № 2553518) и *B. subtilis* BZR 517 (патент № 2552146) из рабочей коллекции ФГБНУ ВНИИБЗР (Асатурова и др., 2016), тест-культуры фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium culmorum* (Sm.) Sacc., *Microdochium nivale* (anamorf: *Fusarium nivale*) (Fr.) Ces.

Лабораторные образцы биопрепаратов обоих штаммов были получены в системах культивации клеток New Brunswick Scientific Excella E25 (США) (180 об/мин) методом посева агаровых блоков в жидкую картофельно-глюкозную среду. Культивирование осуществляли в течение 48 ч.

Определение ростстимулирующего действия на растения озимой пшеницы сорта Батько осуществляли в теплице при 24–25 °С и освещенности 14 000 люкс. Семена, обработанные лабораторными образцами биопрепаратов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517, высевали в ламинированные стаканы (объем выборки – 30 шт.). Спустя 14 дней определяли длину и массу побегов и корней проростков.

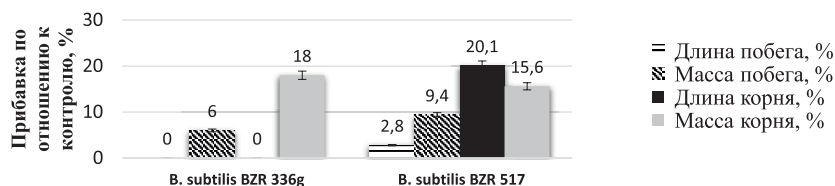
Антагонистическую активность штаммов-продуцентов лабораторных образцов биопрепаратов определяли методом двойных (встречных) культур на картофельно-глюкозном агаре и среде Кинга Б (Егоров, 1957).

Оценку влияния лабораторных образцов на всхожесть семян озимой пшеницы определяли в лабораторных условиях. Семена озимой пшеницы сорта Батько, обработанные *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517, проращивали в чашках Петри (ЧП) в камере непрерывного роста растений Binder KWWF 720 (Германия) при температуре 24 °С, влажности 65% и освещенности 5000 люкс. Отмечали количество взошедших растений по сравнению с контролем.

Определение биологической эффективности и регламента применения лабораторных образцов биопрепаратов осуществляли в условиях климатической камеры непрерывного роста растений Binder KWWF 720 на фоне искусственного заражения грибом *F. graminearum*. Для подготовки инфекционного фона чистую культуру *F. graminearum* выращивали на стерильном зерне, измельчали лабораторной мельницей IKA 11 basic (Германия), смешивали с чистым песком в соотношении 1 : 60 в ламинированных стаканах. В этот субстрат высаживали семена озимой пшеницы сорта Батько (объем выборки – 30 шт.), обработанные лабораторными образцами с экспериментальными

ми нормами применения 1, 2 и 3 л/т (расход рабочей жидкости – 10 л/т). В качестве биологического эталона использовали Фитоспорин-М, Ж (*B. subtilis* 26 Д, 1 л/т), в качестве химического – фунгицид Кинто Дуо (триконазол, прохлораз, 2 л/т). Растения выращивали при 24 °С, влажности 65% и освещенности 14 200 люкс. Проводили учет распространения и развития фузариозных корневых гнилей 15-дневных проростков и рассчитывали биологическую эффективность (Долженко, 2009).

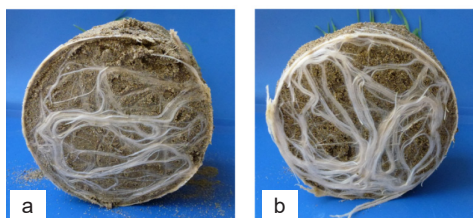
**Результаты и их обсуждение.** В ходе исследований было отмечено положительное влияние лабораторных образцов биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 на рост и развитие растений пшеницы. Так, при обработке семян ЖК штамма *B. subtilis* BZR 336g отмечено увеличение массы побега и корня на 18,0%. При обработке семян ЖК штамма *B. subtilis* BZR 517 отмечено увеличение массы побега на 9,4%, корня – на 15,6%, длины корня – на 20,1% (рис. 1).



**Рис. 1.** Влияние обработки водной суспензией штаммов на рост и развитие проростков озимой пшеницы сорта Батко  
**Fig. 1.** Effect of the treatment with a water suspension of strains on the growth and development of the winter wheat variety "Batko"

Необходимо отметить, что в результате обработки лабораторными образцами биопрепаратов увеличилось количество боковых корней, приходящихся на единицу

площади субстрата, что в полевых условиях, возможно, будет способствовать более эффективному поглощению почвенного раствора растением (рис. 2).



**Рис. 2.** Влияние лабораторных образцов на развитие корневой системы озимой пшеницы сорта Батко:  
a – контроль; b – обработка лабораторным образцом биопрепарата

**Fig. 2.** Effect of the laboratory samples on the development of root system of the winter wheat variety "Batko":  
a – control; b – treatment with a laboratory sample of the bio medicines

В целом штаммы *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 показали высокую антифунгальную активность к возбудителям фузариозных корневых гнилей, ингибируя рост мицелия патогенов к концу периода инкубации от 42,2 до 54%.

По степени ингибирования мицелия патогена можно отметить следующие закономерности: степень ингибирования штаммом *B. subtilis* BZR 336g роста мицелия *F. graminearum* к 10-м суткам достигла максимума – 51,7%, затем начала снижаться и к концу периода инкубации составила 50,2%. В отношении *M. nivale*

ситуация была аналогичной: на 10-е сутки степень ингибирования составила 47,3% и к 20-м суткам снизилась до 44,3%, в то время как степень ингибирования *F. culmorum* и на 10-е сутки достигала максимума – 48,2% и оставалась неизменной на протяжении всего периода инкубации. Но, несмотря на небольшое снижение значения константы ингибирования, штамм *B. subtilis* BZR 336g эффективно сдерживал рост мицелия патогена благодаря высокой подвижности, стремлению занять всю поверхность ЧП (табл. 1).

### 1. Антифунгальная активность штамма *B. subtilis* BZR 336g в отношении фитопатогенных грибов родов *Fusarium* и *Microdochium* 1. Antifungal activity of strain *B. subtilis* BZR 336g in relation to phytopathogenic *Fusarium* and *Microdochium* fungi

Штамм	Рост мицелия от посевного блока, мм; время инкубации, сутки				Ингибирование роста мицелия, %; время инкубации, сутки			
	5	10	15	20	5	10	15	20
<i>F. graminearum</i>	28,3±2,9	32,3±2,1	33,0±2,6	33,3±2,9	12,4	51,7	50,7	50,2
<i>F. culmorum</i>	27,0±4,2	27,5±3,5	27,5±3,5	27,5±3,5	43,9	48,2	48,2	48,2
<i>Microdochium nivale</i> ( <i>F. nivale</i> )	35,0±2,6	38,5±0,7	36,0±4,4	37,3±2,1	15,3	47,3	46,3	44,3

Степень ингибирования штаммом *B. subtilis* BZR 517 мицелия патогена *F. graminearum* к 10-м суткам совместной инкубации составила 52,2%, осталась неизменной на 15-е сутки и к концу периода совместной инкубации увеличилась и достигла максимального значения – 54,0%, в то время как в отношении *F. culmorum* она достигала максимума уже на 10-е сут-

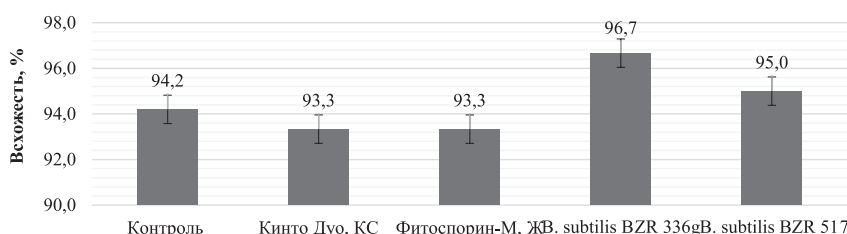
ки – 44,4%, а затем снизилась до 42,2% и осталась неизменной до конца периода инкубации. Аналогичную картину наблюдали в отношении патогена *M. nivale*: степень ингибирования мицелия патогена на 10-е сутки была максимальной – 57,6%, затем данный показатель падал до 52,7% и оставался неизменным до периода совместной инкубации (табл. 2).

**2. Антифунгальная активность штамма *B. subtilis* BZR 517 в отношении фитопатогенных грибов родов *Fusarium* и *Microdochium***  
**2. Antifungal activity of the strain *B. subtilis* BZR 517 against phytopathogenic *Fusarium* and *Microdochium* fungi**

Штамм	Рост мицелия от посевного блока, мм; время инкубации, сутки				Ингибирование роста мицелия, %; время инкубации, сутки			
	5	10	15	20	5	10	15	20
<i>F. graminearum</i>	26,5±3,5	29,0±5,7	29,0±5,7	27,5±4,9	36,9	52,5	52,5	54,0
<i>F. culmorum</i>	25,0±1,0	25,0±2,0	26,0±2,6	26,0±2,6	39,0	44,4	42,2	42,2
<i>Microdochium nivale</i> ( <i>F. nivale</i> )	25,0±2,0	33,5±7,8	29,0±1,4	29,0±1,4	0	57,6	52,7	52,7

Также была проведена оценка способности штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 обеспечивать защиту семян и проростков на фоне искусственного заражения грибом *F. graminearum*. Отмечено положительное влияние лабораторных образцов биопрепаратов на всхожесть семян озимой пшеницы в ус-

ловиях влажной камеры. Так, всхожесть семян в вариантах со штаммами *B. subtilis* BZR 517 и *B. subtilis* BZR 336g составила 95,0 и 96,7% соответственно, что превышало данный показатель в контроле, а также в вариантах с биологическим и химическим эталонами (рис. 3).



**Рис. 3.** Влияние лабораторных образцов биопрепаратов на всхожесть семян озимой пшеницы сорта Батко  
**Fig. 3.** Effect of the laboratory samples of the biomedicine on germination of the winter wheat variety "Batko"

Учет поражения корневыми гнилями фузариозной этиологии показал, что в контрольном варианте развитие болезни составило 21,3%, а распространенность – 80,5%. Важно отметить, что биологическая эффективность варьировала в зависимости от нормы применения лабораторного образца. Установлено, что предпосевная обработка семян

озимой пшеницы лабораторными образцами новых биопрепаратов на фоне искусственного заражения *F. graminearum* обеспечивала биологическую эффективность от 71,8 до 77,9% при эффективности биологического эталона Фитоспорин-М, Ж и химического эталона Кинто Дуо, КС – 71,4 и 38% соответственно (табл. 3).

**3. Оценка защитного действия лабораторных образцов биопрепаратов на фоне искусственного заражения грибом *F. graminearum***  
**3. Estimation of protective effect of the laboratory samples of the biomedicine on the background of artificial infection with the fungus *F. graminearum***

Варианты опыта	Норма применения, л/т, кг/т	Распространенность болезни, %	Развитие болезни, %	Биологическая эффективность, %
Контроль с инфекцией	–	80,5	21,3	–
Химический эталон Кинто Дуо, КС	2,5	21,5	6,1	71,4
Биологический эталон Фитоспорин-М, Ж	0,45	41,6	13,2	38,0
<i>B. subtilis</i> BZR 336g	1,0	23,9	6,0	71,8
	2,0	41,3	11,0	48,4
	3,0	23,6	5,9	72,3
<i>B. subtilis</i> BZR 517	1,0	22,5	7,6	64,3
	2,0	18,8	4,7	77,9
	3,0	46,0	14,0	34,3

Оценка защитного действия перспективных штаммов на фоне искусственного заражения позволила определить не только биологическую эффективность, но и оптимальные нормы применения каждого лабораторного образца: для штамма *B. subtilis* BZR 336g – 3 л/т, а для штамма *B. subtilis* BZR 517 – 2 л/т.

**Выводы.** Таким образом, нами были установлены высокая биологическая эффективность и оптимальные нормы применения лабораторных образцов биопрепаратов, обеспечивавшие высокий защитный эффект в отношении *F. graminearum*. Проведенные опыты выявили, что лабораторные образцы биопре-

паратов на основе новых штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 обеспечивали эффективную защиту семян и проростков озимой пшеницы, одновременно оказывая стимулирующее действие на растения озимой пшеницы, что выражалось в увеличении массы корней и побегов. Также было отмечено общее положительное влияние лабораторных образцов биопрепаратов на рост и развитие растений, что делает штаммы *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 перспективными для использования в сельскохозяйственной практике в качестве агентов биоконтроля возбудителей фузариозных корневых гнилей.



**Библиографические ссылки**

1. Азизбекян Р. Р. Использование спорообразующих бактерий в качестве биологических средств защиты растений // Биотехнология. 2013. № 1(29). С. 69–77.
2. Асатурова А. М., Жевнова Н. А., Хомяк А. И. и др. Эффективность применения новых биопрепаратов на основе штаммов бактерий *Bacillus subtilis* против фузариоза озимой пшеницы на фоне искусственного заражения // Наука Кубани. 2016. № 1. С. 9–14.
3. Долженко В. И. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве. СПб.: ВИЗР, 2009. 280 с.
4. Егоров Н. С. Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1957. 78 с.
5. Коломиец Т. М., Панкратова Л. Ф. Патогенный комплекс возбудителей корневой гнили пшеницы в разных регионах России // Защита и карантин растений. 2016. № 2. С. 37–40.
6. Максимов И. В., Веселова С. В., Нужная Т. В. и др. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам // Физиология растений. 2015. № 62(6). С. 763–775.
7. Пожарский В. Г., Боканча И. Н. Биотехнологии – платформа будущего // Защита и карантин растений. 2016. № 8. С. 28–29.
8. Gagkaeva T. Yu., Gavrilova O. P., Kuzin A. I., Kuznetsova N. I., Azizbekyan R. R. Influence of *Bacillus amyloxylophilus* bacteria on growth and toxin formation in *Fusarium sporotrichioides* fungi // Biotechnology in Russia. 2014. No. 1. Pp. 32–37.
9. Mnasri N., Chennaoui C., Hessini K., Djébali N., Gargourri S., Mhamdi R., Elkahoui S. Efficacy of some rhizospheric and endophytic bacteria in vitro and as seed coating for the control of *Fusarium clumorum* infecting durum wheat in Tunisia // European Journal of Plant Pathology. 2017. No. 3(147). Pp. 501–515. DOI 10.1007/s10658-016-1018-3.

**References**

1. Azizbekyan R. R. Ispol'zovanie sporoobrazuyushchih bakterij v kachestve biologicheskikh sredstv zashchity rastenij [The use of spore-forming bacteria as biological plant protection products] // Biotekhnologiya. 2013. № 1(29). S. 69–77.
2. Asaturova A. M., Zhevnova N. A., Homyak A. I. i dr. Ehffektivnost' primeneniya novyh biopreparatov na osnove shtammov bakterij *Bacillus subtilis* protiv fuzarioza ozimoy pshenicy na fone iskusstvennogo zarazheniya [The effectiveness of the utilization of new biological products based on the bacterial strains of *Bacillus subtilis* against winter wheat *Fusarium* on the background of artificial infection] // Nauka Kubani. 2016. № 1. S. 9–14.
3. Dolzhenko V. I. Metodicheskie ukazaniya po registracionnym ispytaniyam fungicidov v sel'skom hozyajstve [Methodical recommendations for registration tests on fungicides in agriculture Isolation of antagonist microbes and biological methods accounting for their antibiotic activity]. SPb.: VIZR, 2009. 280 s.
4. Egorov N. S. Vydelenie mikrobov-antagonistov i biologicheskie metody ucheta ih antibioticheskoy aktivnosti [Isolation of antagonist microbes and biological methods accounting for their antibiotic activity]. M.: Izd-vo Mosk. un-ta, 1957. 78 s.
5. Kolomiec T. M., Pankratova L. F. Patogennyj kompleks vozbuditelej kornevoj gnili pshenicy v raznyh regionah Rossii [Pathogenic complex of root rot pathogens on wheat in different regions of Russia] // Zashchita i karantin rastenij. 2016. № 2. S. 37–40.
6. Maksimov I. V., Veselova S. V., Nuzhnaya T. V. i dr. Stimuliruyushchie rost rastenij bakterii v regulyacii ustojchivosti rastenij k stressovym faktoram [Bacteria stimulating plant growth in the regulation of plant resistance to stress factors] // Fiziologiya rastenij. 2015. № 62(6). S. 763–775.
7. Pozharskij V. G., Bokancha I. N. Biotekhnologii – platforma budushchego [Biotechnology is the platform of the future] // Zashchita i karantin rastenij. 2016. № 8. S. 28–29.
8. Gagkaeva T. Yu., Gavrilova O. P., Kuzin A. I., Kuznetsova N. I., Azizbekyan R. R. Influence of *Bacillus amyloxylophilus* bacteria on growth and toxin formation in *Fusarium sporotrichioides* fungi // Biotechnology in Russia. 2014. No. 1. Pp. 32–37.
9. Mnasri N., Chennaoui C., Hessini K., Djébali N., Gargourri S., Mhamdi R., Elkahoui S. Efficacy of some rhizospheric and endophytic bacteria in vitro and as seed coating for the control of *Fusarium clumorum* infecting durum wheat in Tunisia // European Journal of Plant Pathology. 2017. No. 3(147). Pp. 501–515. DOI 10.1007/s10658-016-1018-3.

**Критерии авторства.** Авторы статьи подтверждают, что имеют на статью равные права и несут равную ответственность за плагиат.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.